



Universitat Autònoma de Barcelona

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

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

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



**Universitat Autònoma  
de Barcelona**

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

## **TESIS DOCTORAL**

**METAPNEUMOVIRUS HUMANO:  
EMERGENCIA, IMPACTO Y EVOLUCIÓN  
DE NUEVAS VARIANTES**

**Presentada por María Piñana Moro  
para optar al grado de Doctora**

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

**Barcelona, 2022  
Universitat Autònoma de Barcelona**



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

Certificamos,

Que la memoria titulada “**Metapneumovirus humano: emergencia, impacto y evolución de nuevas variantes**” presentada por **María Piñana Moro**, ha sido realizada bajo nuestra supervisión y cumple todos los requisitos necesarios que dicta la normativa vigente para ser defendida delante el tribunal correspondiente como compendio de publicaciones en la Universidad Autónoma de Barcelona.

Y para que así conste,

Firmamos este certificado en Barcelona, el 24 de enero de 2022

**Prof. Tomàs Pumarola**

**Dr. Andrés Antón**

**Dra. Núria Rabella**

**María Piñana**

**UNIVERSITAT AUTÒNOMA DE BARCELONA**

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

Doctorado en Microbiología  
Departamento de Genética y Microbiología



A mis padres.

“Nothing in life is to be feared, it is only to be understood. Now is the time to understand more, so that we may fear less.”

**Maria Skłodowska-Curie, 1867-1934**



# AGRADECIMIENTOS

---

Aquesta Tesi Doctoral és el resultat de cinc anys (+1 del màster) treballant al costat de gent meravellosa i increïble que m'ha acompanyat fins a aquest punt. Hi ha hagut moments d'immensa alegria, d'orgull, de sentiment d'equip, de riures i bones xerrades, i tot i que no tot han estat bons moments, mai hagués canviat res.

Primer de tot, vull expressar el meu agraïment infinit al Prof. Tomàs Pumarola i al Dr. Andrés Antón per haver-me permès formar part d'aquest equip i dels seus projectes, i per la confiança que han dipositat sempre en mi.

Tomàs, gràcies per haver accedit a ser el meu director, i gràcies per tot el que m'has ensenyat al llarg d'aquests anys. Sempre he apreciat la teva opinió sobre els treballs que hem anat fent aquests anys, i vull pensar que m'emporto una mica del teu saber estar, del teu rigor científic i coneixement sobre la virologia respiratòria. Gràcies per haver estat sempre tan proper, tant de bo em trobi amb més jefes com tu a la meva vida laboral.

Andrés, gràcies per haver-me acollit al teu grup de recerca des del dia que vaig entrar per la porta a l'hospital, gràcies per les infinites hores que li has dedicat als treballs que hem anat fent aquests anys, i gràcies per haver buscat sempre la manera de que em pogués quedar a l'equip. He après moltíssim amb tu, tant a nivell acadèmic i laboral com a nivell personal. Tota la meva evolució com a científica ha estat en gran part gràcies a tu. M'has guiat, m'has aconsellat i m'has transmès passió per la virologia respiratòria. No et puc estar més agraïda. I tot això sense oblidar el dia a dia que hem compartit (perquè literalment ens sentem a metre i mig de distància). Gràcies per tots els coffees, per les escapades a montbau per celebrar qualsevol cosa, pels teus chistes (que de tan dolents són bons), pels birreos i sopars de congrés, per tots els riures junts i per totes les vegades que m'has aconsellat més enllà de l'àmbit laboral. Mil gràcies.

També vull expressar el meu agraïment a la meva tutora, la Dra. Núria Rabella.

Núria, gràcies per haver accedit a ser la meva tutora, gràcies per tot el que em vas ensenyar sobre els cultius cel·lulars aquelles setmanes que vaig estar amb el teu equip. Em vas transmetre tanta passió pels cultius que vaig estar dos anys fent-ne a Vall d'Hebron fins a optimitzar el cultiu del metapneumovirus! M'emporto molt fort tots els sopars i birres als congressos, les converses profundes fent un cafè i el carinyo amb el que m'has tractat sempre. Gràcies.



Aquests anys, des de la meva entrada a l'equip de virus respiratoris, he pogut compartir moltes hores i moments amb gent increïble.

Cris, òbviament has de ser la primera a la que li doni les gràcies per tot. Ets la millor companya que ningú podria tenir mai, una gran amiga des de fa tants anys. Ets casa. I mira que al principi no ens fèiem gaire! Clarament el congrés de Stresa va ser un abans i un després, amb el teu famós "I agree", els nostres passejos cotillejant els hotels de mega luxe, l'excursió pel llac, les pizzes i la nutella... Aquest va ser l'inici de una de les millors amistats que tinc a la meva vida, i que espero mantenir sempre. Tot són records meravellosos, el congrés d'Atenes, el congrés de Sitges, dinars, sopars i festes... A més dels cafès i dinars diaris! M'encanta la teva innocència, la teva transparència, el teu riure contagiós, les teves abraçades espontànies. I ara amb la pandèmia, no em puc ni imaginar aquests 2 anys sense tu. Ens hem fet costat, hem treballat moltíssim, sempre colze amb colze, ajudant-nos sempre, ens hem animat, ens hem enfonsat, hem plorat i hem rigut, ens hem fet fortes juntes.

Alex, has sido la última en aparecer en esta historia, pero qué rápido has encontrado un sitio en el grupo! Gracias por toda la ayuda en esta tesis, fuera la hora que fuera, eres una crack con la bioinformática. Gracias por todas tus historias, por las risas, por los cafés, por todas las conversaciones, por los ánimos, por tus stickers adorables. Me encanta que formes parte de nuestro grupo!

Mari, cuánto valoro nuestra relación! Me encantan nuestras charlas, he aprendido tantísimo de ti. Me encanta tu manera de ver el mundo, tus opiniones tan sinceras y directas, tu sentido del humor, tus detalles y tu memoria, como cuando comenté que me gustaba un libro y al día siguiente me lo encontré en mi mesa, o cuando aparecieron grapadoras y sacapuntas a conjunto en nuestras mesas, cada una con su color favorito. Eres una persona maravillosa, mereces lo mejor.

Paco, tú que fuiste el primero en enseñarme las técnicas de virus, muchas gracias por haberme recibido tan bien! Gracias por todos los momentos que hemos pasado juntos, por las charlas y tu sonrisa y guiño de ojo cada mañana cuando nos vemos.

Susana, gràcies per totes les converses, pel teu riure super contagiós, pels moments on m'has fes costat i m'has animat quan tenia un mal dia, gràcies per abraçar-me i portar-me a urgències el dia que vaig tenir l'accident de moto, espero de tot cor que trobis la teva pau i felicitat a Sòria.

Laura, casi podríem dir que tu em vas iniciar en el camí dels virus respiratoris, després de l'Andrés! Gràcies pel guiatge, per les converses de ciència random, pels riures, pels pitis darrere de l'hospital fent un cafè i per les birres.

També m'agradaria agrair a la Dra. Gema Codina tota la seva ajuda i aprenentatge durant aquests anys. Gema, gràcies per haver-me ensenyat tota la part assistencial de SARS-CoV-2 i per haver-me recolzat dia a dia amb tots els problemes que anaven sorgint (que són molts), i gràcies especialment per haver-me cobert aquestes últimes setmanes perquè pogués centrar-me en la tesi. M'encanta que entris al despatx i tanquis darrere teu per explicar-nos històries gracioses que t'han passat, el dia a dia mai és avorrit amb aquests moments!

També estic molt agraïda a altres persones del servei de microbiologia que, tot i no ser part de l'equip de virus, han estat i són part de la meva vida diària. La Candela i l'Aroa, que tot i que la vida ens ha portat per camins diferents, han estat part de gran part de la meva tesi, i estic molt agraïda per tot el que hem compartit i viscut juntes. La Marta, per totes les converses que hem tingut i tindrem sobre l'esport que tant ens agrada, sobre lesions pel maleït esport, sobre vacances a la platja fent kaiac, muntanyisme... Semblarem sanes i tot! A tot l'equip de recerca, l'Alba, l'Albert, la Thais i ara el Josep. Amb tots quatre he compartit moltíssims moments, tots bons, gràcies per les converses, pels riures, per les nits de festa, per la nit de cine improvisada veient l'últim capítol de Juego de Tronos. A l'Ari, gràcies per tot el que m'has ensenyat sobre la tuberculosi, per totes les nostres converses, vaig disfrutar molt el congrés amb tu, gràcies per ser com ets. A Pili y a Ana, gracias por las meriendas y los coffees de desconexión, y por todas las charlas y vuestro cariño.

També estic molt agraïda a l'equip del VHIR. Al Dr. Josep Quer, gràcies per acollir-me al teu grup de recerca per fer el projecte de multirresistències de tuberculosi. Em vas fer sentir molt valorada i ben rebuda. Damir, gràcies per ajudar-me amb tot el projecte i gràcies per ser tan proper, m'emporto un bon amic. Gràcies als dos i a la resta de l'equip per tota la col·laboració durant la pandèmia, ha estat molt enriquidor.

No em puc deixar els i les alumnes de carrera i màster! L'Anna, el Jordi, l'Adrià, l'Alba, la Inés, la Maria, l'Helena i el Josep. Tots i totes heu deixat empremta a la nostra unitat i en mi, heu aportat molt dinamisme!

Ja fora de la feina, ha estat imprescindible poder comptar amb grans amistats i amb la família. No em puc creure la sort que tinc de poder agrair tantes coses a tanta gent.

Les meves amigues de la uni, la Neus i l'Andrea. Neus, gràcies per haver estat al meu costat sempre, per recolzar sempre totes les meves decisions, per celebrar les que van sortir bé i per abraçar-me quan no van sortir tan bé. Gràcies per treure'm de la rutina, per totes les birres, per escollir pizza tot i que no t'encanti perquè saps que a mi sí, per les videollamadas, pels viatges que hem fet i ens queden per fer (Roma nos espera). T'estimo molt. Andrea, mi doble, qué vida laboral tan paralela hemos tenido siempre! Gracias por todas las risas, por las escapadas, los congresos donde hemos coincidido, las meriendas, las birras, gracias por buscar siempre el momento para vernos. Nos queda pendiente encontrar un finde para irnos a esquiar! Gracias por todos los ánimos y el apoyo que me has dado con la tesis, ahora me toca dártelo a ti! Te quiero mucho.

Elxs de sempre, què imprescindibles sou a la meva vida! Qui ho hagués pensat quan vaig entrar al cau amb 17 i ja hi éreu, que havíeu passat tota la vostra vida juntes. Gràcies per la vida que compartim, per totes les birres random un dia entre setmana, pels veves, per tots els jocs, els vermuts, les festes temàtiques, pels sant joans, pels caps d'any, les esquiades, els viatges. Pensar en vosaltres és pensar en felicitat, alegria i molt amor. No us puc estimar més.

Víctor, cadascuna de les pàgines d'aquesta tesi tenen una mica de tu. Tu has viscut tota la meva carrera com a científica. Em vas animar amb els exàmens de la carrera i el TFG, em vas animar amb el TFM i ara ho has fet amb la tesi. Gràcies per haver-te quedat al meu costat, per buscar algo a fer per fer-me companyia mentre escrivia. Gràcies per escoltar-me totes les vegades que venia motivada de la feina o quan venia trista, gràcies per haver-me ajudat a sortir del pou on em va tirar el coronavirus, gràcies per buscar sempre la meva felicitat. Gràcies per aparèixer a la meva vida i quedar-te. T'estimo moltíssim.

Carlos y Julia, Hula Hop y Charles, mis hermanísimos. Gracias por haberme apoyado siempre incondicionalmente, gracias por vuestra sinceridad y vuestro amor. Por nuestro sentido del humor único y raro que solo entendemos los tres, por ese idioma que parece que solo hablemos nosotros, por entendernos con tan solo mirarnos. Os quiero muchísimo. Gracias por los memes.

Mamá y papá, os he dedicado la tesis porque no encuentro otra manera de agradecer todo lo que habéis hecho por mí. Gracias por haberme animado siempre a luchar por lo que quería, por todo el tiempo que habéis invertido en mí, por crear a la persona que soy hoy. Lo he aprendido todo de vosotros. Gracias por haber creado una familia tan maravillosa y tan nuestra, gracias por el hogar que sois. Os quiero muchísimo.

## ABREVIATURAS

---

AMPV.....	Metapneumovirus aviar
APMV.....	Paramyxovirus aviar
ARN.....	Ácido ribonucleico
ARNc .....	Ácido ribonucleico copia
ARNi.....	Ácido ribonucleico de interferencia
ARNm .....	Ácido ribonucleico mensajero
BEFV .....	Virus de la fiebre efímera bovina
CDV .....	Virus canino distemper
CR .....	regiones conservadas
C-tail .....	cola citoplasmática
dN/dS.....	relación entre la proporción de sustituciones no sinónimos y sinónimas
EBOV .....	Virus del ébola
F.....	Proteína de la fusión
FDLV .....	Virus Fer-de-Lance
FP.....	péptido de fusión
G .....	Glicoproteína de adhesión
GE .....	Gene-end
GS .....	Gene-start
HeV .....	Virus Hendra
HMPV .....	Metapneumovirus humano
HPIV.....	Virus parainfluenza humano
HRA.....	repeticiones heptádicas A
HRB.....	repeticiones heptádicas B
HRSV .....	Virus respiratorio sincitial humano
HU12O.....	Hospital Universitario 12 de Octubre
HUVH.....	Hospital Universitario Vall d'Hebron
IFN .....	Interferón
IHNV .....	Virus de la necrosis hematopoyética infecciosa
L .....	polimerasa
LNyV .....	Virus de de la necrosis amarilla de la lechuga
M .....	Proteína de la matriz
MARV.....	Virus Marburg

MAVS.....	proteína mitocondrial de señalización antiviral
MeV .....	Virus del sarampión
MoRE .....	<i>α-helical molecular recognition element</i>
MuV .....	Virus de las paperas
MPV.....	Pneumovirus murino
N .....	Nucleoproteína
NAAT.....	<i>nucleic acid amplification test</i>
NDV .....	Virus de la enfermedad de Newcastle
NiV .....	Virus Nipah
NK.....	<i>Natural killer</i>
tMK.....	Células terciarias de riñón de mono
TSLP .....	linfopoyetina estromal tímica
OMS.....	Organización mundial de la salud
P.....	Fosfoproteína
PAMPs .....	patrones moleculares asociados a patógenos
PCR .....	<i>polymerase chain reaction</i>
PIV3 .....	Virus parainfluenza 3
PIV5 .....	Virus parainfluenza 5
pb.....	Pares de bases
RABV.....	Virus de la rabia
RAP-PCR.....	<i>RNA arbitrarily primed PCR</i>
RdRp .....	ARN polimerasa dependiente de ARN
RNP.....	Ribonucleoproteína
SARS.....	<i>Severe acute respiratory syndrome</i>
SeV.....	Virus Sendai
SH .....	proteína pequeña hidrofóbica de membrana
SYNV .....	Virus del reticulado amarillo del Sonchus
TLR.....	<i>Toll-like receptors</i>
TM .....	región transmembrana
TMA.....	<i>transcription-mediated amplification</i>
VHSV.....	Virus de la septicemia hemorrágica viral
VLP.....	<i>virus-like particles</i>
VSV .....	Virus de la estomatitis vesicular

# ÍNDICE

---

Agradecimientos .....	vii
Abreviaturas.....	xi
Índice.....	xiii
Resumen .....	3
1 Introducción .....	7
1.1 Taxonomía y clasificación.....	8
1.2 Estructura y organización genómica .....	10
1.2.1 El complejo de la ribonucleoproteína .....	11
1.2.2 La proteína de la matriz (M).....	16
1.2.3 Las glicoproteínas de la envuelta .....	16
1.3 Ciclo replicativo viral .....	25
1.4 Manifestaciones clínicas.....	26
1.5 Patogenia e inmunidad .....	28
1.5.1 Estrategias de evasión del sistema inmune .....	32
1.6 Epidemiología y evolución del HMPV.....	34
1.6.1 Epidemiología molecular.....	34
1.6.2 Estacionalidad y prevalencia .....	35
1.6.3 Evolución del HMPV .....	36
1.7 Diagnóstico.....	37
1.8 Prevención y tratamiento.....	39

- 1.8.1 Vacunas ..... 39
- 1.8.2 Fármacos ..... 40
- 2 Hipótesis..... 45
- 3 Objetivos ..... 49
- 4 Publicaciones..... 53
  - 4.1 Estudio 1..... 53
  - 4.2 Estudio 2..... 61
- 5 Otras publicaciones ..... 73
  - 5.1 Estudio 3..... 73
- 6 Discusión ..... 105
- 7 Conclusiones..... 123
- 8 Bibliografía ..... 129
- 9 Anexos ..... 149
  - 9.1 Producción científica relacionada con la Tesis Doctoral ..... 149
    - 9.1.1 Artículos..... 149
    - 9.1.2 Comunicaciones orales..... 149
    - 9.1.3 Pósters..... 149
  - 9.2 Producción científica independiente de la Tesis Doctoral ..... 151
    - 9.2.1 Artículos..... 151
    - 9.2.2 Comunicaciones orales..... 153
    - 9.2.3 Pósters..... 154

# Resumen





## RESUMEN

---

El metapneumovirus humano (HMPV) es un importante agente etiológico de la infección respiratoria aguda en población pediátrica, aunque recientemente se ha descrito su alta incidencia también en la población adulta. Se ha observado un 100% de seroprevalencia del HMPV a partir de los 5 años, aunque las reinfecciones son comunes, probablemente debido a una inmunidad adquirida efímera. El HMPV se caracteriza por su alta diversidad genética, mayor incluso que en el virus respiratorio sincitial humano (HRSV), perteneciente a la misma familia. Además, este virus presenta una gran cantidad de estrategias de evasión del sistema inmune, abarcando diferentes vías de señalización para interrumpir la respuesta inmunitaria a diferentes niveles.

En esta Tesis Doctoral se realiza una descripción de la prevalencia, estacionalidad y diversidad genética del HMPV detectado en muestras de pacientes pediátricos y adultos en el hospital universitario Vall d'Hebron a lo largo de ocho temporadas, desde octubre de 2014 hasta diciembre de 2021. En este trabajo se realiza una descripción de la emergencia de nuevas variantes virales, cuya prevalencia aumenta hasta reemplazar los grupos genéticos circulantes al inicio del estudio, y se describen los cambios estructurales aportados por las mutaciones de las nuevas variantes. También se realiza una descripción del impacto clínico que tiene el HMPV en el paciente, concretando en las diferencias que presentan los pacientes afectados por estas variantes virales. Finalmente, se realiza un estudio evolutivo del genoma completo de este virus, pudiendo trazar la emergencia de estas variantes virales y estudiando las diferentes presiones selectivas a las que está sometido el virus.

Esta Tesis Doctoral remarca la importancia de llevar a cabo una monitorización de la infección por HMPV, donde la unión de los datos microbiológicos, epidemiológicos y clínicos permiten realizar una vigilancia virológica de la emergencia, impacto y evolución de nuevas variantes del HMPV.

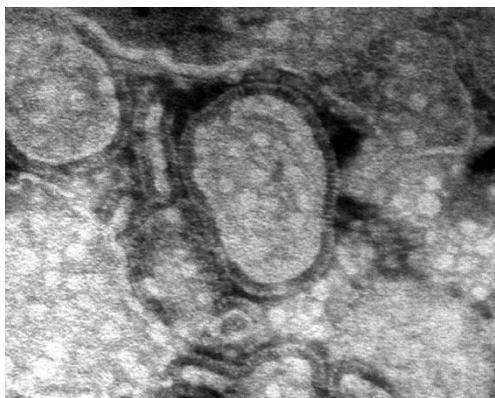


# Introducción



# 1 INTRODUCCIÓN

El año 2001, un virus desconocido fue aislado por un equipo de investigación holandés a partir de muestras respiratorias de 28 pacientes pediátricos con infección respiratoria. El virus aislado replicaba lentamente *in vitro* en cultivos de células terciarias de riñón de mono (tMK), causando efectos citopáticos indistinguibles de aquellos causados por el virus respiratorio sincitial humano (HRSV, por sus siglas en inglés, *human respiratory syncytial virus*), caracterizados por la formación de sincitios y posterior disrupción celular. Este efecto citopático apareció a los 10-14 días del primer inóculo, y al estudiar el sobrenadante por microscopía electrónica se observó la presencia de partículas pleomórficas *paramyxovirus-like* de 150-600 nm con pequeñas proyecciones de 13-17 nm en la envuelta (**Figura 1**). Se realizaron pruebas moleculares para confirmar la presencia del virus de la parainfluenza (HPIV) 1-4, el virus de la parotiditis, el virus del sarampión, HRSV, el simian virus 5, el virus Sendai y el virus de la enfermedad de NewCastle, siendo todas negativas. Se inocularon dos aislados del virus en hurones y cobayas y se analizó el suero de los animales post-inoculación mediante ensayos de seroneutralización e inmunofluorescencia para HPIV 1-4, HRSV y virus de la gripe A y B. Todos los ensayos obtuvieron resultados negativos, descartando que el virus aún sin identificar perteneciera a estas especies. Se enfrentó el suero de los hurones y cobayas a los 28 aislados en



**Figura 1.** Micrografía de partículas virales de HMPV. Imagen procedente Schildgen *et al.* Clin. Microbiol. Rev. 2011.

cultivo de células tMK, obteniendo un resultado positivo por inmunofluorescencia y comprobando de esta manera que los animales habían seroconvertido y que eran serológicamente compatibles. Dado que en los cultivos celulares no se pudo demostrar que hubiera hemoaglutinación y que la replicación viral era dependiente de la presencia de tripsina, característica propia de los orthomyxovirus, se dedujo que el nuevo virus debía pertenecer a la familia *Paramyxoviridae* (1).

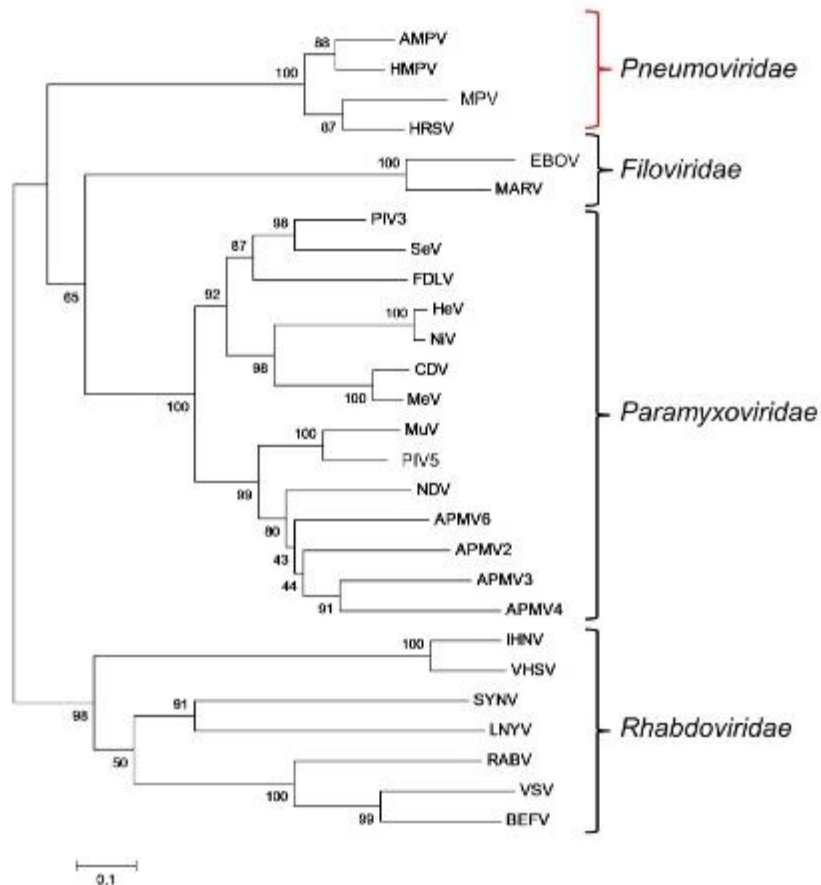
Fue posible la secuenciación parcial del genoma de este virus mediante una técnica llamada RAP-PCR (de sus siglas en inglés, *RNA arbitrarily primed PCR*), que consiste en la amplificación aleatoria de fragmentos del genoma y su posterior secuenciación. Estas secuencias presentaban una gran similitud con la del metapneumovirus aviar (AMPV), especialmente con el serotipo C, razón por la que llamaron a este nuevo virus **METAPNEUMOVIRUS HUMANO**

**(HMPV)** (1). En estudios serológicos realizados a partir de sueros recogidos y preservados desde los años 50 en diferentes países, confirmaron la presencia de anticuerpos neutralizantes contra este virus, demostrando que el HMPV había circulado durante décadas sin haberse podido detectar con los medios disponibles en el momento (1,2).

## 1.1 TAXONOMÍA Y CLASIFICACIÓN

Según el *International Committee on Taxonomy of Viruses* (ICTV, <https://ictv.global/taxonomy/>), el HMPV pertenece al dominio *Riboviria*, que incluye todos los virus cuyo genoma está compuesto por ácidos ribonucleicos (ARN); al reino *Orthornavirae*, que incluye los virus que contienen una ARN polimerasa dependiente de ARN (RdRp); al fílum *Negarnaviricota*, que incluye los virus de ARN monocatenario y polaridad negativa; al subfílum *Haploviricotina*; a la clase *Monjiviricetes*; al orden *Mononegavirales*; a la familia *Pneumoviridae*, junto al HRSV; y al género *Metapneumovirus*, junto al AMPV .

Hasta el año 2015, el HMPV y el HRSV pertenecían a la subfamilia *Pneumovirinae* dentro de la familia *Paramyxoviridae*, pero debido a la reconstrucción filogenética de las secuencias (Figura 2), la presencia de la proteína M2 (única para HMPV y HRSV) y las diferencias a nivel del complejo de la ribonucleoproteína, se establecieron como familia independiente de los paramyxovirus (3).

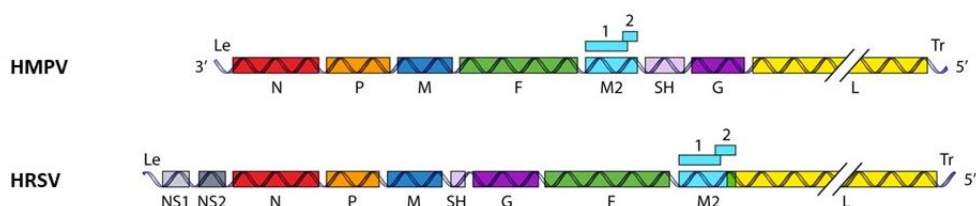


**Figura 2.** Árbol *neighbor-joining* de la región central de la polimerasa de los virus representativos del orden *Mononegavirales*. Los virus descritos en orden descendente son los siguientes: AMPV, HMPV, pneumovirus murino (MPV), HRSV, virus del Ébola (EBOV), virus Marburg (MARV), virus parainfluenza 3 (PIV3), virus Sendai (SeV), virus Fer-de-Lance (FDLV), virus Hendra (HeV), virus Nipah (NiV), virus canino distemper (CDV), virus del sarampión (MeV), virus de las paperas (MuV), virus parainfluenza 5 (PIV5), virus de la enfermedad de Newcastle (NDV), paramyxovirus aviar tipo 6 (APMV6), APMV2, APMV3, APMV4, virus de la necrosis hematopoyética infecciosa (IHNV), virus de la septicemia hemorrágica viral (VHSV), virus del reticulado amarillo del Sonchus (SYNV), virus de la necrosis amarilla de la lechuga (LNYV), virus de la rabia (RABV), virus de la estomatitis vesicular (VSV) y virus de la fiebre efimera bovina (BEFV). Imagen adaptada de Kuhn et al. ICTV, 2015.



## 1.2 ESTRUCTURA Y ORGANIZACIÓN GENÓMICA

La longitud del genoma de este virus varía según la variante viral, entre 13.280 y 13.378 pares de bases (pb), y contiene 8 genes que codifican para 9 proteínas. Estas proteínas, en orden 3'-5', son la nucleoproteína (N), la fosfoproteína (P), la proteína de la matriz (M), la proteína de fusión (F), las proteínas M2-1 y M2-2 (ambas codificadas por el gen M2), la proteína SH, la glicoproteína (G) y la polimerasa (L). Estas proteínas son muy similares a las del HRSV (**Figura 3**), con la diferencia de que el HMPV carece de las proteínas no estructurales NS1 y NS2 del HRSV (4).

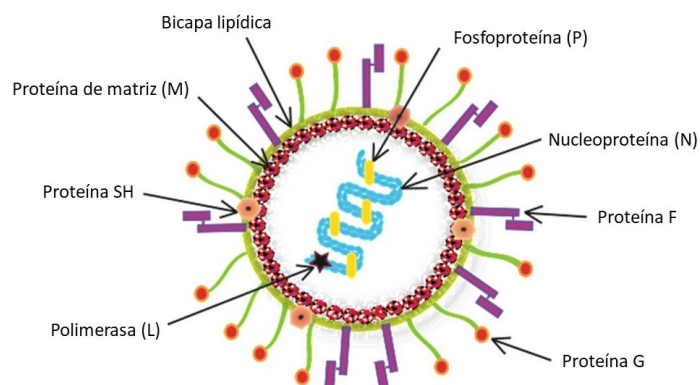


**Figura 3. Comparación de la organización del genoma de HMPV y HRSV.** Imagen adaptada de Shildgen *et al.* Clin. Microbiol. Rev. 2011.

El genoma de HMPV contiene también regiones no codificantes entre los genes, llamadas regiones intergénicas. Estas regiones varían en tamaño y secuencia, y van desde los 23 hasta los 209 nucleótidos (5). A modo de curiosidad, estas regiones intergénicas no guardan ninguna similitud con el HRSV o con su antecesor aviar.

Finalmente, hay dos regiones extragénicas en los extremos 3' y 5' del genoma de HMPV, llamadas secuencias líder y tráiler, respectivamente. Los primeros 12 nucleótidos de la secuencia líder y los últimos 12 nucleótidos de la secuencia tráiler son complementarios, y esto se debe probablemente a que contienen elementos básicos del promotor viral. La secuencia líder consiste en 41 nucleótidos, cuya región central es similar a la del AMPV; la secuencia tráiler consiste en los 179 nucleótidos que hay tras el codón stop de la polimerasa (5).

Los viriones de HMPV son partículas pleomórficas que tienen una envuelta de bicapa lipídica alrededor de la proteína de la matriz, en la cual se encuentran ancladas las tres glicoproteínas de superficie: la proteína de fusión (F), la glicoproteína de adhesión (G) y la proteína pequeña hidrofóbica de membrana (SH) (**Figura 4**).



**Figura 4. Virión de HMPV.** Imagen adaptada de Cheemarla et al. *Pathogens*, 2015.

### 1.2.1 El complejo de la ribonucleoproteína

Dentro de la partícula vírica, se encuentra el complejo de la ribonucleoproteína (RNP), que consiste en la proteína N, P, L, M2-1 y el genoma de naturaleza ARN no segmentado, de una sola cadena y de polaridad negativa (4).

#### 1.2.1.1 La nucleoproteína (N)

La proteína N es la única responsable de envainar y proteger el genoma del HMPV de las RNAsas. Esta proteína cubre de manera homo-oligomerizada el ARN genómico del virus, formando ribonucleocápsides helicoidales y flexibles, también conocido como nucleocápside (6). Para ello, las proteínas N se ensamblan entre ellas a través de los dominios N- y C-terminal, que se encuentran a ambos lados de la proteína. El ARN del virus queda unido por cargas positivas firmemente a una hendidura que hay entre los dominios N- y C-terminal en grupos de 7 nucleótidos, tal como se ha descrito para el HRSV y al contrario que en lo observado en los virus de la familia *Paramyxoviridae* (7).

La proteína N presenta dos conformaciones que se alternan con una movilidad de tipo bisagra. La conformación N<sub>0</sub>, que siempre está unida a la proteína P en el extremo C-terminal, es aquella en la que la proteína N aún no se ha unido al ARN viral, y la alanina de la posición 254 está siendo estabilizada por la treonina de la 257 y una interacción con la treonina de la 175,

manteniendo una conformación helicoidal. Cuando el ARN genómico se une, la treonina de la posición 257 contacta la cadena del genoma en vez de estabilizar la alanina 254, y la forma helicoidal de la bisagra se pierde, ganando flexibilidad y a su vez, permitiendo el movimiento de los extremos N- y la C-terminal (7).

El extremo C-terminal juega un papel importante en la oligomerización de las proteínas N. Una vez unida la proteína N al ARN viral, y por lo tanto en su segunda conformación, se extiende el extremo C-terminal hacia el siguiente protómero de proteína N, aún unida a la P. El extremo C-terminal de la primera proteína N desplaza a la proteína P de la segunda proteína N, secuestrando su extremo y uniéndola al oligómero de N. Este proceso se lleva a cabo a medida que va replicando el ARN, de manera concomitante (7).

### 1.2.1.2 La fosfoproteína (P)

La proteína P es el cofactor esencial de la polimerasa. Esta proteína, que contiene largas regiones de desorden intrínseco, tiene varias funciones e interactúa con diversos componentes del complejo de replicación viral. Se diferencian tres regiones: la N-terminal, asociada a la unión del ARN viral y la N<sub>0</sub>, la C-terminal, asociada al complejo ARN-N ya unido, y el módulo de tetramerización central. El tetrámero P tiene grandes dimensiones y una gran flexibilidad, factores que le permiten realizar sus funciones relacionadas con la replicación y transcripción viral, que requieren de la unión simultánea de la N<sub>0</sub>, de la proteína M2-1, de la polimerasa L y de la nucleocápside (8,9).

La región N-terminal de la proteína P parece ser un MoRE (*α-helical molecular recognition element*), y es muy similar a los descritos para otros virus de las familias *Paramyxoviridae* o *Rhabdoviridae* (10). Esta región actúa como una chaperona de la proteína N<sub>0</sub>, manteniéndola en

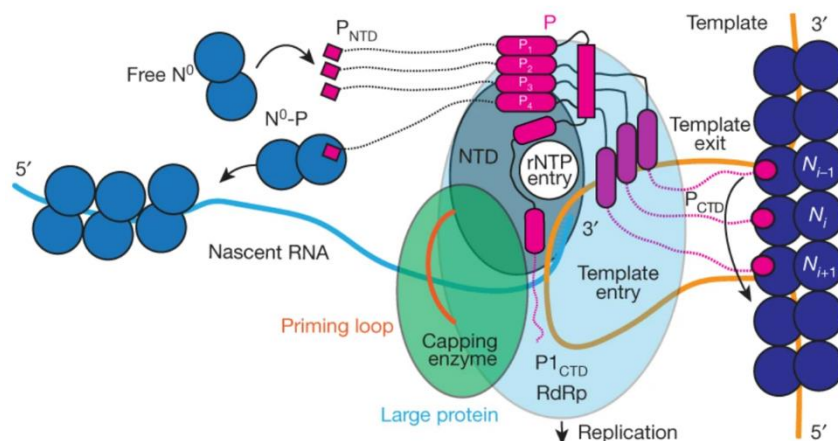


Figura 5. Modelo de conformación que adquiriría la proteína P en forma de tetrámero anclada a la proteína L. Imagen original de Pan *et al.* Nature, 2020.

un estado libre de unión a ARN previo al ensamblaje de la nucleocápside (9). Este paso es importante para el virus, ya que impide que la proteína  $N_0$  se una a los ácidos nucleicos de la célula huésped, manteniendo un *pool* de  $N_0$  como reserva. La región comprendida entre los aminoácidos 135-158 corresponde al sitio de unión con el factor de procesividad M2-1. Las proteínas P y M2-1 forman un complejo extendido no globular impreciso, en el que, aun formando una sola estructura, ambas proteínas mantienen su flexibilidad. En el extremo C-terminal, se encuentra el sitio de unión a la proteína N secundario, cuya función se sugiere que es acercar las proteínas N y L para facilitar la síntesis de ARN (8). La región central de la proteína P es menos desordenada, y forma un tetramero de proteínas P muy estable (10). Esta región tetramérica permanece anclada a la proteína L tal y como se observa en la **Figura 5**. Desde esta posición, es capaz de adoptar estructuras asimétricas que permitirían que cada uno de los extremos de las 4 proteínas P tuvieran una conformación diferente (8,9).

### 1.2.1.3 Las proteínas M2

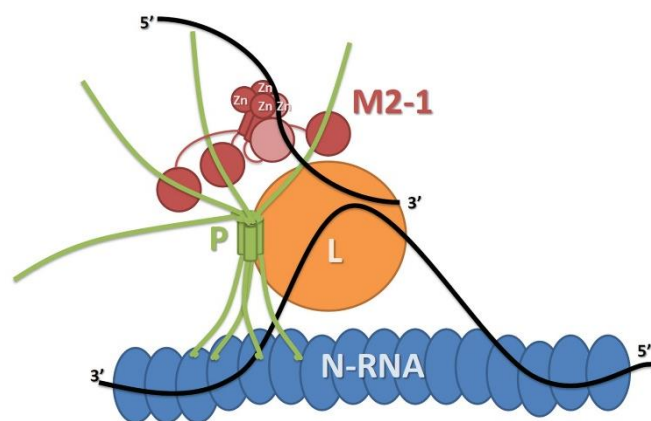
El gen M2 tiene dos pautas de lectura abiertas presentes únicamente en la familia *Pneumoviridae*, que codifican para las proteínas M2-1, de 187 aminoácidos, y M2-2, de 71 aminoácidos. Ambas han demostrado ser imprescindibles en experimentos *in vivo*, donde se ha observado una gran atenuación de la replicación viral (11), especialmente con la proteína M2-2 (12).

La proteína M2-1 actúa como un antiterminador de transcripción y factor de procesividad, previniendo la terminación transcripcional prematura de ARNm largos y mejorando la síntesis de ARNm largos policistrónicos. También participa en el tránsito del ARNm post-transcripcional y la acumulación de ARNm virales en orgánulos sin membrana, previa liberación de éstos al citosol para su traducción. También se ha asociado al ensamblaje de la partícula viral, mediando interacciones entre la N y la M. En HRSV se ha visto que también tiene un rol en la morfogénesis del virión, pues forma una capa entre M y N. Para poder llevar a cabo este amplio abanico de funciones, es necesario que haya cambios conformacionales, que pueden darse por modificaciones post-traduccionales, interacciones o cambios ambientales, como estrés oxidativo o cambios de pH (13,14).

Esta proteína forma tetrameros con tres regiones diferenciadas: el extremo N-terminal, que tienen un dominio de unión al ion  $Zn^{2+}$  (residuos 1-30), la hélice de tetramerización (residuos 31-52) y el dominio central (residuos 66-170). Los residuos 53-65 corresponden a una secuencia *linker* que conecta el dominio central y la hélice de tetramerización (13,14). La unión de  $Zn^{2+}$  al

motivo CCCH del extremo N-terminal es reversible, lo que permite el cambio conformacional necesario para llevar a cabo funciones diferentes. Además, el M2-1 puede formar oligómeros mayores, relacionado con la morfogénesis del virión (13).

El ARN se une al dominio central, cuyas dimensiones le permiten la unión de secuencias de 12-13 nucleótidos, especialmente GE y colas poliA, y se estabiliza mediante interacciones entre fosfatos y residuos cargados positivamente, y esta unión provoca que el tetrámero adopte una conformación cerrada (14). En esta conformación, previene la terminación transcripcional prematura y aumenta la síntesis de ARNm policistrónicos (**Figura 6**).



**Figura 6. Modelo de reconocimiento del ARNm viral por M2-1 junto al complejo de transcripción viral de HMPV.** Imagen adaptada de Leyrat *et al.* eLife 2014.

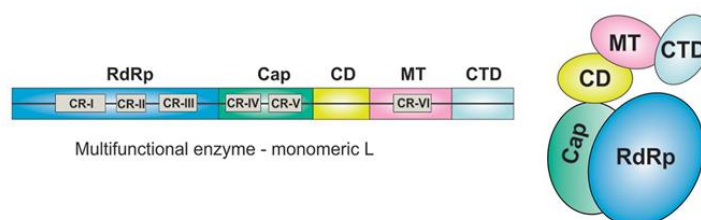
La proteína M2-2 juega un papel importante en la replicación y transcripción viral y en la evasión del sistema inmune. Aunque se desconoce el mecanismo por el cual está implicada en el ciclo viral, experimentos *in vitro* demostraron que la titulación viral de cepas  $\Delta$ M2-2 era muy inferior a aquella de cepas sin deleciones. También se encontraron diferencias a nivel de expresión proteica, indicando un rol de esta proteína en la transcripción viral (15). Cultivos infectados con la cepa  $\Delta$ M2-2 probaron producir más citocinas y quimiocinas, demostrando que la proteína M2-2 juega un papel en la regulación de la señalización antiviral celular (16,17) Se ha descrito que los aminoácidos 1-25 de esta proteína son los implicados en la replicación viral, mientras que los 26-69 son los que evaden el sistema inmune (18).

#### 1.2.1.4 La polimerasa (L)

La proteína L es una enzima multifuncional transcrita en un solo polipéptido de 2005 aminoácidos (19). La proteína L, con ayuda del cofactor P y de la proteína M2-2, realiza la

replicación y la transcripción del genoma, funciones que incluyen la polimerización del RNA, adición de la caperuza 5', la metilación de esta caperuza, poliadenilación del extremo 3' y replicación del genoma viral (9,19).

Esta proteína se divide en 5 dominios según su función (**Figura 7**), llamados dominio RdRp (ARN polimerasa dependiente de ARN, aminoácidos 1-903), dominio de caperuza (aminoácidos 904-1381), dominio conector (aminoácidos 1382-1599), dominio de la metil-transferasa (aminoácidos 1600-1884) y dominio C-terminal (aminoácidos 1885-2005). Además, esta proteína está muy conservada en todos los Mononegavirales, en especial 6 regiones llamadas CR (*conserved region*)-I a CR-VI, que se encuentran repartidas entre los dominios RdRp, el dominio caperuza y el dominio metil-transferasa (19), y se ha observado que algunas mutaciones pueden inhibir las funciones de la polimerasa (20).



**Figura 7. Representación de los dominios de la proteína L.** Las regiones conservadas (CR) están representadas en rectángulos grises, el dominio de la polimerización de ARN dependiente de ARN (RdRp) es el dominio azul, el dominio de cobertura (Cap) es el verde, el dominio conector (CD) es el amarillo, el dominio metil-transferasa es el rosa y el dominio C-terminal (CTD) es el azul claro. Imagen original de Liang, Journal of Virology, 2020.

Las actividades enzimáticas de la proteína L están coordinadas, de manera que el transcrito de ARNm naciente es sintetizado y modificado durante varias etapas diferenciadas. Una vez el transcrito de ARNm alcanza una longitud determinada, se forma la estructura llamada caperuza en el extremo 5'. Esta caperuza consiste en la adición de una guanosina al primer nucleótido del ARN naciente mediante un puente trifosfato 5'-5'. Acto seguido se produce la metilación del segundo oxígeno del primer nucleótido del ARNm y del séptimo nitrógeno de la guanina de la caperuza. De esta manera, el ARNm es protegido de la actividad exonucleasa celular. La proteína L continúa la elongación de este ARNm hasta que encuentra la secuencia terminal de, momento en que sintetiza una cola poli(A) en el extremo 3' y libera el ARNm (9,19).

### 1.2.2 La proteína de la matriz (M)

La proteína M es la coordinadora del ensamblaje de los viriones. Se asocia a la membrana de la célula desde el interior mediante la interacción con las colas citoplasmáticas de las glicoproteínas virales, y forma la partícula viral final tras interactuar con el complejo de la ribonucleoproteína (21,22). La proteína M forma dímeros que se estabilizan mediante la interacción de iones  $Ca^{2+}$ , que parecen ser indispensables. Cada subunidad del dímero está compuesta de un extremo N-terminal (aminoácidos 1-123), un extremo C-terminal (aminoácidos 137-254) y una región *linker* (aminoácidos 123-137). La región N-terminal presenta un sitio de unión al calcio con forma de bolsillo, y los aminoácidos implicados son Glu24, Asp26, Leu28 y Lys101. Los dímeros se ensamblan en lípidos, formando estructuras complejas mediante interacciones con otros dímeros de M (22).

### 1.2.3 Las glicoproteínas de la envuelta

#### 1.2.3.1 La proteína pequeña hidrofóbica (SH)

La proteína SH es una glicoproteína transmembrana integral de tipo II de 179 aminoácidos. Esta proteína puede tener hasta tres formas de glicosilación diferentes: sin glicosilaciones, con N-glicosilaciones y altamente glicosilada. Aún no se conoce bien la función de esta proteína, de hecho, hay estudios que la consideran una proteína accesoria porque el virus sigue siendo viable sin el gen que la codifica *in vitro* (12,23), aunque *in vivo* se ha observado que los niveles de infección son menores. Hay estudios que apuntan a que tiene varias funciones, tanto a nivel estructural como no estructural (24).

Una función de esta proteína es actuar como una viroporina. Las viroporinas son proteínas generalmente pequeñas e hidrofóbicas con uno o más dominios transmembrana que oligomerizan para poder formar canales y, por tanto, permeabilizar la membrana para permitir el paso de iones o pequeñas moléculas. La proteína SH forma octámeros cuyos protómeros están simétricamente distribuidos, formando un canal en el centro. Se ha demostrado que la presencia de esta proteína *in vitro* aumenta la permeabilización de la membrana de la célula huésped y de sus orgánulos celulares, evidenciando que se trata de una viroporina, aunque el rol que juega esta viroporina en el ciclo viral aún es desconocido. Por otra parte, parece que esta permeabilización necesita una modulación, ya que el número de proteínas SH incorporadas al virión es muy bajo en comparación a las otras glicoproteínas de HMPV (24).

Otra función principal de esta proteína es la regulación y evasión de la respuesta inmune innata y adaptativa del hospedador, función que realiza desde varias perspectivas. Por una parte, esta proteína afecta a la producción de IFN de al menos dos maneras. La proteína SH inhibe la señalización TLR7/MyD88/TRAF6 en células dendríticas plasmacitoides mediante su unión a TRAF6, inhibiendo la secreción de IFN (25). También disminuye la señalización de la vía de IFN impidiendo la fosforilación del receptor STAT1, disminuyendo la expresión de IFN- $\alpha$  y IFN- $\gamma$  (26). Finalmente, también regula la respuesta inmune del hospedador en las células epiteliales mediante la modulación de NF- $\kappa$ B. La proteína SH inhibe la fosforilación de p65, factor necesario para la expresión de citocinas y quimiocinas, modulando así la actividad transcripcional de NF- $\kappa$ B (27). Además, la proteína SH, junto a la proteína G, inhibe la macropinocitosis de las células dendríticas, reduciendo así la ingesta de antígenos del virus por parte de las células y consecuentemente, su presentación. Al evitar o disminuir la presentación de antígeno por parte de las células dendríticas, se limita la proliferación de células T CD4 y por tanto, se restringe la respuesta polarizada Th1 (28).

Recientemente, un estudio describió otra función para esta proteína. Este estudio evidenciaba que la proteína SH era una activadora del inflamasoma NLRP3, provocando la maduración de IL-1 $\beta$ . Esta citocina tiene un papel importante en procesos inflamatorios, y se ha comprobado que éstos son importantes para la patogenia de este virus (29).

### 1.2.3.2 La proteína de adhesión (G)

La proteína G es una glicoproteína transmembrana de tipo II, y tiene 219-236 aminoácidos (5,30). Aún se desconoce la función principal de esta proteína, ya que, aunque en un inicio se postuló que era la que permitía la adhesión a un receptor celular para iniciar la fusión y consecuentemente, la infección, se demostró en diversos estudios que la ausencia de la misma no afectaba a la replicación *in vitro* (23), aunque sí atenuaba la infección *in vivo* (12). Dado que esta proteína siempre se encuentra en el virus de manera natural (23), la proteína G podría estar confiriendo una ventaja para la adhesión en algunos tejidos fortaleciendo la unión del virus a la membrana o concentrando viriones (4,31); o bien podría tener algún papel en la evasión del sistema inmune (32,33).

Otra función que se ha comprobado que lleva a cabo esta proteína es la inhibición de IFN- $\alpha$  y el reclutamiento de neutrófilos en los espacios alveolares, relacionado con el incremento de los niveles de TNF, IL-17 y otras citocinas proinflamatorias y quimioatrayentes de neutrófilos. Esta infiltración de neutrófilos en el sistema respiratorio también se ha visto en otros virus como



HRSV o el virus de la gripe A (34). También se ha observado que esta proteína, junto con la proteína SH, reduce la internalización del virus por células dendríticas, reduciendo así la activación y proliferación de células T CD4+ (28).

La proteína G es la más variable de todo el genoma. De hecho, uno de los primeros estudios de HMPV comprobó que la proteína G variaba hasta un 33% entre los diferentes grupos de HMPV (30), porcentaje muy similar a la divergencia que hay entre proteínas F de HMPV y HRSV (35). La región N-terminal de la proteína contiene la región citoplasmática (aminoácidos 1-30) y el dominio transmembrana (aminoácidos 31-51). Las tres cuartas partes de la proteína desde la C-terminal correspondería a la región extracelular (12,36). Esta proteína tiene un gran contenido de serinas y treoninas, que son aceptores potenciales de O-glicosilaciones, entre 3-6 lugares de N-glicosilación y una gran cantidad de residuos de prolina, ambas características indicadoras de que se trata de una proteína similar a una mucina altamente glicosilada (4,5,36,37). El tamaño de la proteína G en Western Blot resultó ser hasta 4 veces mayor de la esperada por su composición aminoacídica, por lo que se sugiere que es una proteína altamente glicosilada. En el mismo estudio se observó que la proteína G era muy sensible a la tripsina presente en el medio en varios puntos de su estructura, por lo que se propuso que esta proteína probablemente presentaba una estructura no globular, extendida y expuesta (12). Estudios *in silico* del ectodominio demostraron que se trataba de una proteína elongada y desordenada, con una gran cantidad de conformaciones diferentes que le permitían sobresalir entre 10 y 25 nm por encima de la superficie celular. Dado que la proteína G siempre co-localiza con la proteína F, probablemente formando un complejo proteico (38), se propuso un modelo de evasión del sistema inmune donde la proteína G actuaba como un escudo para la proteína F (**Figura 8**), impidiendo el acceso de los anticuerpos monoclonales a ella. Esta hipótesis se ve respaldada por la hipervariabilidad de esta proteína, especialmente en la región C-terminal; el desorden intrínseco que tiene y el alto número de glicosilaciones (37).

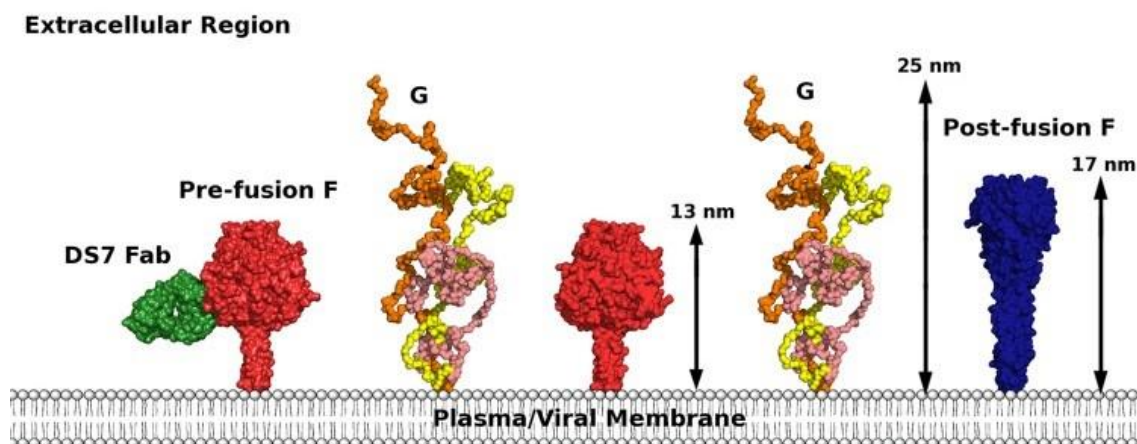


Figura 8. Esquema comparativo de los tamaños de las dos proteínas de membrana F y G. Aparece representado el anticuerpo monoclonal DS7, mostrando la posibilidad de enmascarar este epítipo. Imagen adaptada de Leyrat, JVI 2014

Se han detectado diversos puntos en la proteína donde actúa una selección positiva. Este es un fenómeno extraño, dado que la selección positiva suele darse por fuerzas del sistema inmune, y esta proteína no parece ser diana de anticuerpos neutralizantes (4,12,39,40). Este hecho sugiere que la proteína no tiene un papel como epítipo antigénico pero sí como evasora de la respuesta inmune (41).

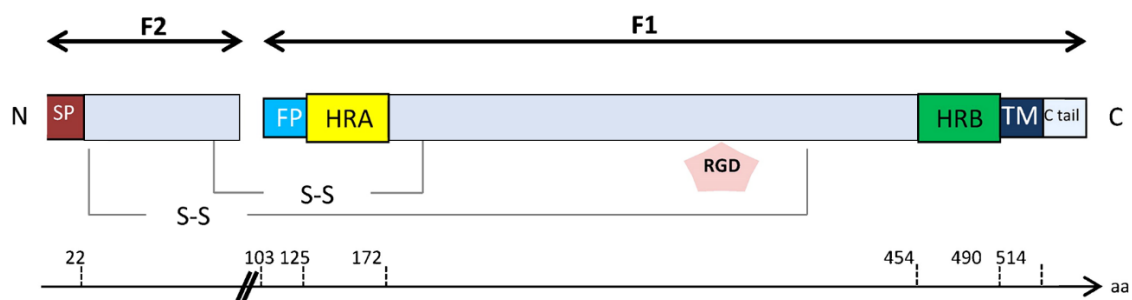
### 1.2.3.3 La proteína de fusión (F)

La proteína F es una glicoproteína de fusión de clase I homotrimérica de 539 aminoácidos, y la encargada de fusionar la membrana viral con la membrana de la célula huésped para liberar el genoma y el complejo de replicación en el interior del citoplasma, pudiendo iniciar así la replicación viral (42,43). Esta proteína también puede realizar la fusión de la célula infectada y una célula adyacente, formando sincitios (células gigantes multinucleadas). A diferencia de los paramyxovirus, que requieren de la proteína de adhesión junto a la F para poder fusionar las membranas (31), los pneumovirus pueden realizar la fusión con tan solo la proteína F. De hecho, se ha demostrado en varios estudios que la proteína F, en ausencia de la proteína de adhesión, puede realizar el reconocimiento del receptor celular y la fusión (23), pudiendo el HMPV replicar eficientemente, aunque estas cepas *in vivo* se vean atenuadas (12).

Dado que el virus sin proteína de adhesión puede replicar de manera eficiente *in vitro* (32), se sugiere que la proteína F de HMPV se activa para realizar la fusión mediante factores ambientales y del huésped aún desconocidos (44). Para ello, la proteína F debe poder reconocer receptores celulares para realizar la adhesión y posteriormente, la fusión de membranas. El modelo que se ha propuesto entre varios estudios consiste en un primer reconocimiento del glucosaminoglicano (GAG) heparán sulfato como receptor celular (32,35), tras la unión al cual el

virus reconocería otros coreceptores como las integrinas  $\alpha V\beta 1$ ,  $\alpha 5\beta 1$  u otras  $\alpha V$ -integrinas. Estas integrinas se unirían a los aminoácidos arginina-glicina-aspartato (RGD) de las posiciones 329-331 de la proteína F, región conservada en todas las cepas de HMPV caracterizadas hasta la fecha (31). La integrina  $\alpha V\beta 1$  es un factor mayor promoviendo la infección de HMPV. El motivo RGD parece estar al descubierto solo en la conformación post-fusión de la proteína, por lo que podría interactuar con la integrina a partir de este estado intermedio de fusión, disparando una cascada de señalización que aumentara la permisividad de la célula a la infección (32). Aunque este es un fenómeno extraño para proteínas de fusión de clase I, sí se ha visto para proteínas de fusión de tipo III, como la de VSV-G (45).

Esta proteína se sintetiza como un precursor inactivo llamado  $F_0$ , que es escindido proteolíticamente por proteasas aún desconocidas similares a la tripsina en el espacio extracelular, dando lugar al heterodímero formado por las subunidades  $F_1$  y  $F_2$ , que se mantienen unidas covalentemente por dos puentes disulfuro entre residuos de cisteína (42,43,46). Cada una de las dos subunidades comprende varios dominios funcionales, como se observa en la **Figura 9**.

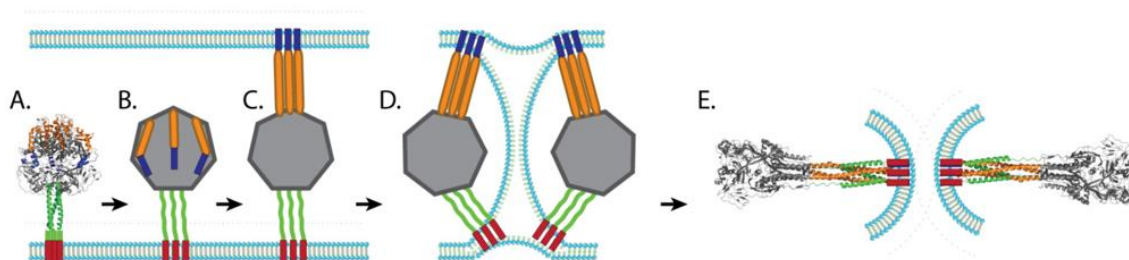


**Figura 9. Esquema representativo de la estructura de la proteína F.** En la región F2 se encuentra el péptido señal (SP) y en la región F1 se encuentran el péptido de fusión (FP), las regiones de repeticiones heptádicas HRA y HRB, el dominio transmembrana (TM) y el dominio citoplasmático (C tail). Los aminoácidos RGD donde se une el receptor celular está representado por un pentágono rosa. Imagen original de Feuillet *et al.* Journal of Clinical Virology, 2012.

La subunidad  $F_1$  contiene el péptido hidrofóbico de fusión (FP), que se inserta en la membrana de la célula huésped para iniciar la fusión de ambas membranas; dos regiones de repeticiones heptádicas denominadas HRA y HRB, que están implicadas en el correcto plegamiento de la proteína en el cambio de conformación pre-fusión a post-fusión; la región transmembrana (TM) y la cola citoplasmática (C-tail). La subunidad  $F_2$  comprende el péptido señal (SP) en el extremo N-terminal (31,43).

La proteína F madura es un trímero de los heterodímeros  $F_1+F_2$  unidos a su vez por puentes disulfuro, que es incorporada a las membranas celulares y posteriormente a los viriones en una conformación metaestable llamada pre-fusión. Durante la fusión de membranas del

virión y de la célula hospedadora, esta glicoproteína cambia a la conformación post-fusión (45). Durante el cambio de conformación de pre- a post-fusión, las regiones HRA y HRB forman cada una tres hélices superenrolladas, y en el extremo N-terminal de la HRA se encuentra el péptido fusión, que se inserta en la membrana de la célula diana, quedándose en una conformación inestable denominada “pre-hairpin” (**Figura 10**). Posteriormente, las regiones HRA y HRB se reorganizan, acercándose las seis hélices y formando un poro entre la membrana de la célula y la del virión. Esta conformación post-fusión de las seis hélices unidas formando el canal es muy estable e irreversible (31,46,47).



**Figura 10.** Modelo de fusión de membranas mediado por la proteína F de HMPV. Imagen original de Chang and Dutch, *Viruses*, 2012.

El péptido de fusión se encuentra en el interior del trímero, y la región N-terminal parece estar en un bolsillo protomérico bloqueado por 456F en HRB. Esta conformación pre-fusión sugiere que es necesario desestabilizar la proteína antes de la liberación del péptido fusión y del desdoblamiento a la conformación post-fusión, mucho más estable. En HRSV, la posición interna de este péptido fusión resulta en una región con un gran potencial para bloquear la infección mediante pequeñas moléculas inhibitoras de fusión, cuya función es aumentar la estabilidad de la forma pre-fusión encadenando el péptido fusión y la región HRB. La gran similitud estructural con la proteína pre-fusión de HRSV sugiere que esta estrategia también pueda utilizarse en HMPV (45).

Otra característica de la forma pre-fusión es la presencia de una región que actúa a modo de sensor de pH, que debe disociarse para la formación de la estructura post-fusión. La protonación de la H435 sería la responsable de la desestabilización local de la proteína para poder realizar el cambio conformacional, pero también podría llevar a la desestabilización global (45). Aunque todas las cepas llevan los residuos correspondientes al sensor de pH (Lys20, Glu433, His435), solo algunas cepas son sensibles al pH (Gly294, Lys296, Trp396 y Asn404) (45,48–50). De hecho, en la posición 294 se ha visto que hay selección positiva restringida a los aminoácidos G, K y E. La presencia de G y K condiciona al virus a requerir un pH bajo para poder realizar la fusión, mientras que la E permitiría al virus realizarla a pH neutro (51). Por otra parte,

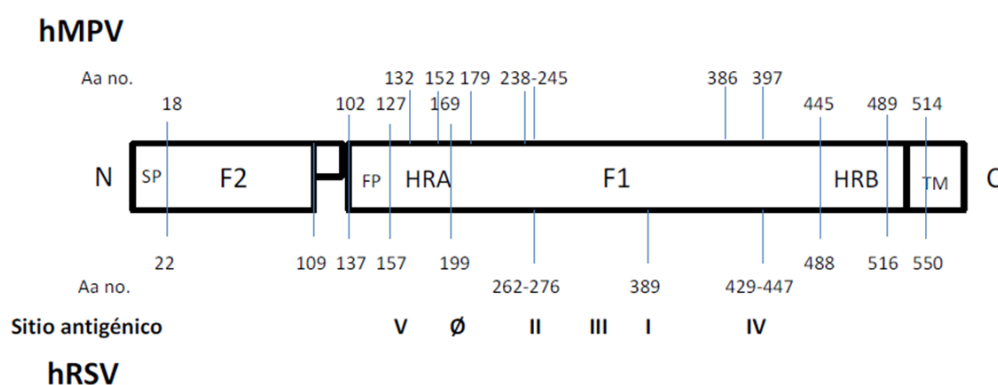
un cambio por una histidina en la posición 434 provoca un fenotipo hiperfusogénico, por lo que se sugiere que este cambio contribuye a la fusión mediada por pH bajo a través de un mecanismo similar a la H 435, que se ha propuesto que tras protonarse, desestabiliza la forma pre-fusión para iniciar el doblamiento a la forma post-fusión. De hecho, es necesaria la desestabilización de la HRB para comenzar el desdoblamiento hacia la conformación post-fusión. Se requieren más factores de la célula huésped para la fusión de algunas cepas de HMPV para escapar del endosoma e iniciar la infección, y parece que este factor no se encuentra presente en la superficie de la célula (51). K438 también podría tener un rol en el aumento de la actividad de fusión, debido a la proximidad de este residuo a los aminoácidos de las posiciones 434 y 435. H434 no suele estar presente, por lo que parecería que la hiperfusogenicidad no beneficiaría el virus, aunque se ha visto que esta mutación le confiere la evasión del anticuerpo monoclonal neutralizante 54G10, por lo que parece que esta mutación introduce cambios estructurales ventajosos (51)

Otros estudios señalan que el HMPV, como el HRSV y otros virus con envuelta, tendría diversas maneras de entrar e infectar las células, y estas diferentes vías de entrada podrían utilizarse de forma simultánea. De esta forma, al inhibirse una de las vías, se incrementaría la entrada por una vía alternativa, y así el virus podría completar el ciclo de infección (52,53). Se ha observado que la adhesión de la proteína F a integrinas a través de su dominio RGD provoca una endocitosis mediada por clatrina. Aún se desconoce por qué HMPV necesita esta internalización para llevar a cabo la infección, ya que suele darse en virus que requieren un pH bajo para hacer la fusión y este fenómeno se ha visto en un número muy bajo de cepas de HMPV. Es posible que HMPV necesite algún constituyente iónico o proteasa presente en los endosomas para poder empezar el cambio conformacional de la proteína F, pero aún está por demostrar (52). Aunque tanto la vía de entrada por endocitosis mediada por clatrina como la vía de entrada mediante la fusión directa en la membrana celular han sido demostradas, se desconoce cuál sería la principal, ya que parece que cambia según el tipo de célula infectada (52,53).

La proteína F de HMPV es la única proteína de superficie diana de anticuerpos neutralizantes; aunque las proteínas G y SH son también inmunogénicas, no se han detectado anticuerpos neutralizantes contra ellas. La proteína G induce una respuesta humoral muy débil, mientras que la de la proteína SH es indetectable. Esto difiere de la respuesta inducida por virus relacionados con HMPV, como por ejemplo HRSV, cuya respuesta humoral contra la proteína G produce un nivel significativo de anticuerpos neutralizantes y resulta protectora ante una segunda infección por HRSV, atenuando la sintomatología; o como HPIV3, cuya respuesta contra

la hemaglutinina, proteína análoga a G, es más protectora que la inducida por la proteína F del virus. Esta diferencia en inducir la creación de anticuerpos podría ser debido a los diferentes patrones de glicosilación que tienen estas proteínas, dado que las proteínas SH y G son altamente glicosiladas en comparación a F (40). Aun así, la proteína F está glicosilada en las asparaginas de las posiciones 57, 172 y 353, y las dos últimas han demostrado ser imprescindibles para el correcto plegamiento y consecuente función de la proteína (31). Estas glicosilaciones se encuentran en el ápex de la conformación pre-fusión de HMPV, y parece ocultar los epítomos al sistema inmune (45).

Aquellas regiones antigénicas asociadas a una mayor capacidad de neutralización frente a HMPV son las reconocidas por los anticuerpos tanto en conformación pre- como post-fusión. Además, la administración de una vacuna basada en proteína F estabilizada en conformación pre-fusión demostró la producción del mismo título de anticuerpos neutralizantes que la estabilizada en la conformación de post-fusión. En HRSV se da una mejor respuesta ante la conformación pre-fusión, y este cambio puede deberse a las glicosilaciones que tiene la proteína F de HMPV, que parece que forman un escudo de glicanos donde estaría el equivalente al lugar antigénico  $\emptyset$  (54,55). Aunque a nivel aminoacídico tan solo hay un 38% de similitud entre los ectodominios de las proteínas F de HRSV y HMPV, tanto la estructura pre-fusión como la estructura post-fusión son muy similares, por lo que parte del conocimiento sobre sitios antigénicos que se tiene del HRSV puede extrapolarse a HMPV (**Figura 11**) (46).



**Figura 11. Representación esquemática de la estructura primaria de las proteínas F de HMPV y HRSV y la localización de sus epítomos.** Los números hacen referencia a las posiciones aminoacídicas donde se han encontrado mutaciones que escapan al reconocimiento de anticuerpos. Imagen adaptada de la tesis doctoral del Dr. Eduardo Olmedillas, Universidad Autónoma de Madrid, 2017.

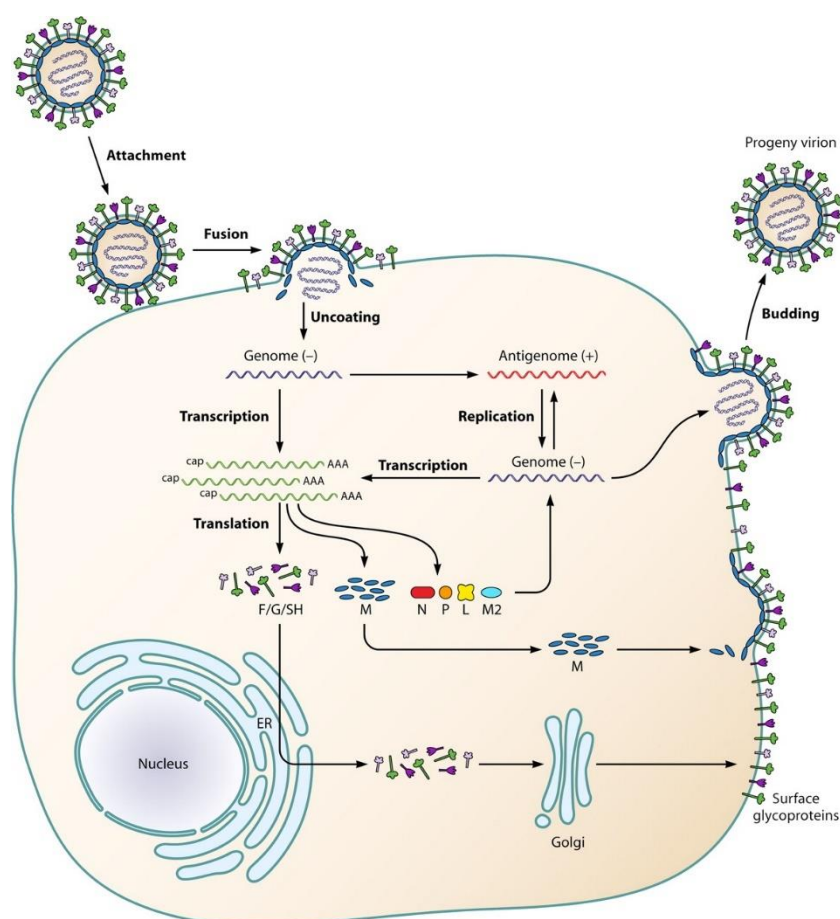
En la literatura se utilizan dos nomenclaturas diferentes para referirse a los sitios antigénicos de HMPV. Una primera corriente continua lo publicado por Ulbrandt donde se describen los sitios 1-6 (56–58), mientras que otras aproximaciones, dado que se comparan los sitios antigénicos de HRSV con los de HMPV, denominan a los sitios antigénicos análogos con el

mismo nombre. Para esta tesis, se ha decidido seguir esta segunda nomenclatura para mayor facilidad en la comparación. Los sitios antigénicos III, IV y el V son análogos a los lugares antigénicos III, IV y V de HRSV, y hay anticuerpos con diana en estos epítomos capaces de neutralizar ambos virus (54,55). Los aminoácidos críticos para la unión de los anticuerpos son los siguientes: I266, K271, G307, V308 e I309 para el lugar antigénico III, G430, I431 e I432 para el lugar antigénico IV y E163, A170, K176, K201 y D263 para el lugar antigénico V (55). El lugar antigénico IV de HMPV está preservado en ambas conformaciones de la proteína F y comprende los aminoácidos 391-409, cuyos aminoácidos 398-401 (GIHK) son idénticos a los 430-433 de HRSV, que se sugiere sea la razón por la que este lugar antigénico tiene reacción cruzada entre ambos virus (59). Se ha descrito otro epítomo localizado en la cabeza de la proteína y denominado DS7, que también se encuentra conservado en el HRSV, y comprende los aminoácidos 19-26, 31, 33, 34, 282-284, 312, 317, 345, 348, 349, 351-353, 356, 378, 411, 413 y 414 (60). Recientemente se ha descrito un nuevo epítomo en la región F2, en la cadena alfa hélice de los aminoácidos 66-87. Esta región se encuentra conservada en ambas conformaciones de la proteína, aunque se observó una mayor unión a anticuerpos neutralizantes en la conformación pre-fusión. Curiosamente, este epítomo se encuentra en el interior del trímero en esta conformación, sugiriendo que quizá los anticuerpos con diana en este epítomo evitarían la transición de la proteína F de pre- a post-fusión, hecho que parece ser el mecanismo de acción de la mayoría de anticuerpos descritos para los pneumovirus (61). Por otra parte, es importante remarcar que el epítomo contra el anticuerpo monoclonal Palivizumab, fármaco comúnmente utilizado para HRSV, también está presente en HMPV en los aminoácidos 224-247, aunque se ha comprobado que este anticuerpo no tiene efectividad contra las hospitalizaciones asociadas a HMPV (62,63).

Debido al grado de conservación de esta proteína y la potente producción de anticuerpos monoclonales neutralizantes que estimula, ésta se ha convertido en la diana más popular para el desarrollo de vacunas (12,54).

### 1.3 CICLO REPLICATIVO VIRAL

El ciclo de replicación de HMPV empieza con la unión del virus a la célula del huésped (**Figura 12**) (4), que como se ha explicado anteriormente, puede darse tan solo con la proteína F (32). Tras esta unión, se produce la activación de la proteína F dando lugar a la fusión de las membranas del virus y de la célula infectada. La proteína M, que se encontraba en la parte interna de la envuelta del virus, se desestructura permitiendo la liberación del complejo de la nucleocápside al citoplasma celular. Una vez en el interior de la célula, el ARN viral de polaridad negativa sirve como molde para la síntesis de ARN mensajero (ARNm) y ARN copia (cARN) antígenómico de polaridad positiva (4). Esta molécula de antígenoma se utiliza para sintetizar ARN genómico para la incorporación de esta molécula en la progenie viral o bien para tener más moldes donde hacer la transcripción y así tener más expresión proteica viral (4).



**Figura 12.** Representación esquemática del ciclo replicativo viral de HMPV. Imagen procedente Schildgen *et al.* Clin. Microbiol. Rev. 2011.

El genoma de HMPV se transcribe empezando por el extremo 3' mediante un proceso lineal secuencial, también conocido como *stop-restart*. Eso significa cada gen está flanqueado por unas secuencias llamadas *gene-start* (GS) y *gene-end* (GE), que median el inicio de la



transcripción y la terminación o poliadenilación (64). El GS del HMPV consiste en un motivo de 16 nucleótidos cuyo consenso es GGGACAAnTnnnAATG, cuyos 10 primeros nucleótidos guardan una gran similitud con aquellos del GS del HRSV (64) y del AMPV (5). El GE del HMPV es un motivo de entre 12 y 15 nucleótidos cuyo consenso es AGTTAnnnAAAAA, idéntico al de HRSV (64). La diferencia de longitud del GE es debido al residuo de adeninas, que puede tener entre 4 y 7 nucleótidos (64).

Las proteínas de superficie F, G y SH son las únicas que pasan por el aparato de Golgi para las modificaciones postraduccionales, y tras este paso se dirigen a la membrana plasmática de la célula. La proteína M no requiere del aparato de Golgi, tras la traducción va directamente a la parte interior de la membrana plasmática, donde se asocia a las colas citoplasmáticas de las proteínas de superficie. Una vez el complejo de la RNP está ensamblado, se dirige hacia las proteínas M bajo la membrana celular, donde interaccionan y forman nuevas partículas virales mediante exocitosis o gemación (4,21,22).

#### 1.4 MANIFESTACIONES CLÍNICAS

El HMPV es uno de los agentes más comunes en las infecciones de tracto respiratorio superior e inferior en pediatría, pacientes inmunodeprimidos y en pacientes mayores de 65 años (65). La población pediátrica, la inmunocomprometida y la de mayores de 65 años son las más vulnerables a la infección por este virus.

Aunque este virus raramente se detecta en pacientes asintomáticos en los pocos estudios en los que esta cohorte es incluida, la infección viral por HMPV suele presentar sintomatología clínica, aunque leve. Como la mayoría de los virus respiratorios, la infección por HMPV suele limitarse al tracto respiratorio superior, manifestando síntomas inespecíficos como rinorrea, coriza, tos, dolor de garganta, fiebre y crup. Otros síntomas menos comunes son conjuntivitis, otitis media aguda, vómitos, diarreas, erupciones maculopapulares, incremento de los niveles de transaminasas y convulsiones febriles (4,65). La duración de los síntomas suele ser de 1 semana, y el virus suele ser aclarado entre 1 y 2 semanas (4).

El HMPV también puede infectar el tracto respiratorio inferior, en cuyo caso las manifestaciones más comunes serían bronquiolitis, neumonía y exacerbación del asma (4,65) generalmente como mala evolución de la infección del tracto respiratorio superior y habiendo presentado previamente sintomatología más leve (66). Las radiografías de tórax de los pacientes que sufren una infección del tracto respiratorio inferior suelen presentar infiltrados perihilares

difusos, manguitos peribronquiales e infiltrados lobares, imágenes similares a las producidas por otros virus respiratorios (66).

Diversos estudios tanto en población hospitalizada como ambulatoria han asociado este virus con 6-40% de enfermedad respiratoria aguda en pacientes en edad pediátrica (2). Los pacientes hospitalizados por infección de HMPV suelen tener entre 6 meses y 1 año de edad, un poco mayores que los infectados con HRSV, que tienen 2-3 meses de edad, hecho que sugiere una mayor protección en la infancia temprana relacionada con la transferencia de anticuerpos de la madre (2,65). Este virus es una de las principales causas de bronquiolitis en niños menores de 5 años (65), en algunos estudios se ha observado que es el segundo agente por detrás de HRSV, siendo el agente causal de aproximadamente el 10% de hospitalizaciones pediátricas (43,66).

Aunque se estima que todas las personas han experimentado una primoinfección por HMPV antes de los 5 años, las reinfecciones en adultos son comunes. Esta infección en adultos sanos suele ser leve debido a la inmunidad creada en la primera infección (4), aunque diversos estudios han sugerido que la inmunidad creada por este virus sea efímera e incompleta (66). Por otra parte, se ha observado un incremento en la gravedad y una alta morbilidad y mortalidad en el paciente mayor de 64 años (2). La enfermedad en adultos está muy subestimada, ya que los hospitales no suelen incluir este virus en el cribado cuando los pacientes no son población pediátrica. Se ha visto que el HMPV puede tener una prevalencia del 4-11%, aunque esta incidencia varía según el estudio debido a la diferencia en los grupos estudiados (adultos sanos, pacientes de alto riesgo, mayores de 65, pacientes en residencias, etc.) (4).

Aquellos pacientes con inmunodepresión, con enfermedades cardíacas previas o enfermedades respiratorias de base (enfermedad pulmonar obstructiva crónica o asma) suelen estar en más riesgo de desarrollar síntomas más graves, llevando a fallos respiratorios que requieren soporte de oxígeno de alto flujo o incluso ventilación mecánica (65) y en general, teniendo una mayor tasa de hospitalización. Ha habido casos fatales de HMPV en pacientes con cáncer, y se ha visto una gran asociación con enfermedad grave de este virus en pacientes adultos y pediátricos con cáncer o trasplantes hematopoyéticos. Esta mayor gravedad probablemente se debe a la capacidad reducida de controlar la replicación viral, aunque aún se desconoce este mecanismo (4).

El HMPV es un virus que tiene suficiente entidad clínica como para producir enfermedad por sí solo, sin necesidad de la contribución de otros virus respiratorios. Además, las

coinfecciones o codetecciones con otros virus respiratorios son poco frecuentes (66). Aun así, las coinfecciones detectadas parecen no tener impacto en la gravedad de los síntomas. Las neumonías bacterianas secundarias a la infección por HMPV, por otra parte, sí están asociadas a una mayor mortalidad (2).

### 1.5 PATOGENIA E INMUNIDAD

La transmisión del HMPV se puede dar por contacto directo con individuos infectados mediante la aerosolización de gotitas infectivas a través de la tos o los estornudos de éstos, o por contacto indirecto mediante fómites, de manera que un objeto que ha estado en contacto con secreciones contaminadas entra en contacto con el epitelio nasal o conjuntival de una persona susceptible, transmitiendo la infección (2,67). La infección por HMPV principalmente se localiza en el epitelio del tracto respiratorio superior. El período de incubación suele ser de 3-5 días antes de la manifestación del primer síntoma. En los casos más graves, el HMPV puede llegar a infectar el epitelio del tracto respiratorio inferior mediante la infección de células adyacentes y la aspiración de secreciones nasofaríngeas (65).

Como protección y para hacer frente a la infección, el ser humano cuenta con la respuesta de su sistema inmune, que juega papeles determinantes a varios niveles. Se conoce que las infecciones virales estimulan una respuesta inmune innata caracterizada por la inducción de la respuesta mediada por interferón de tipo I (IFN-I). Esta vía comienza con el reconocimiento de

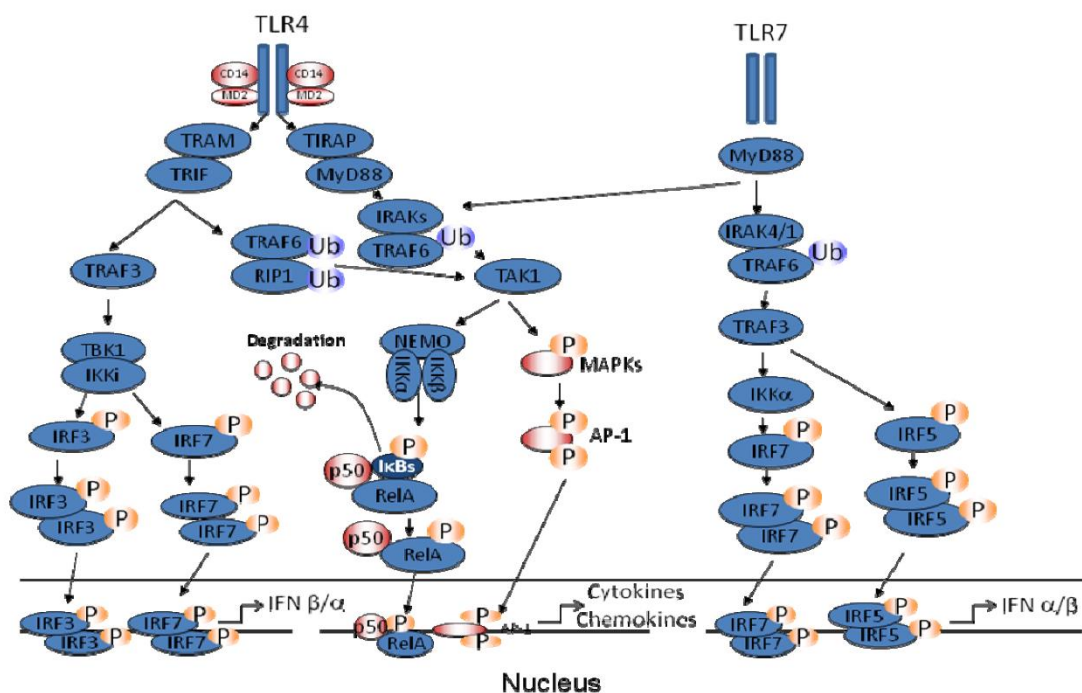
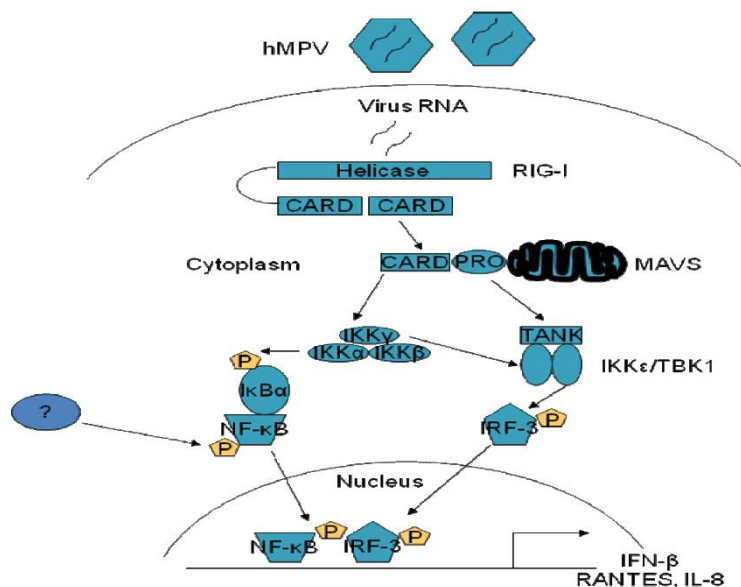


Figura 13. Vías de señalización de los dos TLR que reconocen PAMPs de HMPV. Imagen original de Kolli *et al.* Viruses, 2012.

patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) del virus por parte del sistema inmune a través de *toll-like receptors* (TLR) o helicasas de ARN como RIG-I o MDA-5 (4). Tras el reconocimiento por parte de los TLR4 y 7 específicamente en el caso de HMPV, éstos disparan vías de señalización intracelular que inducen citocinas inflamatorias, quimiocinas e IFN-I (18) (**Figura 13**).

Las moléculas RIG-I y MDA-5 también pueden interactuar con el ARN del virus. Estos sensores transmiten una señal a través de la proteína mitocondrial de señalización antiviral (MAVS) para activar el IRF3 y el NF- $\kappa$ B, que llevan a la activación de IFN-I y a la expresión de otros genes estimulados por IFN (4,18) (**Figura 14**).



**Figura 14.** Esquema de la vía de señalización de RIG-I para la activación de IRF y NF- $\kappa$ B. Imagen original de Kolli *et al.* Viruses, 2012.

De estas vías de señalización se puede deducir que la respuesta más rápida que da el cuerpo humano ante una infección viral es la producción de IFN-I. Estas moléculas de IFN- $\alpha$  y  $\beta$  son reconocidas por el receptor IFNAR, que da inicio a otra cascada de señalización celular donde están implicadas la fosforilación de STAT1 y su consecuente dimerización con STAT2, que al unirse se dirigen al núcleo celular para activar la transcripción de genes antivirales (68).

Por otra parte, la entrada de HMPV en las células epiteliales también provoca la activación de un conjunto de quimiocinas proinflamatorias que atraen monocitos, macrófagos y neutrófilos (69) (**Figura 15**). Los neutrófilos se especializan en la eliminación de células infectadas, células muertas y debris. Además de esta función citotóxica, estas células promueven el paso de la respuesta inmune adaptativa. Es importante remarcar que un exceso de actividad de neutrófilos es negativo para el huésped, ya que pueden provocar daños peores que los provocados por propia infección del tejido respiratorio. Por ello, estas células entran en apoptosis a los pocos días de haber empezado su función, y sus restos serán limpiados por los macrófagos (69). Otras células implicadas en la respuesta inmune innata son las *natural killer* (NK). Estas células son capaces de discernir las células infectadas para poder eliminarlas, a la vez que median una respuesta inmune adaptativa, tal como se ha observado en la infección por el HRSV. Sin

embargo, parece que las proteínas de HMPV no son reconocibles por los receptores activadores de estas células (69). Finalmente, las células epiteliales pueden llevar a cabo la muerte celular programada o apoptosis para poder limitar la replicación y propagación viral (69).

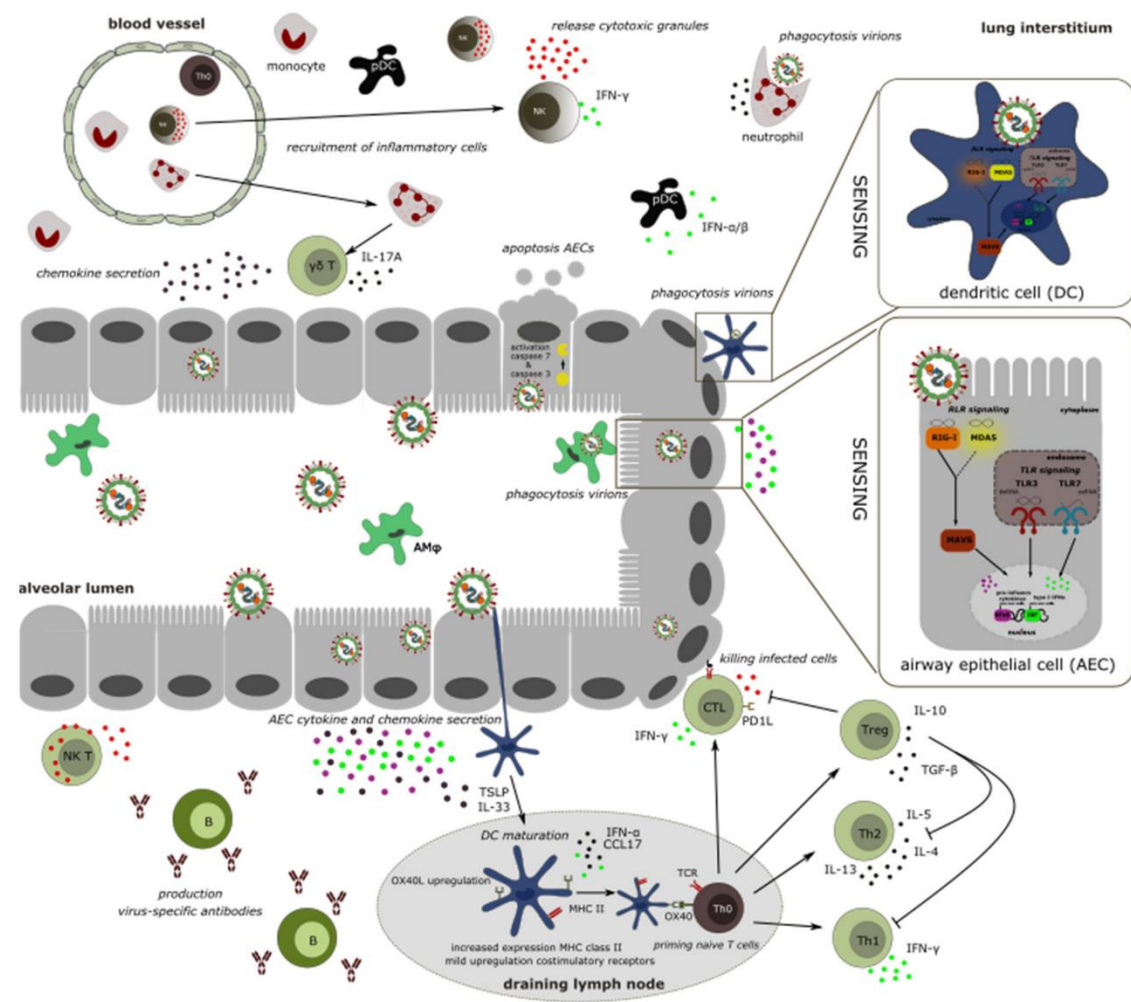


Figura 15. Esquema representativo de la respuesta inmune provocada por HMPV. Imagen original de Ballegeer y Saelens, Viruses, 2020.

Otra respuesta temprana inducida por la infección de HMPV es la producción de linfopoyetina estromal tímica (TSLP, de sus siglas en inglés). La TSLP induce una respuesta inmune innata similar a la alergia, que lleva a la expresión de citocinas como TNF- $\alpha$ , IL-5 e IL-13, que acaba incrementando el reclutamiento de células polimorfonucleares y la inducción de secreción mucosa (68). Además, la TSLP activa las células dendríticas mediante la OX40L, provocando la diferenciación a células T CD4+ de tipo Th-2 (69).

Las células dendríticas son células presentadoras de antígeno que expresan TLR a la espera de encontrar PAMPs para activarse. Suelen ser las primeras células del sistema inmune

en tomar contacto con los virus, ya que pueden detectar antígenos directamente en el lumen del tracto respiratorio. Una vez tienen las partículas virales en su interior, estas células pueden permanecer en el tracto respiratorio y promover respuestas inmunes locales o bien migrar a los nodos linfáticos donde presentan el antígeno a células CD4+ y CD8+. Tras este reconocimiento, las células T efectoras activadas con un receptor T adecuado al antígeno reconocido viajan hasta el parénquima pulmonar, donde eliminan las células epiteliales infectadas (69).

Las células T convencionales juegan un papel importante en el control de la replicación viral de HMPV en el pulmón durante las fases temprana y tardía de la infección. Se ha observado que tanto las CD4+ como las CD8+ tienen un rol en la respuesta antiviral, pero la combinación de ambas poblaciones resulta más efectiva para la erradicación del HMPV del tracto respiratorio. En diversos estudios se ha observado que la respuesta idónea por parte de las células T CD4+ es la Th1, ya que limita la replicación viral, mientras que una respuesta de tipo Th2 facilitaría su persistencia. Por otra parte, las células T CD8+ eliminan de manera selectiva las células infectadas. De hecho, se ha observado que estas células permanecen en sangre periférica de pacientes recuperados, y el 97% de éstas está dirigido a la proteína F. Las células T no convencionales (células T- $\gamma\delta$ ) también parecen participar en esta defensa, pero se desconoce el mecanismo (69).

Otra vertiente de la respuesta inmune adaptativa es la humoral. Se ha observado que en pacientes de entre 6 meses y 1 año, la prevalencia de anticuerpos específicos para HMPV es del 25%, del 55% entre 1-2 años, del 70% entre 2-5 años y del 100% en mayores de 5 años. Aun así, no todos estos anticuerpos son neutralizantes. Se ha observado que en pacientes de 6 meses a 1 año se mantiene el porcentaje, mientras que para pacientes de 1-2 años desciende al 31%, en aquellos de 2-5 años desciende al 38% y en mayores de 5 años el porcentaje varía entre el 75 y 100% (18). Los anticuerpos neutralizantes pueden bloquear la actividad de proteínas virales de superficie, específicamente la proteína F, como se ha comentado previamente, y prevenir la infección de otras células por viriones liberados al lumen.

Aun habiendo diversos estudios sobre la respuesta inmune inducida por HMPV, muchos de éstos se contradicen al describir diversas respuestas implicando a moléculas muy diferentes. Esto demuestra que, aunque ya hace 20 años que se descubrió este virus, aún queda mucho por estudiar para poder desarrollar técnicas eficientes contra su infección.

### 1.5.1 Estrategias de evasión del sistema inmune

Dado que la producción de IFN-I es crítica en una buena respuesta inmune innata, el HMPV ha desarrollado maneras de evitar su expresión. Estas estrategias consiguen interrumpir la vía de señalización que lleva a la producción de IFN mediante el bloqueo de alguna molécula de la vía Jak/STAT, el incremento de algún supresor de moléculas implicadas en la vía, fosfatasa, etc. (18)

Las proteínas G, SH y M2-2 han demostrado jugar un papel en la evasión del sistema inmune innato (**Figura 16**).

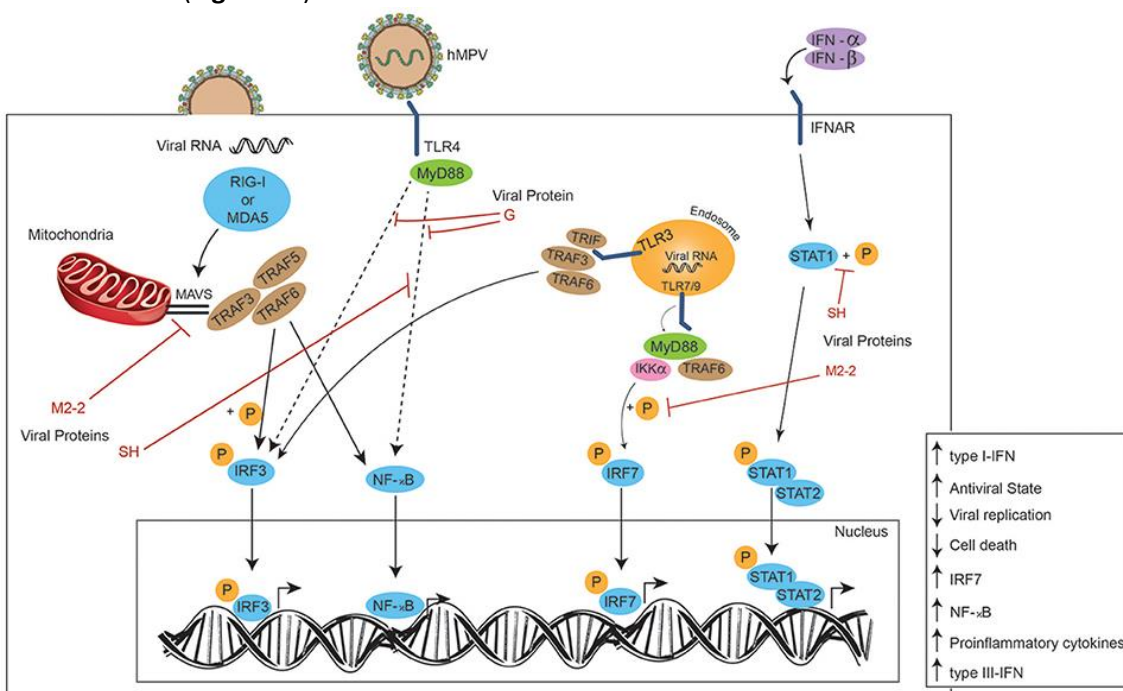


Figura 16. Esquema de los efectos que tienen las proteínas de HMPV sobre las diferentes vías de señalización del sistema inmune innato. Imagen original de Soto *et al.* *Frontiers in Immunology*, 2018.

La proteína SH parece impedir la activación de NF-κB mediante la inhibición de una de las quinasas que fosforila esta molécula, impidiendo la expresión de genes dependientes de NF-κB como la IL-6, IL-8 y TNF-α entre otras (18). Esta proteína también tiene la capacidad de inhibir la fosforilación de STAT1, interrumpiendo así la señalización promovida por el IFN-I (68).

La proteína G ha mostrado ser un factor de virulencia importante capaz de inhibir la señalización celular tanto en células del tracto respiratorio como en células primarias del sistema inmune. Esta proteína interacciona directamente con RIG-I, impidiendo que ésta se asocie con MAVS e interrumpiendo completamente esta vía de señalización. También se ha observado la implicación de esta proteína en la vía de señalización dependiente de TLR4 en células dendríticas, pero se desconoce el mecanismo. Este último descubrimiento abre las puertas a

que esta proteína también esté jugando un papel en la modulación del sistema inmune adaptativo (18). La proteína G también contribuye al reclutamiento de neutrófilos, que provoca daños al hospedador y colabora en una mayor gravedad del curso clínico del paciente. Se desconoce el mecanismo por el que atrae neutrófilos, pero se cree que tiene que ver con la inhibición de RIG-I (69).

La proteína M2-2 también es una antagonista de la señalización antiviral celular (18). Esta proteína interactúa físicamente con la proteína MAVS formando un complejo y así evitando su activación. También se ha comprobado que interactúa con el adaptador MyD88 en células dendríticas para suprimir la respuesta inmune antiviral (16) y con la proteína IRF7, impidiendo que ésta se fosforile y alcance la homodimerización necesaria para poder activar la vía del interferón  $\alpha$  (IFN-  $\alpha$ ) (17).

Por otra parte, las proteínas de la RNP también parecen jugar un papel en la evasión del sistema inmune. Las proteínas N y P pueden formar cuerpos de inclusión dentro de la célula donde se da la replicación viral, ocultando de esta manera el ARN viral de las helicasas de ARN celulares, impidiendo así la activación de la vía de señalización de RIG-I (18).

Aunque queda mucho por descubrir sobre la respuesta inmune contra este virus, se ha visto que las proteínas SH y G son las que juegan un mayor papel contra ésta, inhibiendo a varios niveles la respuesta mediada por IFN-I (68).

Por otro lado, la activación de la vía de TSLP parece ser otra estrategia del virus para poder permanecer en las células e incrementar su replicación viral, ya que al inducir una respuesta de tipo Th2, ésta provoca el retraso o freno de una posible respuesta Th1, que es la verdadera respuesta efectiva contra el HMPV. En cuanto a las células CD8+, aunque sí se ha observado que matan las células infectadas *in vitro*, *in vivo* no son capaces de eliminar el virus del tracto respiratorio; aún se desconoce por qué, aunque sí se sabe que está relacionado con el incremento del nivel de PD-1 (69).

En cuanto a la respuesta humoral, se ha observado la persistencia de este virus en presencia de anticuerpos neutralizantes, y las reinfecciones de este virus en pacientes seropositivos son muy comunes. No obstante, sí existe una correlación inversa entre el nivel de anticuerpos neutralizantes y la susceptibilidad a la infección por HMPV (69). También se ha postulado que una de las funciones de la proteína G es el enmascaramiento de la proteína F para obstaculizar el reconocimiento por parte de los anticuerpos neutralizantes de los epítomos de esta proteína (37).



También se ha observado que este virus es capaz de revertir el estado apoptótico de una célula, pudiendo persistir en ella y evitar su eliminación. Esto, sin embargo, tan solo se ha observado en pacientes con inmunodepresión (69).

En resumen, el HMPV dispone de múltiples estrategias para evadir todos los pasos de nuestra respuesta inmune, y es que tal y como se expone en un reciente artículo de Balleger y Saelens, *The human respiratory system is a playground for HMPV* (69).

## 1.6 EPIDEMIOLOGÍA Y EVOLUCIÓN DEL HMPV

### 1.6.1 Epidemiología molecular

Desde el descubrimiento del virus ya se diferenciaron dos genotipos circulantes denominados HMPV-A y HMPV-B. Análisis filogenéticos basados en las proteínas de superficie F y G describieron subgenotipos diferentes en cada uno de los grupos, llamados A1, A2, B1 y B2. Entre proteínas F de los genotipos A y B hay una identidad de 95-97%, mientras que para la G es de tan solo 30-35% (4). Desde la descripción de este virus, se han descrito diversos subgenotipos y linajes que han ido emergiendo y sustituyendo a los que circulaban previamente. El año 2006 se describió por primera vez la distinción de los linajes A2a y A2b dentro del subgenotipo A2

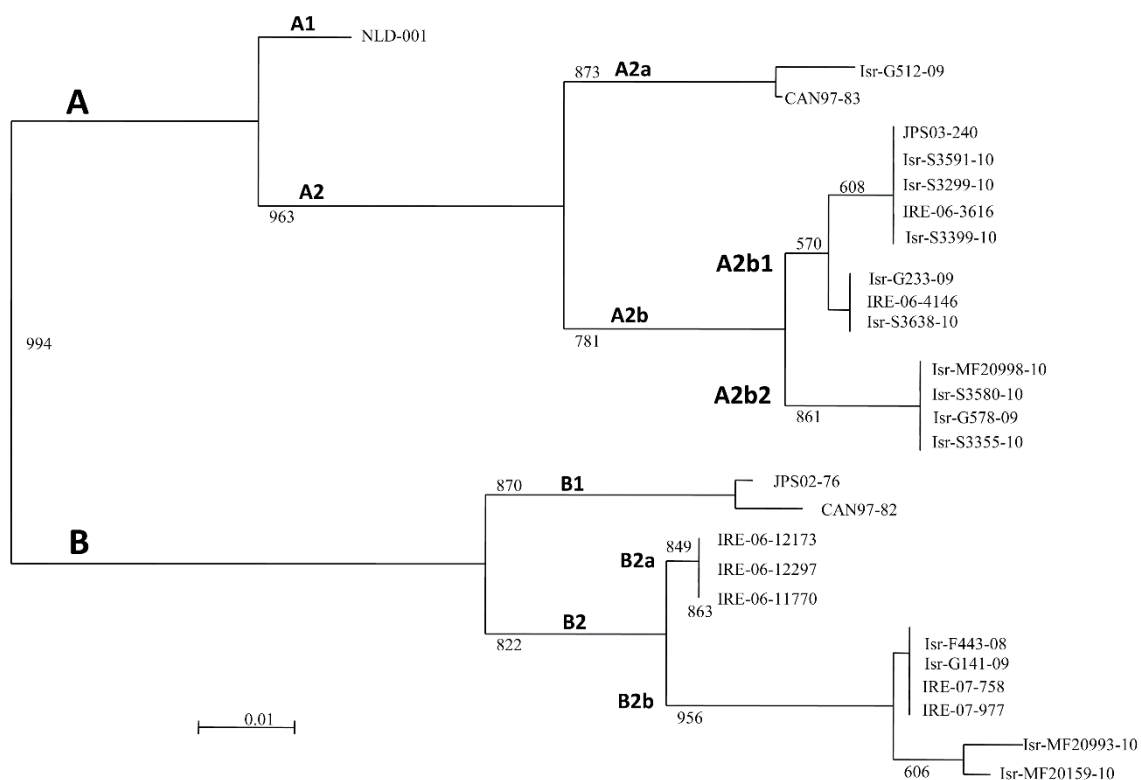


Figura 17. Árbol filogenético con los diferentes genotipos, linajes y sublinajes descritos hasta la fecha de inicio de la Tesis Doctoral. Imagen original de Regev et al, *Viruses*, 2012.

(70), y el año 2008, los linajes B2a y B2b dentro del genotipo B2 (71). Más recientemente, el año 2012, se describió la emergencia de dos sublinajes del linaje A2b, denominados A2b1 y A2b2 (72) (**Figura 17**).

Se ha descrito la circulación de los 4 genotipos en todo el mundo, de lo que se sustrae que no hay grupos genéticos restringidos a una región geográfica y que diferentes grupos genéticos pueden co-circular a la vez en un mismo lugar (4). Aunque se han descrito una gran diversidad de anticuerpos neutralizantes, todos ellos contra la proteína F, y experimentalmente se ha comprobado que muchos de ellos ofrecen una protección cruzada para todos los genogrupos de HMPV, se ha postulado que la variación antigénica podría explicar la co-circulación de múltiples linajes genéticos de HMPV, pues habrían escapado a la inmunidad preexistente (4).

### 1.6.2 Estacionalidad y prevalencia

Las infecciones por HMPV pueden ocurrir a lo largo de todo el año, pero el grueso de los casos ocurre en una época determinada. Este fenómeno, llamado estacionalidad, es común en otros virus respiratorios como HRSV o los virus de la gripe A y B, donde hay una mayor incidencia de casos en un momento determinado del año (4). Los virus de la gripe A y B y el HRSV tienen una incidencia muy marcada en los meses de invierno, como se observa en la **Figura 18**.

Month	June	July	Aug.	Sep.	Oct.	Nov.	Dec.	Jan.	Feb.	Mar.	Apr.	May	
Winter virus						Influenza virus							
							HCoV						
						RSV							
All-year virus	Adenovirus/HBoV												
Type-specific	PIV3		PIV1										
Spring	hMPV												
Spring/Fall	Rhinovirus												
Summer virus	Non-rhinovirus enteroviruses												

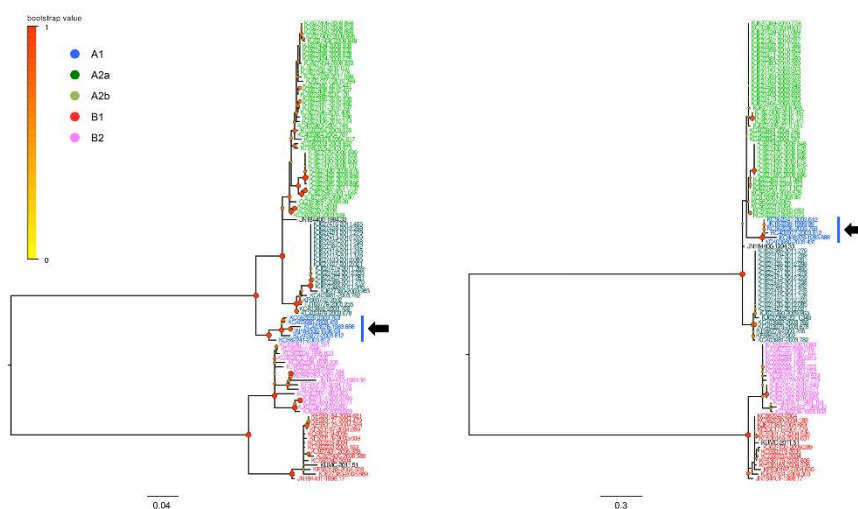
**Figura 18.** Estacionalidad de algunos virus respiratorios en zonas del hemisferio norte. Imagen adaptada de Moriyama. *Annual Review of Virology*, 2020.

El HMPV puede ser detectado a lo largo de todo el año, aunque también presenta una incidencia marcada entre febrero-abril en el hemisferio norte. Este virus presenta una prevalencia de entre el 3-7% en estudios de diversos países que incluyen pacientes de todas las edades (73–81), ya que como se ha expuesto en el apartado de manifestaciones clínicas, es un virus que afecta a pacientes de todos los grupos de edad.

Se ha postulado que los picos de incidencia de los diferentes virus respiratorios que presentan estacionalidad no se solapan debido a un fenómeno de interferencia viral (82,83). De hecho, se observó que la pandemia de gripe del año 2009 debutó más tarde en Europa que en el resto del mundo debido a que en aquel momento había un pico de incidencia de rinovirus (82).

### 1.6.3 Evolución del HMPV

Los eventos evolutivos que más contribuyen a la diversidad genética de los virus ARN son las mutaciones y las recombinaciones (84). Hasta el momento, no se ha observado ningún evento claro de recombinación en HMPV, aunque un estudio de 2016 describió 3 posibles puntos de recombinación en la posición 1207 del gen F, en el residuo 153 de la proteína SH y en el residuo 104 de la proteína G (85). Los cambios en F y G eran sutiles, pero en la proteína SH se observó un cambio de genotipo, donde algunas secuencias de antes del punto de recombinación agrupaban con las del genotipo A1, mientras que las mismas después del punto de recombinación se acercaban más a las del genotipo A2, sugiriendo un evento que propiciara la emergencia del genotipo A2 (**Figura 19**).



**Figura 19.** Árboles filogenéticos de las secuencias antes y después del punto de recombinación sugerido para la proteína SH. La escala indica el número de sustituciones por posición. Imagen adaptada de Kim *et al.* Plos One, 2016.

Este tipo de análisis filogenéticos que se observa en la **Figura 19** no solo permite reconstruir la historia evolutiva del patógeno estudiado, sino que establece una base necesaria para la posterior asociación con características virales como la virulencia, eficiencia replicativa, transmisibilidad o antigenicidad entre otras.

Durante el curso de la evolución, las mutaciones que resultan beneficiosas y que emergen más rápido de lo que marca la deriva genética propia del virus se mantienen mediante la acción de la selección positiva, pero aquellas que son defectivas acaban siendo eliminadas mediante selección purificadora o negativa. Estas presiones selectivas suelen calcularse a través del análisis de la relación entre la proporción de sustituciones no sinónimos y la proporción de sustituciones sinónimas (dN/dS) (84).

El genoma completo tiene una tasa de mutación de  $0,52 \times 10^{-3}$  sustituciones nucleicas por posición y por año, y se estima que el ancestro común de todas las secuencias de HMPV data de hace 400 años aproximadamente (2,4,85). Sin embargo, el ancestro común de los grupos genéticos A1, A2a, A2b, B1 y B2 es mucho más reciente, siendo A1 el más antiguo, hace unos 70 años (4,85).

La proteína G es la más variable de todo el genoma, con una tasa evolutiva de  $3,5 \times 10^{-3}$  sustituciones nucleicas por posición y por año, mientras que la proteína F presenta una tasa de  $7,1-8,5 \times 10^{-4}$ , que es la tasa más reducida junto a las de las proteínas N y P. Aun así, estas tasas evolutivas siguen siendo muy elevadas, aunque no inusuales en virus ARN (4). El hecho de que esta proteína tenga la menor tasa evolutiva de todas las proteínas de superficie la hace una candidata ideal para ser diana de vacunas y tratamientos.

## 1.7 DIAGNÓSTICO

Clásicamente, los virus han sido diagnosticados a través del aislamiento en cultivos celulares (86,87). Para este virus, el aislamiento en cultivo celular es posible en las líneas celulares Vero, HEp-2, 293 y LLC-MK2 entre otras, aunque resultando dificultoso. El HMPV tiene una tasa de replicación lenta, mostrando efectos citopáticos tardíos como son el redondeamiento de células, desprendimiento de la monocapa de células, o formación de sincitios (86). Esta técnica tiene algunos puntos en contra, como la necesidad de formación específica para el personal técnico, el consumo de recursos y el tiempo hasta el resultado, o los valores de especificidad y sensibilidad que ofrece en comparación con las técnicas moleculares que se utilizan actualmente. Por otra parte, el trabajo necesario para poder implantar esta técnica en el laboratorio exige disponer de distintas líneas celulares, ya que no todas permiten la propagación de todos los virus. Además, se ha observado una gran pérdida de sensibilidad de esta técnica a partir de muestras congeladas, especialmente si se trata de virus con envuelta. Por todos estos motivos, muchos laboratorios han dejado de utilizar el cultivo celular en favor de técnicas moleculares. Sin embargo, es importante destacar que el aislamiento celular es una

de las pocas técnicas que permite el aislamiento de patógenos desconocidos o emergentes, tal como sucedió el descubrimiento de HMPV, especialmente cuando no hay técnicas moleculares específicas desarrolladas, por lo que es necesario mantener esta técnica en laboratorios de salud pública (87).

Otra técnica utilizada para el diagnóstico de HMPV es la basada en inmunofluorescencia. Estos ensayos, aunque tienen una gran especificidad, tienen muy baja sensibilidad (86). Como ventaja frente al cultivo, esta técnica no requiere que los virus de la muestra estén viables, por lo que pueden hacerse a partir de muestras congeladas, y el tiempo de respuesta son mucho más cortos. Aun así, sigue siendo necesario tener un personal técnico especializado y formado, ya que es una técnica laboriosa que requiere experiencia en la lectura e interpretación. Cabe decir que esta técnica no puede ser implementada en laboratorios con una alta demanda de muestras (87).

Actualmente, y debido a los avances en biología molecular, las técnicas más utilizadas son las basadas en la amplificación de ácidos nucleicos (NAAT, de sus siglas en inglés). Para ello, es necesaria la extracción y purificación de ácidos nucleicos de la muestra. Una vez obtenida la extracción, ya puede realizarse la PCR (siglas en inglés de reacción en cadena de la polimerasa), que en el caso del HMPV debe tener incorporado un paso de transcripción inversa (RT-PCR). Las más implementadas son las técnicas basadas en RT-PCR de tiempo real multiplexadas, es decir, que pueden detectar diversas dianas a la vez y así, detectar varios agentes patógenos al mismo tiempo, visualizando su positividad o negatividad a medida que la reacción va ocurriendo (87). Estas técnicas de amplificación de ácidos nucleicos, como las de extracción, pueden automatizarse y así poder implementarse en laboratorios que requiere disponer de una alta capacidad de procesado. Como desventaja, esta técnica también requiere de personal formado y especializado, pero el tiempo de respuesta bajo y la alta especificidad y sensibilidad hacen de esta técnica la *gold-standard* hoy en día.

Hay otras técnicas utilizadas para el diagnóstico de HMPV, como la amplificación mediada por transcripción (TMA, de sus siglas en inglés) (88), con una gran especificidad y sensibilidad y equiparable a las técnicas de NAAT, pero aún no está tan distribuida globalmente.

## 1.8 PREVENCIÓN Y TRATAMIENTO

### 1.8.1 Vacunas

No hay ninguna vacuna contra el HMPV, aunque se han realizado muchos esfuerzos para poder desarrollar una que sea segura y efectiva. Se han realizado aproximaciones con diferentes tipos de vacunas, aunque aún no se ha podido aprobar el uso de ninguna de ellas (2).

La vacunación mediante virus inactivado es una aproximación que se utiliza ampliamente para otros tipos de virus. La vacuna para la gripe, por ejemplo, es una vacuna de virus inactivado mediante formalina. Esta vacuna se utiliza de forma masiva anualmente en todo el mundo debido a su estabilidad, la facilidad de manufacturación y su seguridad biológica, ya que se ha comprobado que no hay replicación viral. En cambio, cuando se probó esta misma aproximación con el HRSV, la vacuna provocó una enfermedad con mayor gravedad ante la infección natural, provocando la muerte de dos pacientes (89). Esta vacuna provocó una respuesta inmune adaptativa de tipo Th2, que llevaba a la infiltración de eosinófilos a los pulmones de los pacientes ante una infección natural de HRSV. La vacunación con HMPV inactivado con formalina parece provocar enfermedad pulmonar de gran gravedad y respuesta Th2 desproporcionada en animales, igual que la vacuna de HRSV hizo en humanos, por lo que no es una buena candidata. Existen otras maneras de inactivar los virus, que quizá harían este tipo de vacunación segura, aunque aún está por estudiar (90).

Otro tipo de vacunas son las de subunidades virales, que son aquellas que expresan algunas proteínas virales. Normalmente, estas proteínas se encuentran en la forma de partículas similares a las virales (*virus-like particles*, VLP), en nanopartículas o con adyuvantes que mejoran la inmunidad. La proteína F es la única que promueve la creación de anticuerpos neutralizantes, de manera que todas las aproximaciones basadas en subunidades que han obtenido buenos resultados contenían esta proteína en su composición (90). Las proteínas F y G expresadas en una VLP retroviral mostraron buenos resultados en ratones (91), similares a los obtenidos en VLP de alphavirus o de PIV3, aunque estos dos últimos estudios son de 2008 y de 2003, respectivamente, y no han prosperado (90). Otro equipo trabajó en una aproximación con proteína F soluble, pero la respuesta desaparecía rápidamente, a las 8 semanas (92). Otra aproximación fueron las VLP de células 293F con la proteína F, que provocaron una respuesta de anticuerpos neutralizantes y de células T CD8+ efectivas frente a la proteína F. Los ratones inmunizados con estas VLP eran capaces de restringir la infección de HMPV al tracto respiratorio

superior (93), demostrando ser una candidata prometedora para la prevención de esta infección.

Finalmente, el último tipo de vacuna que se ha probado para este virus es el de vacunas vivas atenuadas. La atenuación de un virus puede realizarse de dos maneras. La primera forma de atenuación es la mutación del genoma del virus mediante pases en cultivo celular o mutagénesis. Esta aproximación se ha probado para HMPV, y los ratones inmunizados mostraron protección, pero la desventaja de este tipo de vacunas es que existe la probabilidad de que el virus mute y revierta su atenuación, provocando la infección por HMPV en el paciente (90). La segunda forma de atenuación es mediante la recombinación. Esta recombinación permite la delección de genes considerados “accesorios”, como serían la proteína G, SH o M2-2. La delección de G o de M2-2 despertó una respuesta inmune adecuada con anticuerpos neutralizantes (11,12,23), aunque no la delección de SH (12). Aun así, ya no hay más estudios sobre estas dos aproximaciones desde 2005. Una *review* del año 2015 subrayó la importancia de la respuesta de linfocitos T citotóxicos, donde se describe que estas células T CD8+ requieren de unos péptidos específicos para su activación y como dianas, que se encuentran en las proteínas N, M2-2, SH y G, indicando que son necesarios para la regulación de una correcta respuesta de tipo Th1 (90). Quizá esto explica por qué las vacunas con genes delecionados no son suficientemente eficaces.

Aún no ha habido ninguna aproximación que llegara a probarse en humanos, aunque se ha sugerido que las vacunas vivas atenuadas por recombinación sean las mejores candidatas para llegar a este estadio.

### 1.8.2 Fármacos

Por el momento no hay ningún antiviral específico para este virus. El tratamiento principalmente es de soporte, tratando los síntomas para reducir la clínica de una infección que acostumbra a ser autolimitada (2). Hay diversos estudios en marcha para encontrar un fármaco que sea eficaz contra la infección por HMPV, y los tratamientos que parecen tener mayor potencial son la ribavirina y las inmunoglobulinas (2).

La ribavirina es un análogo de nucleósido con actividad contra los virus ARN. Los análogos de nucleósidos son antimetabolitos que mimetizan nucleósidos fisiológicos, de manera que, al incorporarse durante la replicación en la nueva cadena, bloquea la continuación de la síntesis. Este fármaco ha demostrado frenar la replicación viral de HMPV *in vitro* y en ratones, limitando la transcripción viral. Además, este fármaco también es capaz de incrementar la respuesta Th1

a la vez que limita la respuesta Th2 (94). No obstante, este fármaco presenta diversos inconvenientes, como que es potencialmente teratogénico, que su administración es mediante nebulización, por lo que debe hacerse con generadores de pequeños aerosoles y puede debilitar algunas funciones respiratorias, o que su precio es muy elevado (94,95).

Los anticuerpos monoclonales contra epítomos conservados de proteínas inmunogénicas también tienen la capacidad de proteger o minimizar las manifestaciones clínicas de las infecciones. Hay diversos estudios que plantean el uso de diferentes anticuerpos con diana en los epítomos descritos para la proteína F del HMPV (**Tabla 1**).

**Tabla 1. Anticuerpos monoclonales con actividad neutralizante contra HMPV descritos hasta ahora.**

<b>Anticuerpo</b>	<b>Epítomo en la proteína F</b>	<b>en la Conformación proteína F</b>	<b>Genotipos de HMPV</b>	<b>Cross-HRSV</b>	<b>Año y referencia</b>
<b>DS7</b>	DS7	Pre y post	Todos	Sí	2007 (96)
<b>MPE8</b>	III	Pre	Todos	Sí	2013 (97)
<b>54G10</b>	IV	Pre y post	Todos	Sí	2014 (98)
<b>101F</b>	IV	Pre y post	Todos	Sí	2016 (99)
<b>25P13</b>	III	Pre y post	Todos	Sí	2017 (100)
<b>17E10</b>	IV	Post	Todos	Sí	2018 (59)
<b>MPV364</b>	III	Pre y post	Todos	No	2019 (101)
<b>MPV196</b>	DS7	Pre y post	Todos	No	2019 (101)
<b>MPV201</b>	DS7	Pre y post	Todos	No	2019 (101)
<b>MPV314</b>	DS7	Pre y post	Todos	No	2019 (101)
<b>M1C7</b>	V	Pre	Todos	Sí	2019 (55)

Sin embargo, las inmunoglobulinas también presentan desventajas importantes. Este tipo de fármaco requiere un gran volumen por dosis, genera una gran cantidad de proteína en el paciente y está asociado a efectos adversos en pacientes pediátricos con enfermedades cardíacas congénitas (95).



Los inhibidores de fusión son otro tipo de fármaco dirigidos a los primeros pasos del ciclo replicativo viral (94,95). Son péptidos inhibitorios con secuencias homólogas a regiones de la secuencia de la proteína F, como los dominios HRA o HRB (102,103), que al impedir el cambio conformacional de la proteína F, evitan la fusión de las membranas viral y celular. No obstante, tan solo se observó actividad antiviral significativa cuando la administración del fármaco se hacía en el momento en el que el paciente tenía contacto con el virus (102), por lo que este fármaco sería de utilidad como medida profiláctica en casos de contacto con personas infectadas o como tratamiento temprano en contextos de epidemia.

El ARN de interferencia (ARNi) es una aproximación descubierta recientemente. Este tipo de molécula se produce de manera natural en procesos de inhibición intracelular, cuyo objetivo es la regulación de la expresión génica a través del silenciamiento de ARNm específicos. Se ha descrito la eficacia del ARNi *in vitro* e *in vivo* en infecciones de HRSV, parainfluenza y gripe (95), aunque para HMPV solo se ha probado *in vitro*, mostrando resultados prometedores. En un estudio, la mejor combinación resultó ser la de dos ARNi con diana en los genes N y P, que forman parte del complejo de replicación viral, hecho que sugiere que su silenciamiento llevaría a la pérdida total de síntesis de ARN (104). Además, tanto la proteína N como la P son las más conservadas del genoma del HMPV, razón por la que sería un buen diseño de fármaco. Otro estudio probó con ARNi contra la proteína G, que resultó ser muy efectivo en la inhibición de este gen, que, aunque *in vitro* no mostró reducción de la replicación viral de manera significativa (105), hipotetizaron que *in vivo* sí funcionaría, de igual manera que los virus con la G delecionada *in vitro* replicaban bien, pero se veían atenuadas *in vivo* (12,23).

Otro fármaco que ha mostrado una potente actividad antiviral contra el HMPV es el lípido sialil sulfatado o NMSO3 (94). Se desconoce el mecanismo de acción exacto, pero parece que interfiere en la unión entre la proteína de adhesión viral y el receptor celular mediante la adherencia del fármaco a través de cargas electrostáticas (106). Este fármaco reduce de manera significativa la carga viral y el reclutamiento de células inflamatorias en los pulmones (107). Hay muy pocos estudios de este fármaco en HMPV, y aún es necesario probarlo en modelos animales de mayor tamaño y en humanos.

# Hipótesis

## Hipótesis



## 2 HIPÓTESIS

---

El metapneumovirus humano (HMPV) es un patógeno muy común en infecciones del tracto respiratorio, tanto superior como inferior. Aunque ya hace 20 años de su descubrimiento, sigue habiendo un gran desconocimiento en comparación al que ya tenemos sobre los virus de la gripe o el virus respiratorio sincitial humano (HRSV). Aun existiendo diversos estudios sobre la prevalencia y estacionalidad del HMPV, el conocimiento sobre su diversidad genética es realmente escaso, ya que son pocas las iniciativas de vigilancia virológica que realicen una caracterización de los virus en circulación.

Los virus respiratorios con un genoma ARN se caracterizan por una elevada diversidad genética, adquirida mediante mutaciones puntuales, y eventos de recombinación, inserción y delección que les permite seguir evolucionando. Para HMPV, sólo se han descrito mutaciones puntuales, sin haber descrito todavía otros cambios genéticos. Dada la estrecha relación taxonómica con el HRSV por una gran similitud genética y estructural, para que el que sí se han descrito eventos de duplicación en la glicoproteína G de la envuelta, y cuyas variantes portadoras con el tiempo se han convertido en predominantes, podríamos esperar la adopción de este mismo mecanismo evolutivo en los HMPV.

La emergencia de nuevas variantes de HMPV y su evolución podrían ser una realidad, aunque desconocida por una falta de iniciativas en el estudio de su diversidad genética. Estas nuevas variantes podrían tener un impacto clínico, por lo que tenemos que profundizar en su conocimiento, que con el tiempo podría contribuir a un mejor entendimiento de la evolución epidemiológica, a una mejor gestión de las epidemias anuales y al desarrollo de vacunas o de nuevos tratamientos con actividad antiviral, especialmente dirigidos a ser utilizados en los pacientes más susceptibles a la infección.



# Objetivos



### 3 OBJETIVOS

---

1. Describir la prevalencia y estacionalidad de los HMPV detectados en el tracto respiratorio del paciente atendido en el Hospital Universitario Vall d'Hebron (HUVH) de Barcelona a lo largo de ocho temporadas de vigilancia (2014 – 2021).
2. Estudiar la diversidad genética, incluso a nivel de genotipo y linaje, de los HMPV detectados en base a la secuenciación parcial de la región codificante de la glicoproteína G de la envuelta. Caracterizar los posibles cambios genéticos de la glicoproteína G de la envuelta que pudiéramos describir por secuenciación.
3. Estudiar la epidemiología y el impacto clínico de la infección por HMPV en pacientes pediátricos y adultos, diferenciando según la diversidad genética observada.
4. Estudiar la secuencia del genoma completo de una selección de HMPV para describir su variabilidad, posibles eventos de recombinación, inserción y deleción, así como el resultado de la presión selectiva. Asimismo, implementar una herramienta de visualización de las secuencias obtenidas junto a otras de referencia, para poder monitorizar su evolución.





# Publicaciones



## 4 PUBLICACIONES

---

### 4.1 ESTUDIO 1

**Título:** Novel human metapneumovirus with a 180-nucleotide duplication in the G gene.

**Año de publicación:** 2017

**Revista:** Future Microbiology

**Factor de impacto (2020):** 3,165

**Cuartil (2020):** Q3

**Posición en la bibliografía de esta tesis:** (108)

**Referencia:** Piñana M, Vila J, Gimferrer L, Valls M, Andrés C, Codina MG, et al. Novel human metapneumovirus with a 180-nucleotide duplication in the G gene. Future Microbiol. 2017 Jun;12(7):565–71.

## SHORT COMMUNICATION

For reprint orders, please contact: [reprints@futuremedicine.com](mailto:reprints@futuremedicine.com)

## Novel human metapneumovirus with a 180-nucleotide duplication in the G gene

María Piñana<sup>1</sup>, Jorgina Vila<sup>2</sup>, Laura Gimferrer<sup>1</sup>, María Valls<sup>2</sup>, Cristina Andrés<sup>1</sup>, María Gema Codina<sup>1</sup>, Javier Ramón<sup>1</sup>, María Carmen Martín<sup>1</sup>, Francisco Fuentes<sup>1</sup>, Rosario Saiz<sup>1</sup>, Pilar Alcubilla<sup>1</sup>, Carlos Rodrigo<sup>2</sup>, Tomàs Pumarola<sup>1</sup> & Andrés Antón<sup>\*1</sup>

**Aim:** To describe the circulation, genetic diversity and clinical features of human metapneumovirus (HMPV) in pediatric patients that attended the Hospital Universitari Vall d'Hebron, Spain from 2014 to 2016. **Materials & methods:** Partial G gene was sequenced from laboratory-confirmed HMPV respiratory specimens for subsequent phylogenetic analysis. **Results:** A total of 121 different samples were HMPV laboratory-confirmed out of 6658 specimens received. The highest circulation was from February to April, with a prevalence of 3%. Different genetic groups within both genotypes were detected at variable levels. A 180-nucleotide duplication was first characterized within the G gene in nine cases, mostly related to lower respiratory-tract infection. **Conclusion:** This study reported on the circulation of a novel HMPV with a 180-nucleotide duplication in the G gene, but no clinical changes in related cases were observed. Their prevalence increased during the last season suggesting changes in viral features.

First draft submitted: 7 November 2016; Accepted for publication: 2 February 2017; Published online: 12 June 2017

Human metapneumovirus (HMPV) is an important etiologic agent of upper and lower respiratory tract infection (LRTI) in children, mainly during the winter and spring months [1]. Since its first isolation in the Netherlands in 2001 [2], a worldwide distribution has been reported. HMPV, which is an enveloped, negative-sense, single-stranded RNA virus, belongs to the Pneumoviridae family within Mononegavirales order together with human respiratory syncytial virus (HRSV) [1]. The G protein, one of the major envelope glycoproteins, is weakly immunogenic and protective, though it exhibits a significant genetic variability [3]. Two genotypes, HMPV-A and HMPV-B, which are also subdivided into subgenotypes and lineages (A1, A2a, A2b, B1 and B2), have been described [3].

The aim of this study was to describe the circulation, the molecular diversity and the clinical features of HMPV confirmed cases in the pediatric population that attended the Hospital Universitari Vall d'Hebron (HUVH), a tertiary 1200-bed hospital in Barcelona, from 2014 to 2015 and 2015–2016 seasons.

### Materials & methods

From October 2014 to May 2016, respiratory specimens (nasopharyngeal aspirates, nasal and pharyngeal swabs and bronchoalveolar washes) were received for the laboratory confirmation of respiratory viruses from pediatric patients (aged 0–18 years) that attended the HUVH with suspicion of a respiratory tract infection.

<sup>1</sup>Respiratory Viruses Unit, Virology Section, Microbiology Department, Hospital Universitari Vall d'Hebron, Vall d'Hebron Research Institute, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain

<sup>2</sup>Pediatric Hospitalization Unit, Department of Pediatrics, Hospital Universitari Materno Infantil Vall d'Hebron, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain

\*Author for correspondence: [aanton@vhebron.net](mailto:aanton@vhebron.net)

### KEYWORDS

- duplication
- evolution
- genetic diversity
- genotype
- G protein
- human metapneumovirus
- molecular epidemiology
- respiratory tract infection
- respiratory virus
- surveillance

SHORT COMMUNICATION Piñana, Vila, Gimferrer *et al.*

Respiratory viruses were detected either by immunocromatography (Binax Now RSV Card, Alere Scarborough, Inc., ME, USA), immunofluorescence (D<sup>3</sup> Ultra 8™ DFA Respiratory Virus Screening & Identification Kit, Diagnostic HYBRIDS, OH, USA) or real-time reverse transcription (RT)-PCR (Anyplex II RV16 Detection Kit, Seegene, Seoul, South Korea; GenXpert Flu/RSV XC, Cepheid Inc., CA, USA) assays. Total nucleic acids were extracted using NucliSense easyMAG (BioMérieux, Marcy l'Étoile, France), and kept at -80°C until use.

Partial *G* gene was sequenced from HMPV laboratory-confirmed samples for phylogenetic analysis. The amplification was performed using the One-Step RT-PCR Kit (Qiagen, Hilden, Germany) with two primer pairs: G forward (GF) and G reverse (GR) were designed for this study while G study forward (GSF) and G study reverse (GSR) were taken from a previous study (Table 1) [4]. Two primer pairs were necessary due to the high diversity presented by HMPV *G* gene. PCR products were purified using Exo-SAP-IT (USB, Affymetrix Inc., OH, USA) and sequenced by the ABI Prism Big Dye Terminator cycle sequencing kit v3.1 on the ABI PRISM 3130XL sequencer (Applied Biosystems, CA, USA). Nucleotide sequences were edited and assembled using MEGA v5.2 [5]. A collapse of the sequences to haplotypes was done with the ALingment Transformation EnviRonment [6]. Phylogenetic trees were then constructed using the maximum likelihood and the bootstrap methods (1000 replicates) as implemented in MEGA v5.2. The prediction of potential N- and O-glycosylation sites in the amino acid sequence of G protein was performed with the NetNGlyc and NetOglyc servers, respectively.

Clinical features of HMPV-laboratory confirmed cases were retrospectively reviewed from medical records. Data were analyzed using the IBM SPSS Statistics 22 software (NY, USA). Clinical data between cases infected by the

different genotypes were compared with the nonparametric median test and  $\chi^2$  test. Statistical significance was taken at the  $p < 0.05$  value.

Institutional Review Board approval (PR(AG)161/2016) was obtained from the HUVH Clinical Research Ethics Committee Respiratory.

### Results

A total of 6658 specimens from 4488 patients (2526 males, 56%; median age: 1.98 years; interquartile range [IQR]: 0.54–5.28 years) were collected, of which 128 samples (2%) from 121 patients (3%) were HMPV laboratory-confirmed (69 males, 57%; median age: 1.45 years; IQR: 0.65–3.14). The detection rates of other respiratory viruses during the study period were as follows (in descendant order): rhinovirus (13%), HRSV (13%), influenza A virus (7%), influenza B virus (6%), human adenovirus (5%), enterovirus (2%), human bocavirus (1%), human parainfluenza virus (HPIV)-3 (1%), human coronavirus (HCoV) OC43 (1%), HCoV NL63 (1%), HPIV-1 (1%), HPIV-4 (<1%), HPIV-2 (<1%) and HCoV 229E (<1%).

All HMPV laboratory-confirmed pediatric patients were hospitalized due to a respiratory tract infection or developed it during their hospitalization. The highest weekly circulation was reported from February to April in both seasons. In most of cases (94, 78%) HMPV was single detected, but co-infections were also detected (27, 22%) with two or more respiratory viruses such as rhinovirus (RV; 8, 7%), human bocavirus (7, 6%), adenovirus (6, 5%), HCoV OC43 (3, 2%), HRSV (2, 2%), enterovirus (2, 2%) and HCoV NL63 (2, 2%).

Phylogenetic analyses of *G* sequences (Figure 1) from all 109 (90%) HMPV laboratory-confirmed specimens revealed that both genotypes, HMPV-A (59; 54%) and HMPV-B (50; 46%), cocirculated throughout the study period. The remaining 12 (10%) cases could not be sequenced. HMPV-B genotype predominated

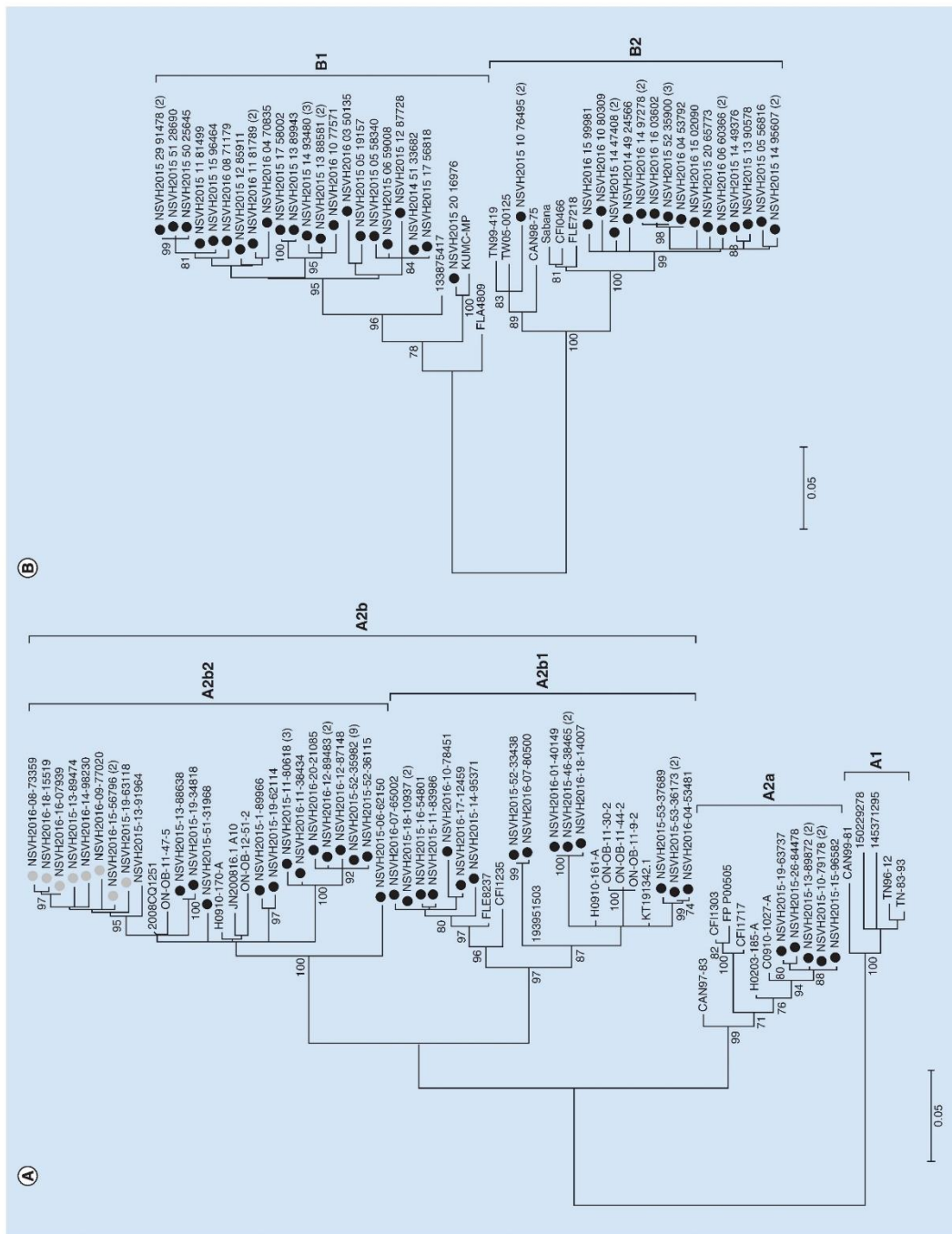
Table 1. Conditions for amplifying *G* gene.

Name	Sequence (5' → 3')	One Step RT-PCR conditions	Position in CAN97-83	Amplicon length
GF	AAACAARAARTGGGACAA	50°C × 30' - 95°C × 15' - 50 cycles (95°C × 30'' - 50°C × 30'' - 72°C × 1'15'') - 72°C × 10'	6207–6225	934 bp
GR	GGATCCATTGGYATTTTRTC	30'' - 72°C × 1'15'' - 72°C × 10'	7140–7122	
<sup>1</sup> GSF	GAGAACATTCGRRCRATAGAYATG	50°C × 30' - 95°C × 15' - 45 cycles (95°C × 30'' - 59°C × 30'' - 72°C × 1'15'') - 72°C × 10'	6247–6270	924 bp
<sup>2</sup> GSR	AGATAGACATTRACAGTGGATTCA	30'' - 72°C × 1'15'' - 72°C × 10'	7170–7147	

<sup>1</sup>Primers designed by Ludewick *et al.* in [4].

Gf: G forward; Gr: G reverse; Gsf: G study forward; Gsr: G study reverse; RT: Reverse transcription.

Novel HMPV with a 180-nucleotide duplication **SHORT COMMUNICATION**



SHORT COMMUNICATION Piñana, Vila, Gimferrer *et al.*

**Figure 1** (see previous page). **Phylogenetic reconstructions of partial G nucleotide sequences of detected HMPV.** (A) Phylogenetic tree of G sequences from 59 HMPV-A and (B) 50 HMPV-B viruses together with reference sequences from previous epidemiological studies downloaded from GenBank (accession numbers are shown next to the strain name). The analyses were performed on G sequences from nucleotide position 6340–6891 in reference to CAN97-83 strain (accession number AY297749). Numbers at the tree branch nodes represent the measure of support calculated by the bootstrap method (1000 replicates); only those exceeding 70% are shown. Sequences marked with a solid black circle do not contain any remarkable genetic event, while sequences marked with a solid grey circle carry the 180-nucleotide duplication. HMPV: Human metapneumovirus.

during the 2014–2015 season, whereas HMPV-A genotype predominated during the 2015–2016 season (Figure 2). Phylogenetic analysis also revealed that seven (6%) sequences belonged to A2a lineage, 52 (48%) to A2b, 27 (25%) to B1 subgenotype and 23 (21%) to B2. Furthermore, two sublineages within the A2b lineage that were previously reported [7] could be distinguished, A2b1 (19 strains) and A2b2 (33 strains), with bootstrap values over 95% (Figure 1) and an intergroups genetic distance of 13.5%.

The molecular characterization of G sequences belonging to the A2b2 sublineage revealed a 180-nucleotide duplication in the ectodomain (462–463 nucleotide position related to JX082177) in nine different samples (27%; Supplementary Table 2), which mostly (7; 78%) circulated during the 2015–2016 season. The appearance of this duplication implies the acquisition of between 23 and 26 new putative O-glycosylation sites (Supplementary Table 2). However, there was also a strain (NSVH2015-13-1964) which coclustered with the duplication strains (Figure 1), but it did not itself possess the duplication.

Overall, HMPV caused LRTI in 89 (74%) children, especially in those infected by A2b lineage (44/52; 85%) and B2 subgenotype (19/23; 83%). The 79% (61/77) of patients admitted at the emergency department with LRTI required hospitalization (median length of stay: 4 days, IQR: 2.5–7). The remaining 12 out of 89 (13.5%) were admitted for other reasons or developed it during hospitalization.

Children admitted at the emergency department with B2 LRTIs (11/61, 18%) seemed to have longer hospital stays (median: 6 days; IQR: 3–8,  $p = 0.31$ ). Children hospitalized with B1 LRTIs (13/16, 81.2%) and B2 LRTIs (10/15, 66.67%) also appeared to have longer supplementary oxygen requirements (median: 4 days each; B1 IQR: 2.5–5; B2 IQR: 2.5–9;

$p = 0.53$ ). Four out of 44 A2b LRTI cases (9%) and two out of 19 B2 LRTI cases (11%) required mechanical ventilation (MV).

Most cases (7/9, 78%) of children infected with viruses carrying the 180-nucleotide duplication had LRTI, compared with 37/43, 81.4% of children with A2b without the duplication ( $p = 0.53$ ). Both groups had similar hospitalization rate, 6/7 patients, 85.7% the first group compared with (30/37 patients, 81.1%) in the second ( $p = 0.78$ ), the first group with a median hospital stay of 3 days (IQR: 2–2.5). The median oxygen requirements were 3 days in both groups but in the duplication group 5/6 patients (83.3%) required oxygen, one (14%) with MV, compared with 73.3% of patients in the second group (22/30) that required oxygen ( $p = 0.26$ ), three (13.6%) with MV.

The sequences of the present study were submitted to GenBank with accession numbers KX829061–KX829169.

### Discussion

The present study mainly described the prevalence and genetic diversity of HMPV detected in our hospital, and the clinical features of cases infected by a novel HMPV.

The HMPV prevalence in the present study was similar to data (3–14%) reported worldwide [8–10]. In most cases single HMPV infection was laboratory confirmed, but as in previous studies coinfection with other respiratory viruses is not rare [11]. HMPV is one of the most frequent respiratory viruses in our hospital with the only exceptions of RV, influenza A and B viruses, HRSV and adenovirus. Influenza viruses and HRSV circulate during the seasonal epidemic causing a high morbidity in a short period of time, different from RV that circulates throughout the year without showing a clear pattern of seasonality [12]. We postulate that this is the reason



why coinfection of HMPV with RV was the most reported co-infection. HMPV was mostly detected during late winter and early spring months, as previously described in other Spanish regions [9–11]. Distinct phylogenetic groups cocirculated with variable seasonal predominance as reported [3,10], except the A1 sub-genotype, that has not reported since 2006 [3].

To our knowledge, the present study is the first description of a genetic duplication in the metapneumovirus genera, as it has never been reported before neither for human nor avian metapneumovirus. A similar genetic event occurred in ON1 and BA genotypes of HRSV, with a 72- and 60-nucleotide duplication in the *G* gene, respectively. Recently, Leyrat *et al.* [13] hypothesized that G protein had a shielding function due to its heavy glycosylation, protecting F protein from the action of neutralizing antibodies. The 180-nucleotide duplication of HMPV G protein therefore would provide between 23 and 26 additional potential O-glycosylation sites, conferring new antigenic properties to the virus. Despite the emergence of these variants was not possible to be traced, an increase in the prevalence of the strains carrying the 180-nucleotide duplication during the second season suggests changes in the phenotypic features of these viruses. If HMPV A2b2 strains became predominant in the near future, it might be because this duplication increases the viral biological fitness, as recently reported for the current predominant HRSV viruses (ON1 and BA genotypes) [14–16]. This finding highlights the importance of monitoring the prevalence of these novel viruses in next seasons. However, further phenotyping studies can nowadays be performed in order to characterize the antigenic properties, virulence or biological fitness associated with this duplication.

Regarding the clinical relevance, HMPV infection was related to LRTI in the majority of cases, mainly in A2b and B2 viruses, of which a 10% required MV. A more severe respiratory disease was not related to viruses carrying the 180-nucleotide duplication, because no statistical difference was found between cases with or without duplication. However, the number of samples was limited and the period of study was restricted to two seasons, therefore circulation of the novel variant should be monitored during the following seasons. In case of the spread and predominance of this variant in a near future, a more pathogenic nature cannot be discarded.

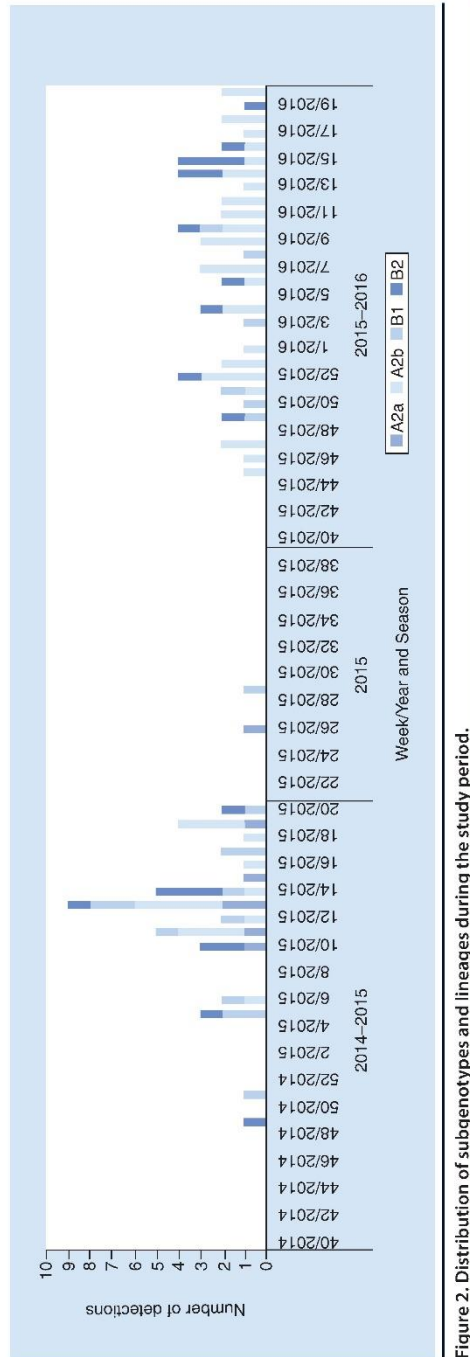


Figure 2. Distribution of subgenotypes and lineages during the study period.

**SHORT COMMUNICATION** Piñana, Vila, Gimferrer *et al.*

In summary, the present study highlights the virological surveillance of HMPV in order to describe a clear pattern of circulation and their genetic diversity in our geographical area. In addition, this virological surveillance might help to monitor the circulation of viruses carrying genetic changes, such as single mutations, or duplication events as first reported in this study, that might affect antigenic or tropism features.

**Conclusion**

Recent and valuable data of prevalence, seasonality and genetic diversity of circulating HMPV in Catalonia, Spain, is reported. Moreover, this study, as part of the continuous surveillance of respiratory viruses in HUVH, has permitted the finding of a novel HMPV variant. This is the description of the first duplication event in HMPV genome, concretely in the G gene. This gene is hypothesized to have a role in immune evasion by shielding its own epitopes and F protein's from neutralizing antibodies, and this mutation might alter it. Furthermore, future studies are required to characterize the functional effect of this duplication and its implication in human infection, as well as, to study other viral targets to explore new prophylactic and therapeutic strategies.

**Future perspective**

The knowledge regarding circulating HMPV is limited since it was discovered 16 years ago. Many viral proteins' roles still remain to be understood. Future studies are required in order to describe the virus–host interplay, the amino

acid epitopes related to antigenicity and how it evades the host's innate and adaptive immune system, which will help to improve or to explore novel therapeutic and prophylactic strategies. In addition, the analysis of the molecular evolution to date the emergence of these novel viruses might be of interest for further knowledge on these mutation events in RNA viruses.

**Supplementary data**

To view the supplementary data that accompany this paper please visit the journal website at: [www.futuremedicine.com/doi/full/10.2217/fmb-2016-0211](http://www.futuremedicine.com/doi/full/10.2217/fmb-2016-0211)

**Financial & competing interests disclosure**

This work was partially supported by Plan Nacional de I + D + I 2008–2011 and by Instituto de Salud Carlos III, Subdirección General de Redes y Centros de Investigación Cooperativa, Ministerio Español de Economía y Competitividad, Spanish Network for Research in Infectious Diseases (REIPI RD12/0015/0003); by Fondo de Investigación Sanitaria, Ministerio Español de Economía y Competitividad (grant FIS PI14/01838); and European regional development fund (ERDF). The authors have no other relevant affiliations or financial involvement with any organization or entity with a financial interest in or financial conflict with the subject matter or materials discussed in the manuscript apart from those disclosed.

No writing assistance was utilized in the production of this manuscript.

**Ethical considerations**

Institutional Review Board approval (PR(AG)161/2016) was obtained from the HUVH Clinical Research Ethics Committee Respiratory.

**EXECUTIVE SUMMARY****Molecular epidemiology of human metapneumovirus in Catalonia, Spain**

- The prevalence (3%) and seasonality (February–April) of human metapneumovirus (HMPV) was similar to that previously described in other Spanish regions.
- Both HMPV genotypes (A and B) circulated in both seasons, but a shift in the predominance from HMPV-A to HMPV-B was observed.
- Two sublineages (A2b1 and A2b2) could be clearly distinguished within A2b lineage.

**Description of the first duplication event in human metapneumovirus**

- A 180-nucleotide duplication was observed in the ectodomain of the G protein, which to our knowledge is the first genetic duplication event in the *Metapneumovirus* genus.
- This duplication is longer than that reported for the G protein of the two current human respiratory syncytial virus circulating genotypes, BA and ON1, which have been characterized as an enhancer of the viral biological fitness, and in consequence these variants became predominant.
- HMPV G protein has been proposed to have a shielding function over the neighboring envelope proteins due to its

hyperglycosylated nature. This function could be enhanced due to a longer length of this protein by the 60 amino acid duplication because it provides 23–26 additional potential O-glycosylation sites.

#### Clinical features of the human metapneumovirus infection

- The majority of patients infected by A2b and B2 genetic variants suffered from a lower respiratory tract infections.
- A2b2 viruses carrying this duplication did not seem to be associated with a higher severity of disease in comparison with those without it. However, the number of samples studied was too small and restricted to two seasons. So, virological surveillance during the following seasons should be performed to monitor their circulation. In case of reporting a predominance of these viruses, a more pathogenic nature could not be discarded. However, phenotyping characterization of these genetic variants must be additionally performed.

#### Conclusion

- Virological surveillance should be strengthened to monitor the emergence and spread of novel HMPV carrying genetic changes that might affect the viral properties.
- Further studies must be carried out to characterize the functional effect of this duplication, as well as, to study the roles of the several viral proteins to explore new prophylactic and therapeutic strategies.

#### References

Papers of special note have been highlighted as:  
• of interest; •• of considerable interest

- Panda S, Mohakud NK, Pena L, Kumar S. Human metapneumovirus: review of an important respiratory pathogen. *Int. J. Infect. Dis.* 25, 45–52 (2014).
- Van den Hoogen BG, De Jong JC, Groen J *et al.* A newly discovered human pneumovirus isolated from young children with respiratory tract disease. *Nat. Med.* 7(6), 719–724 (2001).
- Human metapneumovirus (HMPV) discovery as a previously unidentified virus in pediatric patients with respiratory tract infection causing *in vitro* cytopathic effects and clinical symptoms similar to that of human respiratory syncytial virus.**
- Papenburg J, Carbonneau J, Isabel S *et al.* Genetic diversity and molecular evolution of the major human metapneumovirus surface glycoproteins over a decade. *J. Clin. Virol.* 58(3), 541–547 (2013).
- A1 HPMV has not been detected worldwide since 2006. G is a highly variable protein with the positively selected sites in its ectodomain, though being weakly immunogenic.**
- Ludewick HP, Abed Y, Van Niekerk N, Boivin G, Klugman KP, Madhi SA. Human metapneumovirus genetic variability, South Africa. *Emerg. Infect. Dis.* 11(7), 1074–1078 (2005).
- Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S. MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol. Biol. Evol.* 28(10), 2731–2739 (2011).
- Glez-Peña D, Gómez-Blanco D, Reboiro-Jato M, Fdez-Riverola F, Posada D. ALTER: program-oriented conversion of DNA and protein alignments. *Nucleic Acids Res.* 38(Suppl. 2), 14–18 (2010).
- Regev L, Meningher T, Hindiyeh M, Mendelson E, Mandelboim M. Increase human metapneumovirus mediated morbidity following pandemic influenza infection. *PLoS ONE* 7(4), 2–7 (2012).
- Genetic analysis of HPMV strains in Israel revealed the circulation of viruses belonging to two new sublineages within A2b lineage: A2b1 and A2b2.**
- Manoha C, Espinosa S, Aho S, Pothier P. Epidemiological and clinical features of hMPV, RSV and RVs infections in young children. *J. Clin. Virol.* 38, 221–226 (2007).
- García-García ML, Calvo C, Martín F, Pérez-Breña P, Acosta B, Casas I. Human metapneumovirus infections in hospitalised infants in Spain. *Arch. Dis. Child.* 91(4), 290–295 (2006).
- Reiche J, Jacobsen S, Neubauer K *et al.* Human metapneumovirus: Insights from a ten-year molecular and epidemiological analysis in Germany. *PLoS ONE* 9(2), e88342 (2014).
- Camps M, Ricart S, Dimova V *et al.* Prevalence of human metapneumovirus among hospitalized children younger than 1 year in Catalonia, Spain. *J. Med. Virol.* 80, 1452–1460 (2008).
- Antón A, Marcos M, Torner N *et al.* Virological surveillance of influenza and other respiratory viruses during six consecutive seasons from 2006 to 2012 in Catalonia, Spain. *Clin. Microbiol. Infect.* 22(6), 1–9 (2016).
- Leyrat C, Paesen GC, Charleston J, Renner M, Grimes JM. Structural insights into the human metapneumovirus glycoprotein ectodomain. *J. Virol.* 88(19), 11611–11616 (2014).
- The extracellular region of G gene is heavily glycosylated, property which could be implicated in the modulation of immune responses by shielding neighboring proteins.**
- Ren L, Xia Q, Xiao Q *et al.* The genetic variability of glycoproteins among respiratory syncytial virus subtype A in China between 2009 and 2013. *Infect. Genet. Evol.* 27, 339–347 (2014).
- ON1 human respiratory syncytial virus genotype, which carries a 72-nucleotide duplication within the G protein, has spread worldwide and become predominant.**
- Schobel SA, Stuecker KM, Moore ML *et al.* Respiratory Syncytial Virus whole-genome sequencing identifies convergent evolution of sequence duplication in the C-terminus of the G gene. *Sci. Rep.* 6(May), 26311 (2016).
- Convergent evolution and fixation of the sequence duplication in ON1 human respiratory syncytial virus was revealed, suggesting a potential increase in the viral biological fitness.**
- Hotard AL, Laikhter E, Brooks K, Hartert TV, Moore ML. Functional analysis of the 60-nucleotide duplication in the respiratory syncytial virus Buenos Aires strain attachment glycoprotein. *J. Virol.* 89(16), 8258–8266 (2015).
- The advantageous fitness of BA human respiratory syncytial viruses was related to the 60-nucleotide duplication in the ectodomain of the G protein.**

## 4.2 ESTUDIO 2

**Título:** Insights into immune evasion of human metapneumovirus: novel 180- and 111-nucleotide duplications within viral G gene throughout 2014-2017 seasons in Barcelona, Spain.

**Año de publicación:** 2020

**Revista:** Journal of Clinical Virology

**Factor de impacto (2020):** 3,168

**Cuartil (2020):** Q3

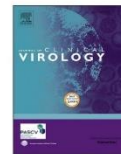
**Posición en la bibliografía de esta tesis:** (109)

**Referencia:** Piñana M, Vila J, Maldonado C, Galano-Frutos JJ, Valls M, Sancho J, et al. Insights into immune evasion of human metapneumovirus: novel 180- and 111-nucleotide duplications within viral G gene throughout 2014-2017 seasons in Barcelona, Spain. J Clin Virol. 2020 Nov;132(August):104590.



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Clinical Virology

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/jcv](http://www.elsevier.com/locate/jcv)

## Insights into immune evasion of human metapneumovirus: novel 180- and 111-nucleotide duplications within viral G gene throughout 2014-2017 seasons in Barcelona, Spain

Maria Piñana<sup>a</sup>, Jorgina Vila<sup>b</sup>, Carolina Maldonado<sup>c</sup>, Juan José Galano-Frutos<sup>d,e</sup>, Maria Valls<sup>b</sup>, Javier Sancho<sup>d,e,f</sup>, Francesc Xavier Nuvials<sup>c</sup>, Cristina Andrés<sup>a</sup>, María Teresa Martín-Gómez<sup>a</sup>, Juliana Esperalba<sup>a</sup>, Maria Gema Codina<sup>a</sup>, Tomàs Pumarola<sup>a,\*</sup>, Andrés Antón<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Respiratory Viruses Unit, Microbiology Department, Vall d'Hebron Institut de Recerca (VHIR), Vall d'Hebron Hospital Universitari, Vall d'Hebron Barcelona Hospital Campus, Universitat Autònoma de Barcelona, Passeig Vall d'Hebron 119-129, 08035 Barcelona, Spain

<sup>b</sup> Paediatric Hospitalization Unit, Paediatrics Department, Hospital Universitari Maternoinfantil Vall d'Hebron, Vall d'Hebron Barcelona Hospital Campus, Universitat Autònoma de Barcelona, Passeig Vall d'Hebron 119-129, 08035 Barcelona, Spain

<sup>c</sup> Intensive Care Department, Vall d'Hebron Hospital Universitari, Vall d'Hebron Barcelona Hospital Campus, Universitat Autònoma de Barcelona, Passeig Vall d'Hebron 119-129, 08035 Barcelona, Spain

<sup>d</sup> Biochemistry and Molecular and Cell Biology Department, Sciences Faculty, Universidad de Zaragoza, Zaragoza, Spain

<sup>e</sup> Biocomputation and Complex Systems Physics Institute (BIFI), Joint Units BIFI-IQFR (CSIC) and GBs-CSIC, Universidad de Zaragoza, Zaragoza, Spain

<sup>f</sup> Aragon Health Research Institute (IIS Aragón), Zaragoza, Spain

### ARTICLE INFO

#### Keywords:

Human metapneumovirus duplication  
steric shielding  
epidemiology  
genetic diversity  
clinical impact

### ABSTRACT

**Background:** Human metapneumovirus (HMPV) is an important aetiological agent of respiratory tract infection (RTI). This study aimed to describe its genetic diversity and clinical impact in patients attended at a tertiary university hospital in Barcelona from the 2014-2015 to the 2016-2017 seasons, focusing on the emerging duplications in G gene and their structural properties.

**Methods:** Laboratory-confirmed HMPV were characterised based on partial-coding F and G gene sequences with MEGA.v6.0. Computational analysis of disorder propensity, aggregation propensity and glycosylation sites in viral G predicted protein sequence were carried out. Clinical data was retrospectively reviewed and further associated to virological features.

**Results:** HMPV prevalence was 3%. The 180- and 111-nucleotide duplications occurred in A2c lineage G protein increased in prevalence throughout the study, in addition to short genetic changes observed in other HMPV lineages. The A2c G protein without duplications was calculated to protrude over F protein in 23% of cases and increased to a 39% and a 46% with the 111- and 180-nucleotide duplications, respectively. Children did not seem to be more affected by these mutant viruses, but there was a strong association of these variants to LRTI in adults.

**Discussion:** HMPV presents a high genetic diversity in all lineages. Novel variants carrying duplications might present an evolutionary advantage due to an improved steric shielding, which would have been responsible for the reported increasing prevalence and the association to LRTI in adults.

### 1. INTRODUCTION

Human metapneumovirus (HMPV) is an important aetiological agent of upper and lower respiratory tract infections (URTI and LRTI) in children and adults [1].

HMPV belongs to the Pneumoviridae family together with human

respiratory syncytial virus (HRSV) [2], causing an indistinguishable symptomatology [1]. HMPV is an enveloped, lineal, negative-sense, single-stranded RNA virus, classified into HMPV-A and HMPV-B genotypes and subdivided into subgenotypes A1, A2 (A2a, A2b and A2c lineages) [1,3,4], B1 and B2 (B2a and B2b lineages) [5].

The fusion (F) and the attachment (G) proteins are the major

\* Corresponding author: Respiratory Viruses Unit, Microbiology Department, Vall d'Hebron Institut de Recerca (VHIR), Vall d'Hebron Hospital Universitari, Vall d'Hebron Barcelona Hospital Campus, Universitat Autònoma de Barcelona, Passeig Vall d'Hebron 119-129, 08035 Barcelona, Spain.

E-mail address: [virusrespiratoris@vhebron.net](mailto:virusrespiratoris@vhebron.net) (T. Pumarola).

<https://doi.org/10.1016/j.jcv.2020.104590>

Received 4 May 2020; Received in revised form 24 July 2020; Accepted 10 August 2020

Available online 11 August 2020

1386-6532/© 2020 Elsevier B.V. All rights reserved.

season and 43/2016-11/2017 in the third season. Overall these 14,769 patients, 11,185 (76%) samples were collected during all 3 consecutive HRSV/influenza epidemics and 3,584 (24%) out of these epidemics (Supplementary Table 1). Regarding the methods for detection, from all these 14,769 patients, 3,316 samples (22%) were tested with the immunofluorescence assay, while 8,483 (57%) were tested with the real-time RT-PCR multiplex assays. Importantly, 656 (4%) samples which tested negative for the immunofluorescence assay were re-tested with the real-time RT-PCR multiplex assays. The remaining samples had been tested with a rapid test. The use of immunofluorescence and PCR-based assays were changing throughout the period of study, decreasing for immunofluorescence assays and increasing for molecular methods (59% vs 27% in 2014-2015; 15% vs 57% in 2015-2016 and <1% vs 74% in 2016-2017, respectively).

HMPV was laboratory-confirmed in 423 (2%) respiratory samples (nasopharyngeal swabs or aspirates, bronchoaspirates, bronchoalveolar washes or tracheal aspirates) from 407 (3%) patients, 221 (3%) of them occurring in the paediatric population and 186 (3%) in adults, showing an important prevalence in the adult population, higher than in children in the 2015-2016 season (Table 2). This prevalence varied according to whether it was during HRSV/influenza epidemics or not (Supplementary Table 1). During the HRSV/influenza epidemics, 82-95% of HMPV laboratory-confirmed samples previously had a negative result in the rapid tests for HRSV and influenza. Over the 3 seasons, the proportion of HMPV laboratory-confirmed samples tested by immunofluorescence decreased while those tested by PCR-based assays increased (61%-11%-0% vs 47%-91%-100%, respectively and by season).

75/407 (18%) HMPV cases presented co-infections with 88 respiratory viruses: rhinovirus (26, 30%), adenovirus (15, 17%), human bocavirus (15, 17%), enterovirus (11, 13%), HRSV (6, 7%), human coronavirus (HCoV) 229E (5, 6%), HCoV OC43 (5, 6%), HCoV NL63 (2, 2%), human parainfluenza 3 (1, 1%), influenza A (1, 1%) and B (1, 1%).

Weekly distribution of HMPV showed a higher circulation from February to April in the first two seasons, but started at mid December in 2016-2017 season (Fig. 1B). The peaks of incidence of the first two seasons were in March, but the last season presented a pattern with two peaks.

### 3.2. Genetic characterisation of viral strains

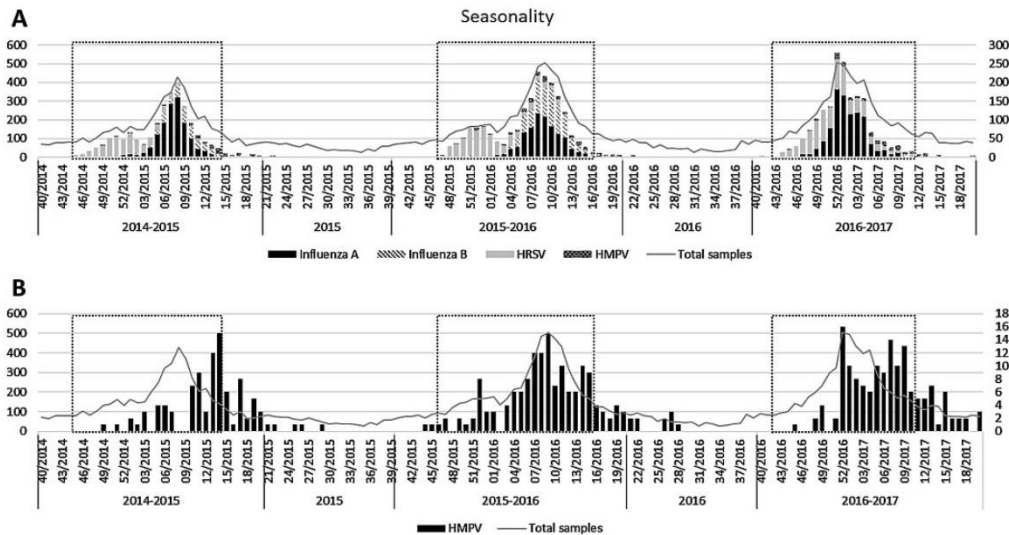
Phylogenetic analyses of HMPV F and G sequences from 387 strains revealed that HMPV-A (201/387, 52%) and HMPV-B (185/387, 48%) co-circulated, one HMPV-A/B was observed. The remaining 20/407 (5%) HMPV could not be characterised due to low RNA quality or low viral load. HMPV-B (61%) predominated during the 2014-2015 season and HMPV-A (62%) during 2015-2016. No difference in circulation was observed during the 2016-2017 season (Table 3).

Phylogenetic analyses of F (382, 94%) and G (365, 90%) sequences (Fig. 2) showed congruent results. Overall, 11 (3%) samples belonged to A2a, 37 (10%) to A2b, 153 (40%) to A2c, 106 (27%) to B1 and 79 (20%) to B2 (Table 3).

Genetic characterisation of A2 G revealed that A2a and A2c sequences generally had a length of 220 aa, and A2b of 218 due to premature stop codons. Genetic characterisation of 153 A2c strains revealed the presence of the novel 180- (A2c<sub>180dup</sub>; 46; 30%) and 111-nucleotide (A2c<sub>111dup</sub>; 13; 9%) duplications into G ectodomain with increasing prevalence (Table 3). While all A2c<sub>180dup</sub> clustered together, two subgroups could be observed in the F phylogenetic tree (Fig. 2). Differently, A2c<sub>111dup</sub> G clustered into 2 groups but their F genes clustered together (except NSVH2017-09-82477).

B1 G clustered into two phylogenetic groups (I and II), differing in the acquisition of a premature stop codon in the 232 aa (relative to KU375606) in all strains belonging to group II (Fig. 2), but one (NSVH2015-12-87728). In addition, two sequences presented deletions of one (NSVH2017-04-59510) or two aa (NSVH2016-03-50135). Genetic characterisation of 10 B2a and 69 B2b G sequences revealed the acquisition of short duplications. Whereas B2a group, represented by CAN98-75 strain (AY297748), presented the aa KE in the 160-161 positions, B2b group presented 1 or 2 duplications (KEKE and KEKEKE). Also, a group differed from the rest of B2b group presenting an R after only one KE, which could probably be a mutation of the duplication of K (Fig. 2).

The sequences of the present study were submitted to GenBank (MN617398-MN617753).



**Fig. 1. Seasonality.** The X-axis represent the timeline of the study, the left Y-axis represents the number of total samples received and the right Y-axis represent the number of samples of each specific virus. HRSV/influenza epidemics period are framed in a black dotted box. A) shows the seasonality of HRSV, Influenza A virus, Influenza B virus and HMPV. B) shows the seasonality of HMPV.

envelope glycoproteins. F protein is the major cross-protective antigenic determinant and is highly conserved between genotypes (88%) [4]. Hence, it is the main target for most vaccine strategies under development [6]. Differently, G protein is weakly immunogenic [7], with 28% genetic divergence between genotypes and 74–82% intra-genotype [4]. In addition, 180- and 111-nucleotide duplications have been recently described into G protein's ectodomain [8–11].

The aims of this study were to describe circulation pattern, genetic diversity and clinical impact of HMPV in paediatric and adult population attended at a tertiary university hospital in Barcelona from the 2014–2015 to the 2016–2017 seasons, focusing on the emergence and spread of variants carrying these two nucleotide duplications.

## 2. MATERIALS AND METHODS

### 2.1. Sample collection

From October/2014 to May/2017, respiratory specimens (nasopharyngeal aspirates, nasal and pharyngeal swabs, bronchoaspirates, bronchoalveolar, bronchoselective and tracheal washes and sputums) were received for the laboratory confirmation of respiratory viruses from children and adults attended at the Hospital Universitari Vall d'Hebron with suspicion of respiratory tract infection (RTI). Institutional Review Board approval (PR(AG)161/2016) was obtained from the hospital's Clinical Research Ethics Committee.

### 2.2. Respiratory viruses' detection

During the HRSV and influenza epidemics, rapid tests were performed for a fast diagnosis, which were based on immunocromatography (Alere BinaxNOW® Influenza A&B/RSV, Alere, USA), immunofluorescence (Sofia RSV FIA, Quidel, USA) or real-time RT-PCR (GenXpert Flu/RSV XC, Cepheid, USA). Samples received out of HRSV/FLUV epidemics or negative for rapid tests were analysed by immunofluorescence (D3 Ultra 8™ DFA Respiratory Virus, Diagnostic HYBRIDS, USA) or mainly by real-time RT-PCR (Anyplex II RV16, Seegene, Korea, until 2015; Allplex Respiratory Panels 1–3, Seegene, Korea, since 2015). Total nucleic acids were extracted using NucliSense easyMAG (Bio-Mérieux, Marcy l'Etoile) and kept at -80 °C.

### 2.3. HMPV phylogenetic analysis

Both partial F and G genes were retrospectively sequenced from all HMPV laboratory-confirmed samples. The amplification was performed using the One-Step RT-PCR kit (Qiagen, Hilden, Germany), conditions in Table 1. PCR products were purified using Exo-SAP-IT (USB, Affymetrix Inc., Cleveland, USA) and sequenced by the ABI Prism BigDye Terminator v3.1 (Applied Biosystems, Carlsbad, USA) on the ABI PRISM 3130xl Genetic Analyzer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA). Nucleotide sequences were edited and assembled using MEGA v6.0 [12]. A collapse to haplotypes was done with ALTER server [13]. The best fit

substitution model was determined by MEGA v6.0, and the lowest Bayesian information criterion score model was used and evaluated with 1,000 bootstrap resamplings.

### 2.4. Computational analysis, generation of unfolded ensembles and geometric analyses of G predicted protein sequence

The propensity to adopt disordered conformations of three G sequences with and without nucleotide duplications was analysed using the MetaDisorder server [14], their propensity to aggregate using the Pasta 2.0 server [15], and the prediction of potential N- and O-glycosylation sites using NetNGlyc 1.0 [16] and NetOglyc 4.0 [17] servers, respectively.

Ensembles consisting of 2,000 unfolded conformations were generated for each of the three G sequences using the ProtSA server [18]. The PDB file of each conformation was analysed to compute the distance between the N atom of the first extracellular residue (Asn52) and the more distant atom, as well as the radius of gyration of the particular conformation.

### 2.5. Clinical features

Demographic (age and sex) and clinical features (URTI/LRTI, comorbidities, co-infections, antibiotic use, need, type and length of respiratory support, length of hospital stay, ICU admission or exitus) of HMPV-laboratory confirmed cases were retrospectively reviewed from medical records and related to viral features. Patients included in the demographic study were those with clinical presentation of URTI or LRTI, whilst patients with other symptoms rather than respiratory were excluded from the study. For the severity study, only patients hospitalised due to LRTI were included, and exclusion criteria were those cases with other symptoms rather than LRTI and hospitalisation due to other clinical reasons even though the patient manifested RTI.

### 2.6. Statistical analysis

Data were analysed with R software v3.5.1. For categorical data, Chi-squared or Fisher's exact test were performed. For numerical variables, t student, Mann-Whitney, ANOVA or Kruskal-Wallis tests were performed according to the need. Statistical significance was taken at the p-value <0.05.

## 3. RESULTS

### 3.1. HMPV epidemiology

A total of 20,132 samples of 14,769 patients were tested, of which 9,370 (47%) were laboratory-confirmed for at least one respiratory virus. Though being in a similar period, HRSV and influenza epidemics varied between seasons (Fig. 1A), being established during weeks 45/2014–13/2015 in the first season, 47/2015–16/2016 in the second

**Table 1**  
Primers and PCR conditions.

Gene	Primers	CAN97-83		PCR conditions	Fragment length (bp)	Reference
		Initial position	Final position			
G	GF: GAGAACATTGRRRCRATAGAYA	6,247	6,268	50°C×30' – 95°C×15' – 45x (95°C×30" – 59°C×30" – 72°C×1') 72°C×10'	924	Ludewick HP et al., 2005
	GR: AGATAGACATTACAGTGGATT	7,149	7,170			
	FF: CAATGCWGRATAACACCAGC	3,693	3,713			
F	FR: ATTGAAYTGATCYTCAGGAAAC	4,416	4,437	50°C×30' – 95°C×15' – 45x (95°C×30" – 55°C×30" – 72°C×1') 72°C×10'	745	Designed for this study

### 3.3. Structural biology of G protein

The ectodomain ensemble of the non-glycosylated form of G protein of NSVH2015-06-62150 (A2c<sub>wt</sub>) was simulated [18–20], resulting in a composition of conformations with maximal length ( $D_{max}$ ) of 4.5–22.2 nm and radii of gyration ( $R_g$ ) of 1.9–7.4 nm (Fig. 3).

The MetaDisorder server predicted that both duplications were as fully disordered as A2c<sub>wt</sub>, with no self-aggregation segments. Also, the glycosylation pattern showed a similar distribution of the numerous O-glycosylation sites (Fig. 4), with 23–26 additional O-glycosylation sites in A2c<sub>180dup</sub> and 12–13 in A2c<sub>111dup</sub>.

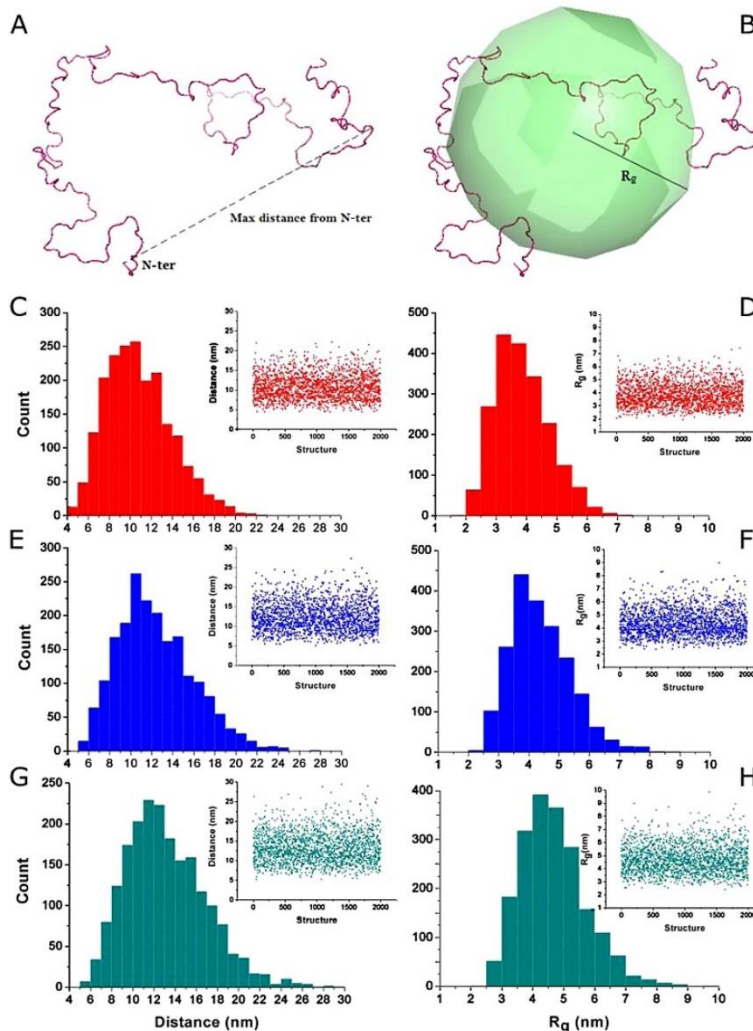
Once verified that duplications did not differ from A2c<sub>wt</sub>, 2000-conformation unfolded ensembles were generated for NSVH2017-09-78834 (A2c<sub>111dup</sub>) and NSVH2015-19-63118 (A2c<sub>180dup</sub>). A2c<sub>111dup</sub> increased size to  $D_{max}$  5.1–27.3 nm and  $R_g$  2.4–9.0 nm, while A2c<sub>180dup</sub> increased  $D_{max}$  5.2–29.4 nm and  $R_g$  2.4–9.9 nm (Fig. 3).

The pre-fusion conformation of the F trimer is calculated to protrude 13 nm [21]. According to the distance distributions of the three ensembles, the actual fraction of G protein's ectodomain protruding more than 13 nm from the membrane amounts to 23% in the A2c<sub>wt</sub>, and it increases to 39% in A2c<sub>111dup</sub> and 46% and A2c<sub>180dup</sub>.

### 3.4. Clinical impact of human metapneumovirus

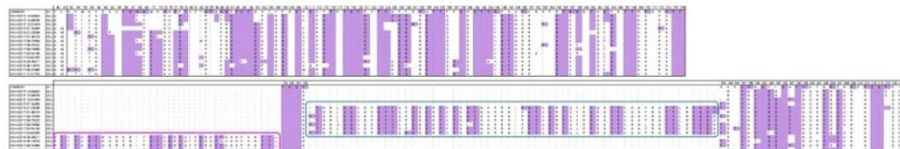
Due to the absence of clinical information (2), non-amplification (20) or manifestation of other syndromes rather than URTI or LRTI (20), clinical features of 203 paediatric and 162 adult cases were finally studied (Table 4).

The median age of paediatric patients presenting LRTI (1.17; IQR 0.49–2.61) was significantly lower ( $p$  0.011) than those with URTI (2.18; IQR 0.88–6.41). A2c lineage was more associated to LRTI ( $p$  0.032) than other lineages, but A2c with duplications were not associated with a



**Fig. 3. Maximum distance and radius of gyration analyses of the disordered ensembles of G protein.** A) Representation of the maximum distance measured between the N atom of the first extracellular residue (Asn52) and the more distant atom to this. B) Depiction of the radius of gyration calculated for an individual conformation. C, E, G) Histograms of the maximum distances measured in the disordered ensemble for the wild type, 111- and 180-nucleotide duplications variants of the G protein, respectively. Insets at the right-hand part of each panel depict scatter-plots of maximum distances versus structure. D, F, H) Histograms of the radius of gyration of structures in the disordered ensemble for the wild type, 111- and 180-nucleotide duplications variants of the G protein, respectively. Similarly, insets at the right-hand part of each panel show scatter-plots of radius of gyration versus structure of each ensemble.





**Fig. 4. Glycosylation pattern of HMPV-A G protein.** Multiple alignment of deduced G amino acid sequences of HMPV-A. Only positions reflecting an amino acid change or a putative N- or O-glycosylated site are shown, amino acids were numerated following the reference sequence CAN99-S1 (accession number AY574224). Amino acid positions 40 and 41 correspond to the transmembrane domain, while the remaining positions correspond to the ectodomain. The 180-nucleotide duplications in the ectodomain are framed in a turquoise box, the 111-nucleotide duplications are in a pink box. N- and O-glycosylated sites are marked in purple.

higher risk of LRTI compared to other strains ( $p$  0.743 and 0.202).

The median age of adult patients presenting LRTI (74.7; IQR 61.3–82.8) was significantly higher ( $p$  0.001) than those with URTI (66.8; IQR 53.7–77.1), each year of age increasing 1.03 times the odds of having LRTI. No lineages or subgenotypes were more associated to LRTI ( $p$  0.052 and 0.246). Cardiopathy was associated to LRTI (OR 4.2, IC 95% 2–9.43,  $p$  < 0.001). A2c strains with duplications were significantly more associated to LRTI, compared to all other strains (OR 2.83, IC 95% 1.17–6.84,  $p$  0.018) or to A2c<sub>wr</sub> (OR 3.45, IC 95% 1.22–9.77,  $p$  0.034).

For the severity study, only patients hospitalised due to LRTI (176) were considered, being 116 (66%) paediatric (Table 5) and 60 (34%) adult patients (Table 6). Children infected with A2 were more likely to be admitted in the ICU (OR 5.14, IC 95% 1.06–24.95,  $p$  0.031). No other variables were found to be significant.

#### 4. DISCUSSION

This study reports recent data on prevalence, genetic diversity, structural biology of G protein and clinical features of HMPV in Barcelona, Spain.

The positivity rate of HMPV was similar to recent reports [4,22,23]. Interestingly, the prevalence in adults was similar or even higher than in children, which emphasizes the importance of HMPV in adults. HMPV prevalence increased throughout the three seasons, probably due to the higher implementation of molecular methods, though there might be an underestimation, as a large number of positive samples for HRSV and influenza by rapid assay were not tested for other respiratory viruses. Most co-infections were with rhinoviruses, adenoviruses and bocaviruses, as previously reported [23,24].

HMPV presented a clear seasonality, as previously described [2,6,24]. Interestingly, the last season presented a different pattern, showing two different peaks in one epidemic season without changes among circulating genotypes. Interestingly, the prevalence of HMPV was higher out of the HRSV/influenza epidemics in the first season but did not vary in the second and third seasons. This could be due to the higher implementation of PCR-based assays in detriment to the use of immunofluorescence assays. Moreover, the great majority of HMPV laboratory-confirmed samples during these epidemics were previously tested by rapid assays and had a negative result, which would suggest that there might be many more samples that would be positive for HMPV but are not tested due to a HRSV or influenza positive result when HMPV circulation is coincidental with influenza epidemics. Thus, HMPV prevalence could be underestimated due to the lack of search of this virus when samples are HRSV or influenza laboratory-confirmed during the epidemics.

Genetic characterisation revealed that both genotypes co-circulated with a shift in predominance, as expected [2]. However, there was an unpredicted co-predominance in the third season, which could be due to either an intermediate alternation of genotypes or the emergence of HMPV-A viruses with new antigenic features that would evade the immunity created on the previous season.

Congruent classification of both F and G genes was expected, as no

genetic recombination has been described for HMPV. All subgenotypes were detected except A1, suggesting it has extinguished and been replaced by A2, according to previous studies [3]. According to the data of the present study, A2c lineage appears to be replacing A2a and A2b. Moreover, A2c strains with duplications might be replacing A2c<sub>wr</sub> in the near future, as they might present an improved mechanism of immune evasion. In fact, a group in Japan observed that A2c<sub>111dup</sub> had totally replaced the rest of A2 strains [25], including A2c<sub>180dup</sub>. Interestingly, our group has observed how both A2c<sub>111dup</sub> and A2c<sub>180dup</sub> have replaced together the rest of HMPV-A viruses, being the latter more prevalent [26].

Different lengths of G protein have been observed due to premature stop codons, as previously described [3]. A2b and A2c lineages included viruses with G proteins of 218 and 220 aa respectively; and two different genetic groups (I and II) could be distinguished within B1 subgenotype, with a difference of 10 aa in length, which might evolve into novel lineages. Also, nucleotide duplications can lengthen the G aa sequence, such as long duplications in A2c, and short duplications in B2. For B2 viruses, KE duplications or KER variants should be monitored next seasons to reveal whether they confer an evolutionary advantage. The deletions observed seem not to have been fixed in the viral population.

Once these A2c<sub>111dup</sub> and A2c<sub>180dup</sub> were described, one of the aims was to study their structural properties. G has a heavily glycosylated pattern [21], enhanced by the emergence of duplications that increase the number of potential glycosylation sites. Although it is a very disordered protein and seems to have numerous random conformations, a composition of these conformations could be done. This prediction suggests that both A2c<sub>180dup</sub> and A2c<sub>111dup</sub> proteins protrude more than A2c<sub>wr</sub>. This finding supports the hypothesis of Leyrat [21], who suggested that G protein had a shielding function towards F protein, masking its antigenic epitopes, and at the same time validates the hypothesis that these novel long duplications would enhance this immune evasion mechanism, as it would hide more efficiently F epitopes [8].

Sequences of the newly described A2c lineage [3,4] were compared to sequences of the previously described A2b1 and A2b2 sublineages [27,28] and clustered together; that is to say, A2b and A2c lineages are exactly the same as A2b1 and A2b2, respectively. This misunderstanding between the genetic classification used in several articles highlights the urgent need of an official classification, as well as universal criteria to define new genotypes or lineages.

Furthermore, clinical impact was also assessed. As in literature [2], LRTI is more common in children under 2 and adults over 65. Moreover, adults have an increase of 1.03 times the odds of suffering LRTI every passing year. The presence of chronic medical conditions as cardiopathy, more frequent in the elderly, may be responsible for this, so HMPV should be tightly surveilled in these cases. Comorbidities are also associated with LRTI in children, especially respiratory comorbidities and immunodepression. In this study, prematurity and cardiopathies were not associated with a major risk of developing LRTI in children, in opposite to previous studies [29–32].

Paediatric and adult patients underwent more antibiotic treatment when manifesting LRTI than URTI. However, only 8% of children and

**Table 4**  
Clinical features of patients infected with HMPV.

Factor	Pediatric cases			Adult cases		
	URTI (n = 42)	LRTI (n = 161)	p	URTI (n = 77)	LRTI (n = 85)	p
Season*			0.908			0.020
2014-2015	10 (25.6 %)	42 (26.1 %)		14 (18.4 %)	19 (22.6 %)	
2015-2016	10 (25.6 %)	44 (27.3 %)		46 (60.5 %)	33 (39.3 %)	
2016	1 (2.56 %)	9 (5.59 %)		0 (0.00 %)	0 (0.00 %)	
2016-2017	18 (46.2 %)	66 (41.0 %)		16 (21.1 %)	32 (38.1 %)	
Age	2.18 [0.88;6.41]	1.17 [0.49;2.61]	0.011	66.8 [53.7;77.1]	74.7 [61.3;82.8]	0.001
Age group			0.001			0.031
0-2 years old	19 (45.2 %)	95 (59.0 %)		0 (0.00 %)	0 (0.00 %)	
2-5 years old	10 (23.8 %)	52 (32.3 %)		0 (0.00 %)	0 (0.00 %)	
5-15 years old	11 (26.2 %)	14 (8.70 %)		0 (0.00 %)	0 (0.00 %)	
15-64 years old	2 (4.76 %)	0 (0.00 %)		34 (43.6%)	23 (27.4%)	
>64 years old	0 (0.00 %)	0 (0.00 %)		44 (56.4%)	61 (72.6%)	
Sex			1.000			0.197
Female	18 (42.9 %)	67 (41.6 %)		45 (58.4 %)	40 (47.1 %)	
Male	24 (57.1 %)	94 (58.4%)		32 (41.6%)	45 (52.9 %)	
Subgenotype			0.763			0.052
A/B	0 (0.00 %)	0 (0.00 %)		0 (0.00 %)	1 (1.18 %)	
A2	24 (57.1 %)	83 (51.6 %)		37 (48.1 %)	46 (54.1 %)	
B1	11 (26.2 %)	44 (27.3 %)		17 (22.1 %)	26 (30.6 %)	
B2	7 (16.7 %)	34 (21.1 %)		23 (29.9 %)	12 (14.1 %)	
Sublineage			0.032			0.246
A2a	5 (11.9%)	2 (1.2%)		1 (1.3 %)	2 (2.4 %)	
A2b	6 (14.3%)	14 (8.7%)		7 (9.1 %)	7 (8.3 %)	
A2c	13 (31.0%)	67 (41.6 %)		29 (37.7 %)	37 (44.0 %)	
B1	11 (26.2)	44 (27.3%)		17 (22.1%)	26 (31.0%)	
B2a	0 (0.00 %)	5 (3.1%)		3 (3.9 %)	2 (2.4 %)	
B2b	7 (16.7%)	29 (18.0%)		20 (26.0 %)	10 (11.9%)	
Duplication			0.768			0.048
I11	1 (2.4 %)	5 (3.1%)		1 (1.3 %)	6 (7.1 %)	
I80	6 (14.3%)	16 (9.9 %)		7 (9.1 %)	15 (17.6 %)	
no	35 (83.3%)	140 (87.0%)		69 (89.6%)	64 (75.3%)	
Comorbidities			0.046			0.937
Yes	13 (31.0 %)	80 (49.7 %)		63 (81.8 %)	71 (83.5 %)	
Non	29 (69.0 %)	81 (50.3 %)		14 (18.2 %)	14 (16.5 %)	
Respiratory comorbidities			<0.001			0.799
Asthma	1 (2.38 %)	32 (19.9 %)		0 (0.00 %)	0 (0.00 %)	
Pneumopathy	0 (0.00 %)	20 (12.42%)		0 (0.00 %)	0 (0.00 %)	
EPOC	0 (0.00 %)	0 (0.00 %)		15 (19.5 %)	19 (22.4 %)	
Non	41 (97.6 %)	109 (67.7 %)		62 (80.5 %)	66 (77.6 %)	
Cardiopathy			0.532			<0.001
Yes	2 (4.76 %)	14 (8.70 %)		11 (14.3 %)	35 (41.2 %)	
Non	40 (95.2 %)	147 (91.3 %)		66 (85.7 %)	50 (58.8 %)	
Oncohematology			0.276			0.022
Yes	4 (9.52 %)	8 (4.97 %)		31 (40.3 %)	19 (22.4 %)	
Non	38 (90.5 %)	153 (95.0 %)		46 (59.7 %)	66 (77.6 %)	
Immunodeficiency			0.008			0.203
Immunodeficiency	1 (2.38 %)	2 (1.24 %)		23 (29.9 %)	17 (20.0 %)	
TPH	3 (7.14 %)	0 (0.00 %)		0 (0.00 %)	0 (0.00 %)	
Non	38 (90.5 %)	159 (98.8 %)		54 (70.1 %)	68 (80.0 %)	
Diabetes mellitus						0.114
Yes	0 (0.00 %)	0 (0.00 %)		12 (15.6 %)	23 (27.1 %)	
Non	42 (100 %)	161 (100 %)		65 (84.4 %)	62 (72.9 %)	
Prematurity			0.422			
Yes	3 (7.14 %)	21 (13.0 %)		0 (0.00 %)	0 (0.00 %)	
Non	39 (92.9 %)	140 (87.0 %)		77 (100 %)	85 (100 %)	
Chronic kidney disease						0.221
Yes	0 (0.00 %)	0 (0.00 %)		9 (11.7 %)	17 (20.0 %)	
Non	42 (100 %)	161 (100 %)		68 (88.3 %)	68 (80.0 %)	
Bacteria co-infection			0.244			0.005
Yes	4 (9.52 %)	7 (4.35 %)		10 (13.0 %)	28 (32.9 %)	
Non	38 (90.5 %)	154 (95.7 %)		67 (87.0 %)	57 (67.1 %)	
Viral co-infection			0.384			1.000
Yes	11 (26.2 %)	30 (18.6 %)		5 (6.49 %)	5 (5.88 %)	
Non	31 (73.8 %)	131 (81.4 %)		72 (93.5 %)	80 (94.1 %)	
Antibiotic			<0.001			<0.001
Yes	7 (16.7 %)	85 (52.8 %)		42 (54.5 %)	79 (92.9 %)	
Non	35 (83.3 %)	76 (47.2 %)		35 (45.5 %)	6 (7.06 %)	
Duplication vs the rest			0.743			0.018
A2c w/ duplication	7 (22.6 %)	21 (17.9 %)		8 (13.3 %)	21 (36.2 %)	
Other types	24 (77.4 %)	96 (82.1 %)		69 (86.7 %)	64 (63.8 %)	
A2c sublineage			0.202			0.034
A2c w/ duplication	7 (53.8 %)	21 (31.3 %)		8 (10.4 %)	21 (24.7 %)	
A2c w/o duplication	6 (46.2 %)	46 (68.7 %)		21 (89.6 %)	16 (75.3 %)	

**Table 5**  
Severity of HMPV disease in paediatric patients. HFNC = high flux nasal cannula; CO = conventional oxygenotherapy (low flow nasal cannula or oxygen mask); MV = mechanical ventilation.

Paediatric patients										
Factor	Subgenotypes			p	Duplications vs other strains			A2c sublineage		
	A2	B1	B2		A2c w/ duplication	Other strains	p	A2c w/ duplication	A2c w/o duplication	p
Length hospital stay	4.50 [3.00;7.75]	5.00 [4.00;7.00]	5.50 [3.00;7.25]	0.880	5.00 [4.00;11.00]	5.00 [3.00;7.00]	0.199	5.00 [4.00;11.0]	4.00 [3.00;6.00]	0.166
Respiratory support				1.000			0.297			0.406
Yes	47 (81.0 %)	27 (79.4 %)	19 (79.2 %)		14 (93.3%)	79 (78.2%)		14 (93.3 %)	25 (78.1 %)	
Non	11 (19.0 %)	7 (20.6 %)	5 (20.8 %)		1 (6.67%)	22 (21.8%)		1 (6.67 %)	7 (21.9 %)	
Type of respiratory support				0.520			0.140			0.391
HFNC	13 (22.4 %)	7 (20.6 %)	7 (29.2 %)		3 (20.0%)	24 (23.8%)		3 (20.0 %)	7 (21.9 %)	
CO	28 (48.3 %)	20 (58.8 %)	10 (41.7 %)		8 (53.3%)	50 (49.5%)		8 (53.3 %)	16 (50.0 %)	
MV	6 (10.3 %)	0 (0.00 %)	2 (8.33 %)		3 (20.0%)	5 (5.00%)		3 (20.0 %)	2 (6.25 %)	
Non	11 (19.0 %)	7 (20.6 %)	5 (20.8 %)		1 (6.67%)	22 (21.8%)		1 (6.67 %)	7 (21.9 %)	
Length respiratory support	3.00 [2.00;5.75]	4.00 [2.00;5.75]	3.00 [2.00;6.00]	0.874	3.00 [3.00;9.00]	4.00 [2.00;5.00]	0.208	3.00 [3.00;9.00]	3.00 [2.00;4.25]	0.122
ICU admission				0.031			0.633			1.000
Yes	9 (15.5 %)	0 (0.00 %)	2 (8.33 %)		2 (13.3%)	9 (8.9%)		2 (13.3 %)	5 (15.6 %)	
Non	49 (84.5 %)	34 (100 %)	22 (91.7 %)		13 (86.7%)	92 (91.1%)		13 (86.7 %)	27 (84.4 %)	
Length ICU stay	6.00 [4.00;7.00]	.	13.0 [9.00;17.0]	0.340	9.00 [7.50;10.50]	5.00 [4.00;7.00]	0.340	9.00 [7.50;10.5]	4.00 [4.00;6.00]	0.155
Exitus										
Yes	0 (0 %)	0 (0 %)	0 (0 %)		0 (0 %)	0 (0 %)		0 (0%)	0 (0%)	
Non	58 (100 %)	34 (100 %)	24 (100 %)		15 (100%)	101 (100%)		15 (100 %)	32 (100 %)	

**Table 6**  
Severity of HMPV disease in adult patients. HFNC = high flux nasal cannula; CO = conventional oxygenotherapy (low flow nasal cannula or oxygen mask); MV = mechanical ventilation

Adult patients										
Factor	Subgenotypes			p	Duplications vs other strains			A2c sublineage		
	A2	B1	B2		A2c w/ duplication	Other strains	p	A2c w/ duplication	A2c w/o duplication	p
Length hospital stay	4.00 [2.00;9.00]	9.00 [2.00;12.0]	4.00 [2.00;7.25]	0.327	4.00 [2.00;9.00]	6.00 [2.00;10.50]	0.442	4.00 [2.00;9.00]	2.50 [2.00;7.50]	0.787
Respiratory support				0.655			0.639			0.596
Yes	30 (90.9 %)	15 (88.2 %)	8 (80.0 %)		11 (84.6%)	42 (89.4%)		11 (84.6 %)	13 (92.9 %)	
Non	3 (9.09 %)	2 (11.8 %)	2 (20.0 %)		2 (15.4%)	5 (10.6%)		2 (15.4 %)	1 (7.14 %)	
Type of respiratory support				0.145			0.780			0.450
HFNC	4 (12.1 %)	1 (5.88 %)	1 (10.0 %)		2 (15.4%)	4 (8.5%)		2 (15.4 %)	1 (7.14 %)	
CO	25 (75.8 %)	9 (52.9 %)	6 (60.0 %)		8 (61.5%)	32 (68.1%)		8 (61.5 %)	12 (85.7 %)	
MV	1 (3.03 %)	5 (29.4 %)	1 (10.0 %)		1 (7.69%)	6 (12.8%)		1 (7.69 %)	0 (0.00 %)	
Non	3 (9.09 %)	2 (11.8 %)	2 (20.0 %)		2 (15.4%)	5 (10.6%)		2 (15.4 %)	1 (7.14 %)	
Length respiratory support	2.00 [1.00;5.00]	3.00 [1.00;10.0]	1.00 [1.00;5.50]	0.304	1.00 [1.00;4.00]	2.00 [1.00;6.00]	0.449	1.00 [1.00;4.00]	1.00 [1.00;4.25]	0.938
ICU admission				0.151			0.182			1.000
Yes	2 (6.06 %)	4 (23.5 %)	2 (20.0 %)		0 (0%)	8 (17%)		0 (0.00 %)	1 (7.14 %)	
Non	31 (93.9 %)	13 (76.5%)	8 (80.0 %)		13 (100%)	39 (83%)		13 (100 %)	13 (92.9 %)	
Length ICU stay	9.50 [6.75;12.2]	11.0 [5.00;21.0]	10.5 [8.75;12.2]	0.939	.	10.5 [5.5;15.25]		.	15.0 [15.0;15.0]	
Exitus				0.096			1.000			1.000
Yes	2 (6.06 %)	1 (5.88 %)	3 (30.0 %)		1 (7.69%)	5 (10.6%)		1 (7.69 %)	1 (7.14 %)	
Non	31 (93.9 %)	16 (94.1 %)	7 (70.0 %)		12 (92.3%)	42 (89.4%)		12 (92.3 %)	13 (92.9 %)	

30% of adults treated with antibiotics had a positive bacterial culture. Hence, over-antibiotic prescription is still reported.

Regarding infections by A2c, children seemed to be as affected by A2c with duplications as by A2c<sub>wt</sub> or other lineages, as it is probably a primary infection. Instead, A2c with duplications were more associated with LRTI in adults than A2c<sub>wt</sub> or other lineages. Although adults should have an efficient immune response [6], they have 3.45 times more odds of manifesting LRTI when infected by A2c with duplication than by A2c<sub>wt</sub>. This suggests that it might be acting as a primary infection, which supports the hypothesis of G protein's steric shielding over F protein. HMPV is known for the many immune evasion strategies it has, so this could be a new mechanism developed in recent years [33,34]. Whether

strains with duplication cause more severe disease could be demonstrated neither in children nor in adults.

The increasing prevalence of viral variants carrying a duplication into the ectodomain of the G protein throughout the study period, the association of A2c<sub>111dup</sub> and A2c<sub>180dup</sub> with more severe disease in adults, and the prediction of an enhancing steric shielding of the G protein masking antigenic epitopes of the F protein suggest that these duplications might confer an evolutionary advantage contributing to the immune evasion during the infection. This mechanism would be similar to that described for other viruses which have been reported to evade the immune response due to the glycosylation they present in their envelopes [35]. Given that F protein is the main target for most vaccine

strategies currently under development, the fact that it could be masked by G should be taken into account.

#### Declaration of Competing Interest

The authors declare no conflicts of interest.

#### ACKNOWLEDGEMENTS

This study was supported by the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness (grants BFU2016-78232-P), Instituto de Salud Carlos III and by the European Regional Development Fund, through the Interreg V-A programme: POCTEFA 2014-2020 (grant Pirepred EFA086/15). It was also co-financed by the European Development Regional Fund (ERDF) "A way to achieve Europe", Spanish Network for Research in Infectious Diseases (REIPI RD16/0016/0003). We also would like to acknowledge the Statistics and Bioinformatics Unit (UEB) in Vall d'Hebron Research Institute (VHIR) for the statistical analyses.

#### Appendix A. Supplementary data

Supplementary material related to this article can be found, in the online version, at doi:<https://doi.org/10.1016/j.jcv.2020.104590>.

#### References

- [1] S. Panda, N.K. Mohakud, L. Pena, S. Kumar, Human metapneumovirus: Review of an important respiratory pathogen, *Int. J. Infect. Dis.* 25 (2014) 45–52, <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2014.03.1394>.
- [2] N. Shafagati, J. Williams, Human metapneumovirus - what we know now, *Flu000Research* 7 (2018) 135, <https://doi.org/10.12688/Flu000research.12625.1>.
- [3] M. Jagusić, A. Slović, S. Ljubić-Sternak, G. Mlinarić-Galinović, D. Forčić, Genetic diversity of human metapneumovirus in hospitalized children with acute respiratory infections in Croatia, *J. Med. Virol.* 89 (2017) 1885–1893, <https://doi.org/10.1002/jmv.24884>.
- [4] W.Z. Chow, Y.F. Chan, X.Y. Oong, L.J. Ng, S.S. Nor'E, K.T. Ng, K.G. Chan, N. S. Hanafi, Y.K. Pang, A. Kamarulzaman, K.K. Tee, Genetic diversity, seasonality and transmission network of human metapneumovirus: identification of a unique sub-lineage of the fusion and attachment genes, *Sci. Rep.* 6 (2016) 27730, <https://doi.org/10.1038/srep27730>.
- [5] M.J. Carr, A. Waters, F. Fenwick, G.L. Toms, W.W. Hall, E. O'Kelly, Molecular epidemiology of human metapneumovirus in Ireland, *J. Med. Virol.* 80 (2008) 510–516, <https://doi.org/10.1002/jmv>.
- [6] P. Kumar, M. Srivastava, Prophylactic and therapeutic approaches for human metapneumovirus, *Virus Dis.* 29 (2016) 434–444, <https://doi.org/10.1007/s13337-018-0498-5>.
- [7] J. Papenburg, J. Carbonneau, S. Isabel, M.G. Bergeron, J.V. Williams, G. De Serres, M.-E. Hamelin, G. Boivin, Genetic diversity and molecular evolution of the major human metapneumovirus surface glycoproteins over a decade, *J. Clin. Virol.* 58 (2013) 541–547, <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2013.08.029>.
- [8] M. Piñana, J. Vila, L. Gimferrer, M. Valls, C. Andrés, M.G.M.G. Codina, J. Ramón, M.C.M.C. Martín, F. Fuentes, R. Saiz, P. Alcubilla, C. Rodrigo, T. Pumarola, A. Antón, Novel human metapneumovirus with a 180-nucleotide duplication in the G gene, *Future Microbiol.* 12 (2017) 565–571, <https://doi.org/10.2217/fmb-2016-0211>.
- [9] M. Piñana, C. Andrés, L. Gimferrer, M.G. Codina, F. Fuentes, M. del, C. Martín, S. Rubio, P. Alcubilla, A. Isern, M. Osuna, T. Pumarola, A. Antón, A novel human metapneumovirus carrying a 111-nucleotide duplication within the G gene detected at a tertiary university hospital in Catalonia since the 2015–2016 season, 20th ESCV Annu. Meet. (2017), p. 52.
- [10] M. Saikusa, C. Kawakami, N. Nao, M. Takeda, S. Usuku, T. Sasao, K. Nishimoto, T. Toyozawa, 180-nucleotide duplication in the G gene of human metapneumovirus A2b subgroup strains circulating in Yokohama city, Japan, since 2014, *Front. Microbiol.* 8 (2017) 1–11, <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00402>.
- [11] M. Saikusa, N. Nao, C. Kawakami, S. Usuku, T. Sasao, T. Toyozawa, M. Takeda, J. Okubo, A novel 111-nucleotide duplication in the G gene of human metapneumovirus, *Microbiol. Immunol.* 61 (2017) 507–512, <https://doi.org/10.1111/1348-0421.12543>.
- [12] K. Tamura, G. Stecher, D. Peterson, A. Filipecki, S. Kumar, MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0, *Mol. Biol. Evol.* 30 (2013) 2725–2729, <https://doi.org/10.1093/molbev/mst197>.
- [13] D. Glez-Peña, D. Gómez-Blanco, M. Reboiro-Jato, F. Fdez-Riverola, D. Posada, ALTER: Program-oriented conversion of DNA and protein alignments, *Nucleic Acids Res.* 38 (2010) 14–18, <https://doi.org/10.1093/nar/gkq321>.
- [14] L.P. Kozłowski, J.M. Bujnicki, MetaDisorder: a meta-server for the prediction of intrinsic disorder in proteins, *BMC Bioinformatics.* 13 (2012) 1, <https://doi.org/10.1186/1471-2105-13-111>.
- [15] I. Walsh, F. Seno, S.C.E. Tossitto, A. Trovato, PASTA 2.0: An improved server for protein aggregation prediction, *Nucleic Acids Res.* 42 (2014) 301–307, <https://doi.org/10.1093/nar/gku399>.
- [16] R. Gupta, E. Jung, S. Brunak, Prediction of N-glycosylation sites in human proteins, *Prep.* 2004.
- [17] C. Steentoft, S.Y. Vakhrushev, H.J. Joshi, Y. Kong, M.B. Vester-Christensen, K.T.-B. G. Schjoldager, K. Lavrsen, S. Dabelsteen, N.B. Pedersen, L. Marcos-Silva, R. Gupta, E. Paul Bennett, U. Mandel, S. Brunak, I.H. Wandall, S.B. Levery, H. Clausen, Precision mapping of the human O-GalNAc glycoproteome through SimpleCell technology, *EMBO J.* 32 (2013) 1478–1488, <https://doi.org/10.1038/emboj.2013.79>.
- [18] J. Estrada, P. Bernadó, M. Blackledge, J. Sancho, ProTSA: A web application for calculating sequence specific protein solvent accessibilities in the unfolded ensemble, *BMC Bioinformatics.* 10 (2009) 1–8, <https://doi.org/10.1186/1471-2105-10-104>.
- [19] P. Bernadó, L. Blanchard, P. Timmins, D. Marion, R.W.H. Ruigrok, M. Blackledge, A structural model for unfolded proteins from residual dipolar couplings and small-angle x-ray scattering, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 102 (2005) 17002–17007, <https://doi.org/10.1073/pnas.0506202102>.
- [20] P. Bernadó, M. Blackledge, J. Sancho, Sequence-specific solvent accessibilities of protein residues in unfolded protein ensembles, *Biophys. J.* 91 (2006) 4536–4543, <https://doi.org/10.1529/biophysj.106.087528>.
- [21] C. Leyrat, G. Praesen, J. Charleston, M. Renner, J. Grimes, Structural insights into the human metapneumovirus glycoprotein ectodomain, *J. Virol.* 88 (2014) 11611–11616, <https://doi.org/10.1128/JVI.01726-14>.
- [22] J. Reiche, S. Jacobsen, K. Neubauer, S. Hafemann, A. Nitsche, J. Milde, T. Wolff, B. Schweiger, Human metapneumovirus: Insights from a ten-year molecular and epidemiological analysis in Germany, *PLoS One.* 9 (2014), <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0088342>.
- [23] J.Y. Park, K.W. Yun, J.W. Lim, M.K. Lee, I.S. Lim, E.S. Choi, Clinical and genetic features of human metapneumovirus infections in children, *Pediatr. Int.* (2015) 22–26, <https://doi.org/10.1111/ped.12782>.
- [24] I. Zhang, W. Liu, D. Liu, D. Chen, W. Tan, S. Qiu, D. Xu, X. Li, T. Liu, R. Zhou, Epidemiological and clinical features of human metapneumovirus in hospitalised paediatric patients with acute respiratory illness: a cross-sectional study in Southern China, from 2013 to 2016, *BMJ Open.* 8 (2018) 6–12, <https://doi.org/10.1136/bmjopen-2017-019308>.
- [25] M. Saikusa, N. Nao, C. Kawakami, S. Usuku, N. Tanaka, M. Tahara, M. Takeda, I. Okubo, Predominant detection of the subgroup A2b human metapneumovirus strain with 111-nucleotide duplication in Yokohama City, Japan in 2018, *Jpn. J. Infect. Dis.* (2019) 350–352, <https://doi.org/10.7883/yoken.jjid.2019.124>.
- [26] M. Piñana, C. Andrés, L. Gimferrer, M.G. Codina, M. del, C. Martín, J. Esperalba, F. Fuentes, S. Rubio, P. Alcubilla, T. Pumarola, A. Anton, Imitant metapneumovirus: are the new duplications within the G gene responsible for doubling its prevalence? 21st Congr. Eur. Soc. Clin. Virol. (2018).
- [27] L. Regev, T. Meninger, M. Hindiyeh, E. Mendelson, M. Mandelboim, Increase human metapneumovirus mediated morbidity following pandemic influenza infection, *PLoS One.* 7 (2012) 2–7, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0034750>.
- [28] A. Neemuchwal, V.R. Duvvuri, A. Marchand-Austin, A. Li, J.B. Gublay, Human metapneumovirus prevalence and molecular epidemiology in respiratory outbreaks in Ontario, Canada, *J. Med. Virol.* 87 (2015) 269–274, <https://doi.org/10.1002/jmv.24024>.
- [29] J.E. Schuster, N. Khuri-Bulos, S. Faouri, A. Shehadi, M. Johnson, L. Wang, C. Fomesbeck, J.V. Williams, N. Halasa, Human Metapneumovirus Infection in Jordanian Children, *Pediatr. Infect. Dis. J.* 34 (2015) 1335–1341, <https://doi.org/10.1097/inf.0000000000000892>.
- [30] K. Pancham, I. Sumi, G.F. Perez, S. Huseni, B. Kurdi, M.C. Rose, C.E. Rodriguez-Martinez, G. Nino, Human metapneumovirus infection is associated with severe respiratory disease in preschool children with history of prematurity, *Pediatr. Neonatol.* 57 (2016) 27–34, <https://doi.org/10.1016/j.pedneo.2015.03.008>.
- [31] J. Papenburg, M.E. Hamelin, N. Ouhoumane, J. Carbonneau, M. Ouakki, F. Raymond, L. Robitaille, J. Corbeil, G. Caouette, L. Frenette, G. De Serres, G. Boivin, Comparison of risk factors for human metapneumovirus and respiratory syncytial virus disease severity in young children, *J. Infect. Dis.* 206 (2012) 178–189, <https://doi.org/10.1093/infdis/jis333>.
- [32] C.R. Davis, C. Stockmann, A.T. Pavia, C.L. Byington, A.J. Blaschke, A.L. Hersh, E. A. Thorell, K. Korgenski, J. Daly, K. Ampofo, Incidence, morbidity, and costs of human metapneumovirus infection in hospitalized children, *J. Pediatric Infect. Dis. Soc.* 5 (2016) 303–311, <https://doi.org/10.1093/pids/plv027>.
- [33] P.F. Céspedes, C.E. Palavecino, A.M. Kalergis, S.M. Bueno, Modulation of host immunity by the human metapneumovirus, *Clin. Microbiol. Rev.* 29 (2016) 795–818, <https://doi.org/10.1128/CMR.00081-15>.
- [34] D. Kolić, X. Bao, A. Casola, Human metapneumovirus antagonism of innate immune responses, *Viruses.* 4 (2012) 3551–3571, <https://doi.org/10.3390/v4123551>.
- [35] J.D. Cook, J.E. Lee, The Secret Life of Viral Entry Glycoproteins: Moonlighting in Immune Evasion, *PLoS Pathog.* 9 (2013), <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003258>.



# Otras Publicaciones



## 5 OTRAS PUBLICACIONES

---

### 5.1 ESTUDIO 3

**Título:** The emergence, impact, and evolution of human metapneumovirus variants all over 8 pre- and pandemic seasons in Spain.

**Referencia:** Piñana M, González-Sánchez A, Andrés C, Abanto M, Vila J, Esperalba J, et al. The emergence, impact, and evolution of human metapneumovirus variants all over 8 pre- and pandemic seasons. Unpublished.



1 **The emergence, impact, and evolution of human**  
2 **metapneumovirus variants all over 8 pre- and pandemic seasons**  
3 **in Spain**

4 **AUTHORS:** Maria Piñana<sup>1\*</sup>, Alejandra González-Sánchez<sup>1\*</sup>, Cristina Andrés<sup>1</sup>, Michel  
5 Abanto<sup>2</sup>, Jorgina Vila<sup>3</sup>, Juliana Esperalba<sup>1</sup>, Noelia Moral<sup>5</sup>, Elena Espartosa<sup>5</sup>, Narcís  
6 Saubi<sup>1</sup>, Anna Creus<sup>3</sup>, Maria Gema Codina<sup>1</sup>, Dolores Folgueira<sup>5</sup>, Jaime Martínez-Urtaza<sup>4</sup>,  
7 Tomàs Pumarola<sup>1+</sup>, Andrés Antón<sup>1+</sup>.

8 **AFFILIATIONS:**

- 9 1. Respiratory Viruses Unit, Microbiology Department, Vall d'Hebron Institut de  
10 Recerca (VHIR), Vall d'Hebron Hospital Universitari, Vall d'Hebron Barcelona  
11 Hospital Campus, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain  
12 2. Genomics and Bioinformatics Unit, Scientific and Technological Bioresource  
13 Nucleus (BIOREN). Universidad de La Frontera, Temuco, Chile  
14 3. Paediatric Hospitalization Unit, Paediatrics Department, Hospital Universitari  
15 Maternoinfantil Vall d'Hebron, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona,  
16 Spain  
17 4. Department of Genetics and Microbiology, Faculty of Biosciences, Universitat  
18 Autònoma de Barcelona, 08193 Bellaterra, Spain.  
19 5. Department of Clinical Microbiology, Hospital Universitario 12 de Octubre,  
20 Instituto de Investigación Hospital 12 de Octubre (imas12), Universidad  
21 Complutense de Madrid, Madrid, Spain.  
22

23 \* These first authors contributed equally to this article.

24 + These authors are co-corresponding authors.

25

26 **ORCID:**

- 27 – Maria Piñana: 0000-0002-4766-2613  
28 – Alejandra González-Sánchez: 0000-0002-1809-3415  
29 – Cristina Andrés: 0000-0002-3200-0895  
30 – Michel Abanto: 0000-0001-9136-0041  
31 – Jorgina Vila: 0000-0001-9715-0627  
32 – Juliana Esperalba: 0000-0003-1326-1341  
33 – Narcís Saubi: 0000-0001-5493-1044  
34 – Maria Gema Codina: 0000-0002-5313-5086  
35 – Tomàs Pumarola: 0000-0002-5171-7461  
36 – Andrés Antón: 0000-0002-1476-0815

37

38 **CORRESPONDING AUTHOR:**39 **Prof. Tomàs Pumarola**

40 Respiratory Viruses Unit – Microbiology Department

41 Hospital Universitari Vall d'Hebron

42 Vall d'Hebron Research Institute

43 Universitat Autònoma de Barcelona

44 Passeig Vall d'Hebron 119-129

45 Barcelona, SPAIN

46 +34 93 274 00 00 (ext 6918)

47 E-mail: [virusrespiratoris@vhebron.net](mailto:virusrespiratoris@vhebron.net)48 **CO-CORRESPONDING AUTHOR:**49 **Dr Andrés Antón**

50 Respiratory Viruses Unit – Microbiology Department

51 Hospital Universitari Vall d'Hebron

52 Vall d'Hebron Research Institute

53 Universitat Autònoma de Barcelona

54 Passeig Vall d'Hebron 119-129

55 Barcelona, SPAIN

56 +34 93 274 00 00 (ext 6918)

57 E-mail: [aanton@vhebron.net](mailto:aanton@vhebron.net)58 **RUNNING TITLE**

59 Epidemiology and evolution of human metapneumovirus from 2014 to 2021

60 **KEYWORDS**

61 Human metapneumovirus, duplication, steric shielding, epidemiology, genetic diversity,  
62 evolution, whole-genome sequencing.

63 **CONFLICT OF INTEREST**

64 The authors declare no conflicts of interest.

65 **Words in abstract:** 231

66 **Words in main text:** 4,280

67 **ABSTRACT**

68 **Background:** Human metapneumovirus (HMPV) is an important aetiological agent of  
69 respiratory tract infection (RTI). This study aimed to describe the prevalence, genetic  
70 diversity, and evolutionary dynamics of HMPV in Spain during seasons 2014-2021,  
71 focusing on the A2c variants carrying the duplications.

72 **Methods:** Laboratory-confirmed HMPV were characterised based on partial-coding G  
73 gene sequences with MEGA.v6.0. Whole-genome sequencing (WGS) was performed  
74 with Illumina, and evolutionary analyses were performed with Datamonkey and  
75 Nextstrain.

76 **Results:** HMPV prevalence was 2.5% and presented epidemic peaks in February-April  
77 until the emergence of SARS-CoV-2, not circulating until summer and autumn-winter  
78 2021 simultaneously with respiratory syncytial virus. There was an alternance in the  
79 predominance of HMPV-A and -B, A2c<sub>111dup</sub> finally being the most prevalent circulating  
80 lineage within HMPV-A. WGS revealed G and SH proteins were the most variable, and  
81 70% of sites in F protein were under negative selection. Mutation rate of HMPV genome  
82 was  $6.95 \times 10^{-4}$  substitutions per site per year.

83 **Conclusion:** HMPV showed a significant morbidity. HMPV epidemic in 2020 was  
84 interrupted by SARS-CoV-2 pandemic, not circulating again until summer and autumn  
85 2021. The alternance of the predominant genotype changed to almost only circulation of  
86 A2c<sub>111dup</sub> probably due to a more efficient immune evasion mechanism. WGS revealed  
87 the patterns of selection and estimation of the tMRCA for all lineages. The new data  
88 along with publicly available HMPV sequences are included in an interactive  
89 phylodynamic analysis on [nextstrain.org/groups/valldebronvirology/](https://nextstrain.org/groups/valldebronvirology/).

**90 INTRODUCTION**

91 Human metapneumovirus (HMPV) is an important aetiologic agent of upper and lower  
92 respiratory tract infections (URTI and LRTI) in children and adults (1). HMPV belongs to  
93 the *Pneumoviridae* family together with human respiratory syncytial virus (HRSV) (2),  
94 causing similar symptomatology (1). HMPV is an enveloped, lineal, negative-sense,  
95 single-stranded RNA virus, classified into HMPV-A and HMPV-B genotypes and  
96 subdivided into subgenotypes A1, A2 (A2a, A2b and A2c lineages) (1,3,4), B1 and B2  
97 (B2a and B2b lineages) according to the last updated classification (5,6).

98 HMPV's genome comprise 8 genes within its 13 kb, which encode for 9 proteins in the  
99 following scheme: 3'-N-P-M-F-M2(M2-1/M2-2)-SH-G-L-5'. This genome is protected by  
100 the nucleoprotein (N), which in turn is associated with the phosphoprotein (P), the  
101 polymerase (L), and the M2 proteins. This complex of RNA and proteins is surrounded  
102 by the matrix proteins (M), which are associated to the lipidic membrane where the  
103 attachment (G) and fusion (F) glycoproteins in addition to the small hydrophobic (SH)  
104 proteins are anchored. Recently, 180- and 111-nucleotide duplications have been  
105 described into G protein's ectodomain (6–9), and have been associated with immune  
106 evasion and LRTI in the adulthood (6).

107 The aims of this study were to describe the genetic diversity and the evolutionary  
108 dynamics of HMPV in paediatric and adult populations attended at a tertiary university  
109 hospital in Barcelona from the 2014-2015 to the 2020-2021 seasons, focusing on the  
110 A2c variants carrying these two duplications.

**111 MATERIALS AND METHODS****112 Sample collection**

113 From October 2014 to March 2020, respiratory specimens from children and adults  
114 attended at the Hospital Universitari Vall d'Hebron (HUVH) with suspicion of respiratory  
115 tract infection (RTI) were tested for the laboratory-confirmation of respiratory viruses.

116 From March 2020 to December 2021, due to the increasing SARS-CoV-2 diagnostic  
117 activity during the pandemic, the routine performed changed, and while the study of all  
118 respiratory samples from children for surveillance purposes was intended to be  
119 maintained, in adults it was only performed under request. Also, the inclusion criteria  
120 changed, including those patients requiring hospitalization for non-RTI causes and those  
121 attending the emergency room with SARS-CoV-2-compatible symptomatology.  
122 Institutional Review Board approval (PR(AG)161/2016) was obtained from the hospital's  
123 Clinical Research Ethics Committee.

#### 124 **Respiratory viruses' laboratory confirmation**

125 During the HRSV and influenza epidemics, point-of-care tests (POCT) were performed  
126 for rapid diagnosis, which were based on immunochromatography (Alere BinaxNOW®  
127 Influenza A&B or RSV, Alere, USA), immunofluorescence (Sofia RSV or influenza FIA,  
128 Quidel, USA) or real-time RT-PCR (GenXpert for Flu, RSV and/or SARS-CoV-2,  
129 Cepheid, USA). Routine detection of respiratory viruses throughout all year was  
130 performed by immunofluorescence (D3 Ultra 8™ DFA Respiratory Virus, Diagnostic  
131 HYBRIDS, USA) until the season 2015-2016 or by real-time multiplex RT-PCR (Anyplex  
132 II RV16, Seegene, Korea, until 2015; Allplex Respiratory Panels 1-3, Seegene, Korea,  
133 since 2015). Prior to molecular testing, total nucleic acids were extracted using  
134 NucliSense easyMAG (BioMérieux, Marcy l'Etoile) or Microlab STARlet System  
135 (Hamilton, CA, USA). As samples were processed, these were kept at -80°C for further  
136 studies.

137 In the present study, according to previous data of HMPV circulation, epidemiological  
138 seasons were considered to start in week 40 and end in the week 39 of the following  
139 natural year.

#### 140 **HMPV phylogenetic analysis**

141 Partial G gene was sequenced from all HMPV laboratory-confirmed samples as  
142 previously described (6). Nucleotide sequences were edited and assembled using  
143 MEGA v6.0 (10). A collapse to haplotypes was done with ALTER server (11). The best  
144 fit substitution model was determined by MEGA v6.0, and the lowest Bayesian  
145 information criterion score model was used for the construction of phylogenetic trees and  
146 evaluated with 1,000 bootstrap resamplings.

#### 147 **Whole genome sequencing and bioinformatics**

148 To describe the genetic diversity based on the whole genome sequence, viruses from  
149 HUVH were randomly selected to maintain representativeness among all the genetic  
150 clusters observed in the phylogenetic trees of G protein and per season. Since no  
151 samples before October 2014 were available at HUVH, Hospital 12 de Octubre (H12O,  
152 Madrid, Spain) contributed in the present study with older HMPV laboratory-confirmed  
153 samples in an attempt to track the origin and evolution of HMPV variants.

154 Amplification of HMPV whole genome was performed in 4 overlapping 4-kb-amplicons  
155 with the SuperScript™ III Reverse Transcriptase (Invitrogen, USA) with the primers  
156 designed by Tulloch *et al* (12), and the PCR conditions were the following: 55°C 1 h –  
157 94°C 2 min – 35x (94°C 30 s – 56°C 30 s – 68°C 4 min 30 s) – 68°C 10 min. PCR products  
158 were purified with AMPure Beads (Beckman Coulter, USA) following manufacturer's  
159 instructions, and quantified with NanoDrop One (ThermoScientific, USA). Amplicons  
160 were normalized and pooled for every patient. Library preparation was performed with  
161 DNA Prep (Illumina, CA, USA), and samples were individually indexed with IDT® for  
162 Illumina® DNA/RNA UD Indexes Set A-D (384 IDX) (Illumina, USA). Products were  
163 quality tested with 4200 TapeStation System (Agilent, USA) and pooled. The final pool  
164 was loaded in a MiSeq Reagent Kit 600v3 cartridge (Illumina, CA, USA) and sequenced  
165 in a MiSeq platform (Illumina, CA, USA).

166 Due to the short length of reads obtained with this methodology and the inclusion of  
167 HMPV variants with long duplications, two different approaches were followed, based

168 on reference mapping and *de novo* assembly, to determine the better pipeline for  
169 reconstructing consensus sequences in this virus.

170 FASTQ files were parsed to Trimmomatic v0.39 (13), to filter bad quality reads. Sliding  
171 window trimming option was enabled, using a 10-base wide window, and cutting when  
172 the average quality within the window drops below 30. In addition, leading and trailing  
173 bases below quality 30 were removed.

174 For the reference mapping consensus assembly, resulting FASTQ files were mapped to  
175 HMPV reference genome NC\_039199.1 (retrieved from NCBI) through Minimap2 v2.17-  
176 r941 (14). Variant calling over mapped reads was performed by LoFreq v2.1.5 (15), with  
177 `--call-indels` option enabled. Consensus sequences were generated by BCFtools v1.14  
178 (16), based on the VCF files previously obtained.

179 Reads pre-processing for *de novo* assembly went under the same first steps. After,  
180 FASTQ files were processed by Bowtie2 v2.3.5.1 (17) for host sequences removal, using  
181 as host reference sequence the human genome assembly GRCh38. Last step of reads  
182 pre-processing was performed by pTrimmer v1.3.4 (18), which consisted of trimming off  
183 primer sequences. High-quality filtered reads obtained after pre-processing were *de*  
184 *nov*o assembled by SPAdes v3.15.2 (19), using `--rnaviral` option. Output scaffolds were  
185 manually revised and curated using MEGA v6.0.

186 Performance of both approaches was assessed by comparing G protein sequence  
187 obtained by Sanger with the G protein information contained in consensus sequences  
188 from *de novo* and reference mapping assembly.

### 189 **Evolutionary analysis**

190 All complete genomes of HMPV available in GenBank were downloaded as reference  
191 sequences. References with low coverage, generated from isolates of viral culture,  
192 without date or resulting in outliers in the TempEst (20) analyses were not included in



193 the analyses. The date of these sequences was retrieved from GenBank or the original  
194 article linked, and the 1<sup>st</sup> of July was assumed when only the year was published.

195 Positively and negatively selected sites were identified through Datamonkey Webserver  
196 (21) with 4 different algorithms: single likelihood ancestor counting (SLAC) (22), fixed  
197 effects likelihood (FEL) (22), mixed effects model of evolution (MEME) (23) and a fast,  
198 unconstrained bayesian approximation for inferring selection (FUBAR) (24). The best-fit  
199 substitution model was also determined by Datamonkey Webserver. Each site was  
200 considered under positive or negative selection only when two or more methods agreed  
201 with statistical significance ( $p < 0.1$  or Bayes Factor  $> 50$ ). The mean dN/dS ratio was  
202 estimated using the SLAC algorithm.

203 Conservative blocks were obtained through GBlocks v0.91b for evolutionary analysis, to  
204 reduce possible noise caused by repetitive duplications or large structural variants found  
205 in some sequences. Nucleotide substitution rate per site and the time of the most recent  
206 common ancestor (tMRCA) were estimated using nextstrain (25) and the phylodynamic  
207 package TreeTime (26). The resulting analysis can be visualized in  
208 [nextstrain.org/groups/valldebronvirology/metapneumovirus/AB/timetree](https://nextstrain.org/groups/valldebronvirology/metapneumovirus/AB/timetree)

## 209 **RESULTS**

### 210 **HMPV epidemiology**

211 From October 2014 (season 2014-2015) to December 2021 (season 2020-2021), a total  
212 of 72,263 samples were tested for respiratory viruses, of which 31,368 (43%) were  
213 laboratory-confirmed for at least one respiratory virus (excluding SARS-CoV-2). HMPV  
214 was laboratory-confirmed in 1,751 samples (2.4% of total samples tested; 5.6% of  
215 respiratory viruses-confirmed samples). This virus presented quite a stable prevalence  
216 before the SARS-CoV-2 pandemic, except at the 2017-2018 season, where it presented  
217 almost 1.6x prevalence compared to the mean of all the other seasons (**Table 1**). Until  
218 week 11/2020, HMPV presented a marked seasonality pattern, with a high circulation

219 between February and April, peaking always after the influenza epidemic, which always  
220 came after the HRSV epidemic (**Figure 1**).

221 In March 2020, the epidemic of HMPV finished abruptly due to the arrival of the SARS-  
222 CoV-2 pandemic, and it did not circulate showing an epidemic pattern until 2021 when  
223 two epidemic curves were unexpectedly observed, the first one peaking in May 2021 and  
224 the latter in October 2021, even sharing timing with HRSV on both occasions (**Figure 1**).

225 In consequence, the prevalence of HMPV in the season 2020-2021 decreased in  
226 comparison with previous seasons, but in 2021-2022 it doubled its previously observed  
227 prevalence, and achieving a 12% in paediatric population, even exceeding HRSV's  
228 circulation.

229 HMPV presented a rate of co-detections of 24% (288/1192) with other respiratory viruses  
230 in the pre-pandemic seasons (season 2019-2020 or before), which increased to a 32%  
231 (178/559) during the pandemic. The most common respiratory viruses co-detecting with  
232 HMPV were always rhinovirus, bocavirus, adenovirus and enterovirus, though during the  
233 pandemic seasons the order changed to rhinovirus, enterovirus, adenovirus and  
234 bocavirus, surely with this change on circulation pattern.

235 Prior to the SARS-CoV-2 pandemic, although there were more confirmed cases for  
236 HMPV in the paediatric population, adult patients represented a very important cohort,  
237 more than 45% (**Table 2**). The overall distribution of HMPV by patients' sex was  
238 balanced, standing out >64-year-old female adults or male paediatric patients.  
239 Unfortunately, as commented above, during the SARS-CoV-2 pandemic, almost all  
240 samples tested were from paediatric patients, showing a higher proportion of  
241 confirmation on males. From 2020-2021 season until the end of the study, the median  
242 age of paediatric patients increased 1 year in age.

243 **Phylogenetic analyses of viral strains**

244 Phylogenetic analyses of partial G sequences from 1,751 strains from October 2014 to  
245 December 2021 revealed that HMPV-A (800/1363, 59%) and HMPV-B (562/1363, 41%)  
246 co-circulated, and there was 1 coinfection of HMPV-A/B. For this analysis, 77 samples  
247 were excluded due to belonging to the same patient in the same clinical episode. The  
248 remaining 311/1,751 (18%) samples could not be sequenced, probably due to low viral  
249 load or low RNA quality.

250 Overall, HMPV-A sequences could be further classified in A2a (12, 1.5%), A2b (49,  
251 6.1%) and A2c (739, 92.4%), of which 185/739 (25.0%) carried the 180-nucleotide  
252 duplication (A2c<sub>180dup</sub>) and 455/739 (61.6%) the 111-nucleotide duplication (A2c<sub>111dup</sub>),  
253 remaining 99 (13.4%) without duplications (A2c<sub>wt</sub>). In addition, HMPV-B sequences could  
254 be subdivided into B1 (259, 46.1%), B2a (14, 2.5%) and B2b (289, 51.4%)  
255 **(Supplementary figure 1)**.

256 Both HMPV-A and HMPV-B co-circulated throughout 2014-2021, showing shifts in  
257 predominance all-over the study period **(Figure 2)**. The predominant genotype always  
258 remained lesser than 65% until the pandemic seasons, where HMPV-A achieved a 90%.  
259 Interestingly, almost all A2c<sub>111dup</sub> circulating after the emergence of SARS-CoV-2  
260 clustered together. Within HMPV-B, both subgroups B1 and B2 co-circulated, showing  
261 an alternance in the predominant subgenotype all over the study period; while within  
262 HMPV-A, the new variants progressively substituted the previous predominant lineages  
263 **(Figure 2)**.

264 The sequences of the present study were submitted to GenBank (access numbers  
265 OM243131-OM243805).

#### 266 **Evolutionary analyses of whole-genome sequences**

267 A total of 166 viral genomes from HUVH between seasons 2014-2015 and 2020-2021  
268 and 22 from H12O between seasons 2008-2009 and 2014-2015 were successfully  
269 sequenced.

270 Comparison between the two approaches used for genome assembly and the  
271 sequences obtained by Sanger revealed that the 111- and 180- nucleotide duplications  
272 were only correctly assembled through *de novo* approach, while almost no sequences  
273 showing duplications were obtained by reference mapping (one 111-nucleotide  
274 duplication was found, while none 180-nucleotide duplication was assembled).  
275 Consequently, all the consensus sequences used for the analysis were assembled  
276 following the *de novo* pipeline designed.

277 Sequencing process outputted a mean value of 412,259.31 reads per sample, 0.23% of  
278 which were removed due to bad quality. Removal of host sequences left a median of  
279 94.03% of high-quality reads, and 0.29% reads containing primer sequences were  
280 trimmed. Pre-processed reads had a median length of 207.87 nucleotides, leading to a  
281 median genome coverage of all samples of 4740.6X.

282 Overall, from 13 seasons studied (2008 – 2021), 98 and 90 samples belonging to HMPV-  
283 A genotype (6 A2a, 15 A2b and 77 A2c, of which 38 carried the 111-nucleotide  
284 duplication and 27 the 180-nucleotide duplication) and to HMPV-B (48 B1, 5 B2a and 37  
285 B2b), respectively, were randomly selected. One sample from H12O (M0315-60968)  
286 carried two different variants of HMPV, one A2C<sub>wt</sub> and one A2C<sub>180dup</sub>. Due to the probable  
287 crossing in the assembly of the reads, this sample was not considered in further  
288 analyses, remaining 187 samples from HUVH and H12O.

289 A total of 164 complete genomes of HMPV were available on GenBank, remaining 92  
290 HMPV-A and 44 HMPV-B that accomplished the inclusion criteria.

291 The dN/dS analyses showed that the glycoproteins G and SH were the most variable  
292 proteins among the whole genome of HMPV, followed by M2-1, M2-2, and P (**Table 3**).  
293 G and SH were also the proteins with the least percentage of sites negatively selected,  
294 while M, N, F, and L had more than 70% of sites negatively selected. Moreover, G, SH,  
295 M2-1, L, and P were the only proteins with sites positively selected.

296 A final multiple sequence alignment containing 12279 positions obtained after GBlocks  
297 execution was used for evolutionary analysis. Regions containing duplications were  
298 discarded by GBlocks. The evolution and phylogenetic relationship of the HMPV variants  
299 was made publicly available at [nextstrain.org/groups/valldehebronvirology/](https://nextstrain.org/groups/valldehebronvirology/). The  
300 estimated mutation rate for the whole HMPV genome was  $6.95 \times 10^{-4}$  substitutions per  
301 site per year, with a higher rate in HMPV-A than in -B ( $7.27 \times 10^{-4}$  and  $6.39 \times 10^{-4}$ ,  
302 respectively). HMPV-A and HMPV-B were estimated to diverge in July 1823 [95%  
303 confidence interval (CI) September 1814 – January 1832] (**Figure 3**). Lineage A2a  
304 showed to diverge from A1 in December 1976 (CI August 1975 – June 1978), A2b  
305 diverged from A2a in April 1993 (CI March 1992 – November 1993), and A2c in June  
306 2002 (CI April 2001 – January 2003). Divergence dates of A2c<sub>180dup</sub> and A2c<sub>111dup</sub> were  
307 June 2012 (CI April 2011 – September 2012) and September 2013 (CI February –  
308 December 2013), respectively. For HMPV-B, B1 and B2 were estimated to diverge in  
309 December 1946 (CI July 1944 – April 1949). Within B2, B2a diverged in September 1989  
310 (CI July 1988 – April 1990) and B2b in October 1986 (CI October 1985 – June 1987).

## 311 **DISCUSSION**

312 This study reports the genetic diversity, the molecular epidemiology and evolution of  
313 those HMPV strains detected throughout six pre-pandemic and two pandemic seasons,  
314 at a tertiary university hospital in Catalonia, Spain.

315 The prevalence of HMPV in pre-pandemic seasons was similar to that observed in other  
316 studies (4,27–29). A yearly seasonal pattern with a clear peak was observed in all pre-  
317 pandemic seasons, following the concatenated epidemic peaks of HRSV and influenza  
318 virus, and lasting from February to April. However, the start of SARS-CoV-2 pandemic  
319 and the use of non-pharmaceutical measures for the control of this pandemic, changed  
320 this expected pattern, disrupting the circulation of other respiratory viruses. In week  
321 11/2020, Spain underwent a strict National lockdown due to the spread of the SARS-  
322 CoV-2 pandemic. This lockdown succeeded in ending the first wave of SARS-CoV-2,

323 though it was followed by 5 more pandemic waves in our country at the time this  
324 manuscript was written (30). Importantly, this emerging virus displaced all respiratory  
325 viruses, at least until summer 2020, when some non-enveloped virus could peak like  
326 adenovirus, enterovirus and mainly rhinoviruses, but no influenza viruses, HRSV or  
327 HMPV were observed that winter nor spring of 2021. It was not until summer 2021 that  
328 enveloped virus such as HRSV and HMPV started to circulate again. To our knowledge,  
329 this is the first description of HMPV circulation after the emergence of SARS-CoV-2,  
330 showing this change of epidemic pattern and in parallel to HRSV. Although these two  
331 epidemics were not expected at this time neither for HMPV nor HSRV, their cumulative  
332 incidence was higher in comparison to previous seasons (31), as there were two  
333 generations of infants without specific immune protection because the expected primary  
334 infection in early childhood did not occur, due to the absence of HMPV in the winter-  
335 spring of 2020.

336 The most common co-detections found were with rhinovirus, bocavirus, adenovirus and  
337 enterovirus, as previously described (32). After the emergence of the pandemic of SARS-  
338 CoV-2, the co-detection rate raised to a 32%, and while rhinovirus continued to be the  
339 most common, the order of the following three changed to enterovirus, adenovirus and  
340 bocavirus. Both facts could be related with the different seasonality of HMPV, as not only  
341 it coincided with HRSV, but also with the burden of enterovirus D68, which arrived one  
342 year later than expected due to the pandemic (33), among other viruses. Moreover, the  
343 second epidemic peak of HMPV during the pandemic occurred in autumn and winter  
344 months, when more respiratory viruses are known to circulate.

345 Regarding HMPV's distribution according to patients' demographic characteristics, it  
346 presented a higher incidence in children under 2 years old in pre-pandemic seasons, as  
347 observed in previous studies (1,2). However, the median age changed after the  
348 emergence of SARS-CoV-2, during the two HMPV detection peaks reported in 2021.  
349 This would be consistent with the hypothesis aforementioned, where a larger population

350 vulnerable to infection is present in our country, which was also observed for HRSV (34).  
351 Moreover, there was a tendency in affecting more male infants, which has already been  
352 described for respiratory viruses due to a worse innate immune response compared with  
353 female infants (35). On the other hand, in the adult population, and mainly using data  
354 from pre-pandemic season, HMPV presented more incidence in patients aging more  
355 than 50 years old, with a tendency to affect more female adults. This has also been  
356 described due to hormonal changes and a worse innate immune response compared  
357 with males (36).

358 Regarding the circulation of both genotypes along the study period, HMPV-A and HMPV-  
359 B, a pattern of cyclic shifts of predominance was observed in this study, similar to others  
360 (29), though the achievement of a 90% of prevalence by HMPV-A had not been  
361 described before the SARS-CoV-2 pandemic occurred. An increasing prevalence of A2c  
362 lineage viruses carrying duplications have been described, first those viruses with 180-  
363 nucleotide duplication, and later those viruses with the 111-nucleotide duplication. In fact,  
364 almost all circulating HMPV-A during the pandemic seasons belonged to the A2c lineage  
365 and carried the 111-nucleotide duplication. This is consistent with what has been  
366 observed with the rest of lineages within HMPV-A, as it seems that emerging lineages  
367 replace the previous circulating ones, leading them to extinction. The duplications within  
368 A2c lineage had been related with immune evasion by shielding the fusion protein from  
369 neutralizing antibodies, A2c<sub>180dup</sub> protruding farther than A2c<sub>111dup</sub> (6). This could lead to  
370 the interpretation of A2c<sub>180dup</sub> having a better immune evasion mechanism and so,  
371 become the predominant lineage. Instead, A2c<sub>111dup</sub> has, which might suggest that the  
372 180-nucleotide duplication might cover too well the F protein, preventing it from triggering  
373 the membranes' fusion.

374 In line with the emergence and predominance of these new A2 variants and related with  
375 the increase in prevalence observed after the SARS-CoV-2 pandemic started, an  
376 increase of HMPV's morbidity had already been described to happen in the winter of

377 2010 in Israel, at the end of the pandemic caused by influenza virus H1N1 in 2009. The  
378 A2c lineage, previously named A2b2, within the A2 subgenotype, has been observed to  
379 be dominant over more years than B1 or B2 subgenotypes, and has been described to  
380 have a higher mean genetic distance than the other lineages and subgenotypes (37).  
381 Both studies suggested that this lineage could evade more efficiently the immune  
382 system, which would explain the aggressive dominance it presents. Similar to this study,  
383 every time a different lineage within A2 emerges, its prevalence raised up until the almost  
384 extinction of the previous ones, as observed in **Figure 2**. The present study shows that  
385 after almost two years of SARS-CoV-2 pandemic, HMPV has circulated again, first as  
386 an epidemic with similar number as in previous seasons and immediately after in a  
387 second epidemic overcoming all incidences observed along 8 years, and with the  
388 indisputable majority of A2c<sub>111dup</sub>, the last emerging lineage of A2 subgenotype.

389 Interestingly, HMPV-B lineages present a very different behavior, where B1 and B2b co-  
390 exist and draw a pattern of predominance shifting, similar to that observed when  
391 comparing HMPV-A and HMPV-B.

392 One of the objectives of this project was to study the evolution of HMPV and to track the  
393 most probable origin of the emerging lineages of this virus. For so, samples from H12O  
394 of Madrid (Spain) were included to achieve a wider geographical representation, as well  
395 as all whole-genome sequences which accomplished the inclusion criteria.

396 Regarding the different approaches used for genome assembly, the comparison  
397 highlighted the problematic of using reference mapping in terms of finding large structural  
398 variants. Using the dataset generated in this study, the assembly by reference mapping  
399 did not find the duplications in most cases, probably forcing the reads to align to a  
400 genome sequence that does not contain the duplication, losing this variant information.  
401 This should be taken into account in future studies of WGS of RNA respiratory viruses,  
402 as this kind of insertions are quite commonly found (38,39).



403 As expected, G and SH proteins presented the highest dN/dS, as well as the lowest  
404 amount of sites negatively selected and the highest sites positively selected. This could  
405 be explained by the fact that they are not the major antigenic determinants targeted by  
406 neutralizing or protective antibodies, though being surface proteins (40,41). Also, there  
407 were differences in the positive selection profiles when studying HMPV-A and HMPV-B  
408 separately, which points to a lineage-specific selection. Apart from these two proteins,  
409 there was positive selection in L, M2-1 and in P. Regarding the F protein, which is the  
410 only one eliciting a neutralizing immune response, two of the asparagines located on the  
411 apex (positions 57 and 172) resulted to be under negative selection. These asparagines  
412 are suggested to play a role in immune evasion by shielding the epitopes in the apex  
413 from the immune system (42,43). Also, almost all the amino acid positions belonging to  
414 a known antigenic epitope of the F protein were under purifying selection.

415 With respect to the evolutionary analyses carried on with Nextstrain (25), HMPV-A and  
416 HMPV-B were calculated to diverge in a much more recent year than previous studies  
417 (41). This estimation was also calculated with BEAST 2 software, showing similar results  
418 (data not shown). This tMRCA might have changed due to the increased number of  
419 sequences available, as this study contributed with 187 new sequences dating between  
420 2009 and 2021. Also, it is important to note that there is a lack of information about  
421 ancestral samples, which is related to the fact that this virus was discovered only twenty  
422 years ago, although seroepidemiological studies demonstrated its circulation at least  
423 since 1958 (44). Regarding the tMRCA of A2C<sub>180dup</sub> and A2C<sub>111dup</sub>, they emerged 3-4  
424 years before their first description, which emphasizes the need of tracking the evolution  
425 of this rapidly evolving virus.

426 Though HMPV-A and HMPV-B lineages and sublineages had shown different  
427 predominance patterns, they showed a directional evolution, meaning both genotypes of  
428 HMPV are continuously evolving to adapt, probably with the objective of evading the  
429 immune response acquired in previous seasons, aiming staying in the human population.

430 Regarding the two new populations carrying the 180- and the 111-nucleotide  
431 duplications, A2c<sub>180dup</sub> and A2c<sub>111dup</sub>, both phylogenetic and evolutionary analyses  
432 demonstrated that they emerged from two independent genetic events, as stated by  
433 Saikusa (9). Thus, a new duplication event cannot be discarded, which it might happen  
434 in HMPV-B, since it shows such a similar profile to HMPV-A's.

435 Genomic surveillance is important to monitor HMPV evolution, as it allows the detection  
436 of emerging variants and the association of this findings to the clinical features of  
437 confirmed cases, which is relevant for public health purposes. Nextstrain has  
438 continuously proven its usefulness for this, especially during the SARS-CoV-2 pandemic,  
439 allowing the comparison of hundreds to thousands sequences (45). In the present study  
440 Nextstrain allows a real-time view of the evolution of HMPV, becoming a model to track  
441 the evolution of other respiratory viral pathogens, as it is currently done for enterovirus  
442 D68 (46). This knowledge, which is made public in Nextstrain, allow the prevention  
443 programmes of each community to adapt their response, for instance permitting the  
444 primary care centers and hospitals be promptly aware.

445 In conclusion, HMPV showed a significant morbidity throughout all the study period,  
446 affecting both paediatric and adult populations. This virus usually presented its epidemic  
447 peak in late winter and early spring in pre-pandemic seasons. However, since SARS-  
448 CoV-2 emerged, HMPV epidemic in 2020 was subtly interrupted and two epidemic peaks  
449 in summer and autumn 2021 were unexpectedly reported, the latter one almost doubling  
450 the virus' prevalence and increasing the median age of paediatric patients affected. The  
451 common shifts in predominance between HMPV-A and -B drastically changed to a vast  
452 majority of A2c<sub>111dup</sub> circulating, probably due to a more efficient immune evasion  
453 mechanism. Whole-genome sequences of HUVH and H12O permitted the ampliation of  
454 previous studies of evolution with the contribution of 187 new sequences dating between  
455 2009 and 2021, showing the patterns of selection and estimating the tMRCA for all  
456 genogroups of HMPV, as well as generating the visualization of phylogenetic and

457 evolutionary analyses on Nextstrain's environment. Finally, this study represents an  
458 example of virological surveillance in a tertiary university hospital, providing valuable  
459 knowledge of the real-time evolution of HMPV and its impact on health.

#### 460 **ACKNOWLEDGEMENTS**

461 This study was supported by the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness  
462 (grants BFU2016-78232-P), Instituto de Salud Carlos III and by the European Regional  
463 Development Fund, through the Interreg V-A programme: POCTEFA 2014-2020 (grant  
464 Pirepred EFA086/15). It was also co-financed by the European Development Regional  
465 Fund (ERDF) "A way to achieve Europe", Spanish Network for Research in Infectious  
466 Diseases (REIPI RD16/0016/0003), and supported by the Health Research Fund,  
467 Spanish Ministry of Economy and Competitiveness (Grant FIS PI18/00685).

468 We would like to thank all the team from the NGS platform and the respiratory viruses  
469 unit, both from the Microbiology Department of our hospital, for their restless work since  
470 the beginning of the SARS-CoV-2 pandemic.

#### 471 **REFERENCES**

- 472 1. Panda S, Mohakud NK, Pena L, Kumar S. Human metapneumovirus: Review of  
473 an important respiratory pathogen. *Int J Infect Dis.* 2014;25:45–52.
- 474 2. Shafagati N, Williams J. Human metapneumovirus - what we know now.  
475 *F1000Research.* 2018 Feb 1;7.
- 476 3. Jagušić M, Slović A, Ljubin-Sternak S, Mlinarić-Galinović G, Forčić D. Genetic  
477 diversity of human metapneumovirus in hospitalized children with acute  
478 respiratory infections in Croatia. *J Med Virol.* 2017;89(11):1885–93.
- 479 4. Chow WZ, Chan YF, Oong XY, Ng LJ, Nor'E SS, Ng KT, et al. Genetic diversity,  
480 seasonality and transmission network of human metapneumovirus: identification  
481 of a unique sub-lineage of the fusion and attachment genes. *Sci Rep.*  
482 2016;6(January):1–10.

- 483 5. Carr MJ, Waters A, Fenwick F, Toms GL, Hall WW, O’Kelly E. Molecular  
484 epidemiology of human metapneumovirus in Ireland. *J Med Virol.* 2008;80:510–  
485 6.
- 486 6. Piñana M, Vila J, Maldonado C, Galano-Frutos JJ, Valls M, Sancho J, et al.  
487 Insights into immune evasion of human metapneumovirus: novel 180- and 111-  
488 nucleotide duplications within viral G gene throughout 2014-2017 seasons in  
489 Barcelona, Spain. *J Clin Virol.* 2020 Nov;132(August):104590.
- 490 7. Piñana M, Vila J, Gimferrer L, Valls M, Andrés C, Codina MG, et al. Novel  
491 human metapneumovirus with a 180-nucleotide duplication in the G gene.  
492 *Future Microbiol.* 2017 Jun;12(7):565–71.
- 493 8. Saikusa M, Kawakami C, Nao N, Takeda M, Usuku S, Sasao T, et al. 180-  
494 nucleotide duplication in the G gene of human metapneumovirus A2b subgroup  
495 strains circulating in Yokohama city, Japan, since 2014. *Front Microbiol.*  
496 2017;8(March):1–11.
- 497 9. Saikusa M, Nao N, Kawakami C, Usuku S, Sasao T, Toyozawa T, et al. A novel  
498 111-nucleotide duplication in the G gene of human metapneumovirus. *Microbiol*  
499 *Immunol.* 2017;61(11):507–12.
- 500 10. Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipowski A, Kumar S. MEGA6: Molecular  
501 evolutionary genetics analysis version 6.0. *Mol Biol Evol.* 2013;30(12):2725–9.
- 502 11. Glez-Peña D, Gómez-Blanco D, Reboiro-Jato M, Fdez-Riverola F, Posada D.  
503 ALTER: Program-oriented conversion of DNA and protein alignments. *Nucleic*  
504 *Acids Res.* 2010;38(SUPPL. 2):14–8.
- 505 12. Tulloch RL, Kok J, Carter I, Dwyer DE, Eden J-S. An Amplicon-Based Approach  
506 for the Whole-Genome Sequencing of Human Metapneumovirus. *Viruses*  
507 [Internet]. 2021 Mar 18;13(3):499. Available from: [https://www.mdpi.com/1999-](https://www.mdpi.com/1999-4915/13/3/499)  
508 [4915/13/3/499](https://www.mdpi.com/1999-4915/13/3/499)

- 509 13. Bolger AM, Lohse M, Usadel B. Trimmomatic: A flexible trimmer for Illumina  
510 sequence data. *Bioinformatics*. 2014;30(15):2114–20.
- 511 14. Li H. Minimap2: pairwise alignment for nucleotide sequences. Birol I, editor.  
512 *Bioinformatics* [Internet]. 2018 Sep 15;34(18):3094–100. Available from:  
513 <https://github.com/ruanjue/smartdenovo>;
- 514 15. Wilm A, Aw PPK, Bertrand D, Yeo GHT, Ong SH, Wong CH, et al. LoFreq: A  
515 sequence-quality aware, ultra-sensitive variant caller for uncovering cell-  
516 population heterogeneity from high-throughput sequencing datasets. *Nucleic  
517 Acids Res*. 2012;40(22):11189–201.
- 518 16. Danecek P, Bonfield JK, Liddle J, Marshall J, Ohan V, Pollard MO, et al. Twelve  
519 years of SAMtools and BCFtools. *Gigascience*. 2021;10(2):1–4.
- 520 17. Langmead B, Salzberg SL. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nat  
521 Methods*. 2012;9(4):357–9.
- 522 18. Zhang X, Shao Y, Tian J, Liao Y, Li P, Zhang Y, et al. PTrimmer: An efficient tool  
523 to trim primers of multiplex deep sequencing data. *BMC Bioinformatics*.  
524 2019;20(1):1–6.
- 525 19. Prjibelski A, Antipov D, Meleshko D, Lapidus A, Korobeynikov A. Using SPAdes  
526 De Novo Assembler. *Curr Protoc Bioinforma*. 2020;70(1):1–29.
- 527 20. Rambaut A, Lam TT, Carvalho LM, Pybus OG. Exploring the temporal structure  
528 of heterochronous sequences using TempEst (formerly Path-O-Gen). *Virus Evol*.  
529 2016;2(1):1–7.
- 530 21. Delpont W, Poon AFY, Frost SDW, Kosakovsky Pond SL. Datamonkey 2010: a  
531 suite of phylogenetic analysis tools for evolutionary biology. *Bioinformatics*. 2010  
532 Oct;26(19):2455–7.
- 533 22. Kosakovsky Pond SL, Frost SDWW. Not so different after all: A comparison of  
534 methods for detecting amino acid sites under selection. *Mol Biol Evol*. 2005

- 535 May;22(5):1208–22.
- 536 23. Murrell B, Wertheim JO, Moola S, Weighill T, Scheffler K, Kosakovsky Pond SL.  
537 Detecting individual sites subject to episodic diversifying selection. Malik HS,  
538 editor. PLoS Genet. 2012 Jul;8(7):e1002764.
- 539 24. Murrell B, Moola S, Mabona A, Weighill T, Sheward D, Kosakovsky Pond SL, et  
540 al. FUBAR: A fast, unconstrained bayesian AppRoximation for inferring  
541 selection. Mol Biol Evol. 2013;30(5):1196–205.
- 542 25. Hadfield J, Megill C, Bell SM, Huddleston J, Potter B, Callender C, et al.  
543 Nextstrain: real-time tracking of pathogen evolution. Bioinformatics. 2018  
544 Dec;34(23):4121.
- 545 26. Sagulenko P, Puller V, Neher RA. TreeTime: Maximum-likelihood phylodynamic  
546 analysis. Virus Evol. 2018;4(1):1–9.
- 547 27. Cattoir L, Vankeerberghen A, Boel A, Van Vaerenbergh K, De Beenhouwer H.  
548 Epidemiology of RSV and hMPV in Belgium: a 10-year follow-up. Acta Clin Belg.  
549 2019 Jul 4;74(4):229–35.
- 550 28. García-García ML, Calvo C, Rey C, Díaz B, Molinero MDM, Pozo F, et al.  
551 Human metapneumovirus infections in hospitalized children and comparison with  
552 other respiratory viruses. 2005-2014 prospective study. PLoS One.  
553 2017;12(3):e0173504.
- 554 29. Jagusic M, Slovic A, Ivancic-Jelecki J, Ljubin-Sternak S, Vilibić-Čavlek T, Tabain  
555 I, et al. Molecular epidemiology of human respiratory syncytial virus and human  
556 metapneumovirus in hospitalized children with acute respiratory infections in  
557 Croatia, 2014–2017. Infect Genet Evol. 2019;76(September).
- 558 30. Andrés C, Piñana M, Borrás-Bermejo B, González-Sánchez A, García-Cehic D,  
559 Esperalba J, et al. A year living with SARS-CoV-2: an epidemiological overview  
560 of viral lineage circulation by whole-genome sequencing in Barcelona city

- 561 (Catalonia, Spain). *Emerg Microbes Infect.* 2021 Nov 29;1–30.
- 562 31. Zheng Z, Pitzer VE, Shapiro ED, Bont LJ, Weinberger DM. Estimation of the  
563 Timing and Intensity of Reemergence of Respiratory Syncytial Virus Following  
564 the COVID-19 Pandemic in the US. *JAMA Netw Open.* 2021;4(12):e2141779.
- 565 32. Zhang L, Liu W, Liu D, Chen D, Tan W, Qiu S, et al. Epidemiological and clinical  
566 features of human metapneumovirus in hospitalised paediatric patients with  
567 acute respiratory illness: a cross-sectional study in Southern China, from 2013  
568 to 2016. *BMJ Open.* 2018;8:6–12.
- 569 33. Benschop KS, Albert J, Anton A, Andrés C, Aranzamendi M, Armannsdóttir B, et  
570 al. Re-emergence of enterovirus D68 in Europe after easing the COVID-19  
571 lockdown, September 2021. *Eurosurveillance.* 2021 Nov 11;26(45).
- 572 34. Fourgeaud J, Toubiana J, Chappuy H, Delacourt C, Moulin F, Parize P, et al.  
573 Impact of public health measures on the post-COVID-19 respiratory syncytial  
574 virus epidemics in France. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2021;40(3):2389–95.
- 575 35. Regis E, Fontanella S, Lin L, Howard R, Haider S, Curtin JA, et al. Sex  
576 differences in innate anti-viral immune responses to respiratory viruses and in  
577 their clinical outcomes in a birth cohort study. *Sci Rep.* 2021;11(1):1–15.
- 578 36. Ursin RL, Klein SL. Sex Differences in Respiratory Viral Pathogenesis and  
579 Treatments. *Annu Rev Virol.* 2021;8:393–414.
- 580 37. Li J, Ren L, Guo L, Xiang Z, Paranhos-Baccalà G, Vernet G, et al. Evolutionary  
581 dynamics analysis of human metapneumovirus subtype A2: Genetic evidence  
582 for its dominant epidemic. *PLoS One.* 2012;7(3):1–9.
- 583 38. Schobel SA, Stucker KM, Moore ML, Anderson LJ, Larkin EK, Shankar J, et al.  
584 Respiratory Syncytial Virus whole-genome sequencing identifies convergent  
585 evolution of sequence duplication in the C-terminus of the G gene. *Sci Rep.*  
586 2016;6(May):26311.

- 587 39. Walls AC, Tortorici MA, Frenz B, Snijder J, Li W, Rey FA, et al. Glycan shield  
588 and epitope masking of a coronavirus spike protein observed by cryo-electron  
589 microscopy. *Nat Struct Mol Biol.* 2016;23(10):899–905.
- 590 40. Oketch JW, Kamau E, Otieno GP, Otieno JR, Agoti CN, Nokes DJ. Human  
591 metapneumovirus prevalence and patterns of subgroup persistence identified  
592 through surveillance of pediatric pneumonia hospital admissions in coastal  
593 Kenya, 2007-2016. *BMC Infect Dis.* 2019;19(1):1–13.
- 594 41. Nao N, Saikusa M, Sato K, Sekizuka T, Usuku S, Tanaka N, et al. Recent  
595 molecular evolution of human metapneumovirus (HMPV): Subdivision of HMPV  
596 a2b strains. *Microorganisms.* 2020;8(9):1–14.
- 597 42. Huang J, Diaz D, Mousa JJ. Antibody Epitopes of Pneumovirus Fusion Proteins.  
598 *Front Immunol.* 2019;10(November).
- 599 43. Xiao X, Tang A, Cox KS, Wen Z, Callahan C, Sullivan NL, et al. Characterization  
600 of potent RSV neutralizing antibodies isolated from human memory B cells and  
601 identification of diverse RSV/hMPV cross-neutralizing epitopes. *MAbs.* 2019 Nov  
602 17;11(8):1415–27.
- 603 44. van den Hoogen BG, de Jong JC, Groen J, Kuiken T, De Groot R, Fouchier  
604 RAM, et al. A newly discovered human pneumovirus isolated from young  
605 children with respiratory tract disease. *Nat Med.* 2001;7(6):719–24.
- 606 45. Van Poelvoorde LAE, Bogaerts B, Fu Q, De Keersmaecker SCJ, Thomas I, Van  
607 Goethem N, et al. Whole-genome-based phylogenomic analysis of the belgian  
608 2016–2017 influenza a(H3n2) outbreak season allows improved surveillance.  
609 *Microb Genomics.* 2021;7(9).
- 610 46. Dyrdak R, Mastafa M, Hodcroft EB, Neher RA, Albert J. Intra- and interpatient  
611 evolution of enterovirus D68 analyzed by whole-genome deep sequencing. *Virus  
612 Evol.* 2019 Jan 1;5(1):1–9.



613 **FIGURES AND TABLES**

614 **Table 1. Prevalence of HMPV before and during SARS-CoV-2 pandemic. Seasons**  
 615 **start at week 40 and last until week 39 of the following natural year.**

Season	Total samples received	Total samples from paediatric population	Total samples from adult population	Total samples positive for at least 1 respiratory virus (%)		HMPV-positive			
				n	% over total samples	% over paediatric population	% over adult population	% over positive samples	
2014 – 2015	6,207	3,509	2,698	2,360 (38%)	103	1.7%	1.8%	1.5%	4.4%
2015 – 2016	7,545	3,958	3,587	3,622 (48%)	167	2.2%	1.9%	2.5%	4.6%
2016 – 2017	7,836	3,598	4,238	3,978 (51%)	167	2.1%	2.7%	1.7%	4.2%
2017 – 2018	9,164	3,794	5,370	5,116 (56%)	333	3.6%	5.1%	2.6%	6.5%
2018 – 2019	8,496	3,912	4,584	4,675 (55%)	231	2.7%	3.5%	2.1%	4.9%
2019 – 2020	9,318	4,644	4,674	3,906 (42%)	191	2.0%	2.0%	2.1%	4.9%
<b>Total pre-pandemic seasons</b>	<b>48,566</b>	<b>23,415</b>	<b>25,151</b>	<b>23,657 (49%)</b>	<b>1192</b>	<b>2.5%</b>	<b>2.8%</b>	<b>2.1%</b>	<b>5.0%</b>
2020 – 2021	16,466	12,723	3,743	5,751 (35%)	201	1.2%	1.5%	0.2%	3.5%
2021 – 2022	7,231	2,786	4,445	1,960 (27%)	358	5.0%	12.4%	0.3%	18.3%
<b>Total pandemic seasons</b>	<b>23,697</b>	<b>15,509</b>	<b>8,188</b>	<b>7,711 (33%)</b>	<b>559</b>	<b>2.4%</b>	<b>3.5%</b>	<b>0.2%</b>	<b>7.2%</b>
<b>OVERALL</b>	<b>72,263</b>	<b>38,924</b>	<b>33,339</b>	<b>31,368 (43%)</b>	<b>1,751</b>	<b>2.4%</b>	<b>3.1%</b>	<b>1.7%</b>	<b>5.6%</b>

616

617

618 **Table 2. Characteristics of HMPV laboratory-confirmed patients. Distribution of age**  
 619 **and sex is represented for each cohort (paediatric and adult populations).**

Season	Paediatric population				Adult population			
	n	F	M	Age (median, IQR)	n	F	M	Age (median, IQR)
2014 - 2015	62	40,3%	59,7%	1.5 (0.5-3.0)	41	46,3%	53,7%	66.7 (54.4-79.9)
2015 - 2016	76	44,7%	55,3%	1.4 (0.8-3.2)	91	54,9%	45,1%	69.9 (59.1-78.7)
2016 - 2017	97	37,1%	62,9%	1.2 (0.6-2.6)	70	52,9%	47,1%	69.1 (58.1-81.5)
2017 - 2018	192	43,8%	56,3%	1.9 (0.8-3.6)	139	54,0%	46,0%	73.9 (62.1-84.4)
2018 - 2019	137	51,1%	48,9%	1.6 (0.6-4.3)	92	59,8%	40,2%	64.3 (52.1-79.9)
2019 - 2020	93	54,8%	45,2%	2.4 (1.3-3.9)	97	54,6%	45,4%	56.0 (51.6-82.7)
<b>Total prepandemic</b>	<b>657</b>	<b>45,7%</b>	<b>54,34%</b>	<b>1.7 (0.7-3.6)</b>	<b>530</b>	<b>54,53%</b>	<b>45,47%</b>	<b>69.5 (55.6-82.0)</b>
2020-2021	194	45,9%	54,1%	2.8 (1.6-4.6)	7	14,3%	85,7%	36.0 (26.7-61.6)
2021-2022	344	47,7%	52,3%	2.9 (1.5-4.2)	12	25,0%	75,0%	67.0 (60.5-71.0)
<b>Total during pandemic</b>	<b>538</b>	<b>47,0%</b>	<b>53,0%</b>	<b>2.9 (1.6-4.3)</b>	<b>19</b>	<b>21,05%</b>	<b>78,95%</b>	<b>62.9 (32.5-70.8)</b>

620

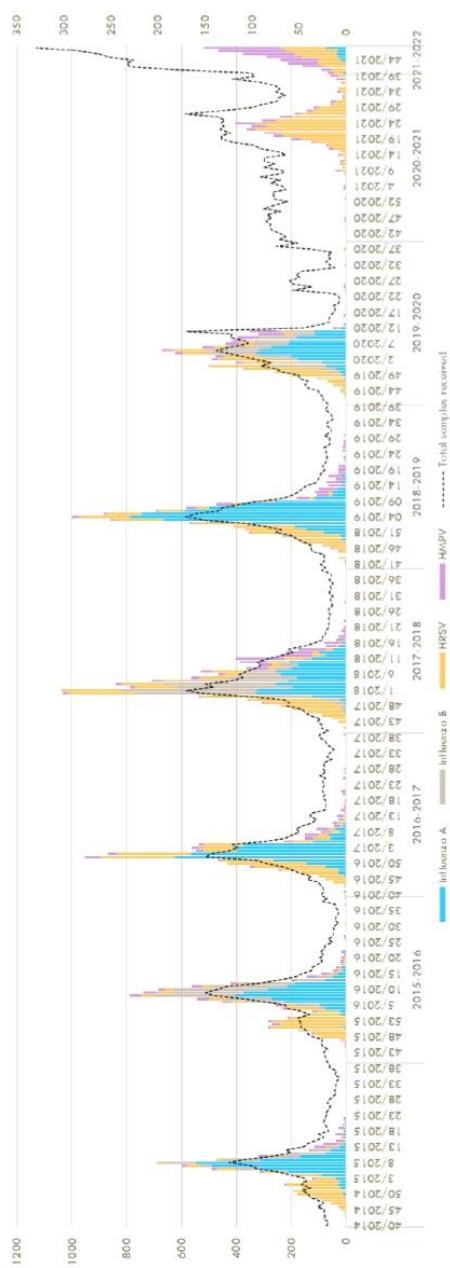
621

622 **Table 3. Selection profiles for the different proteins of HMPV.** Analyses were also  
 623 calculated for SH and G protein of HMPV-A and HMPV-B.

Protein	dN/dS	Sites (NO STOP)	Sites negatively selected		Sites positively selected	
			N	%	N	%
G-B	0,668	340	34	10%	19	6%
G	0,642	340	65	19%	15	4%
G-A	0,618	340	55	16%	15	4%
SH-A	0,386	186	43	23%	1	1%
SH	0,377	186	82	44%	3	2%
SH-B	0,367	186	47	25%	2	1%
M2-2	0,162	71	36	51%	0	0%
P	0,120	294	190	65%	1	0%
M2-1	0,064	187	110	59%	3	2%
L	0,054	2005	1416	71%	1	0%
F	0,045	539	390	72%	0	0%
N	0,035	394	281	71%	0	0%
M	0,021	254	187	74%	0	0%

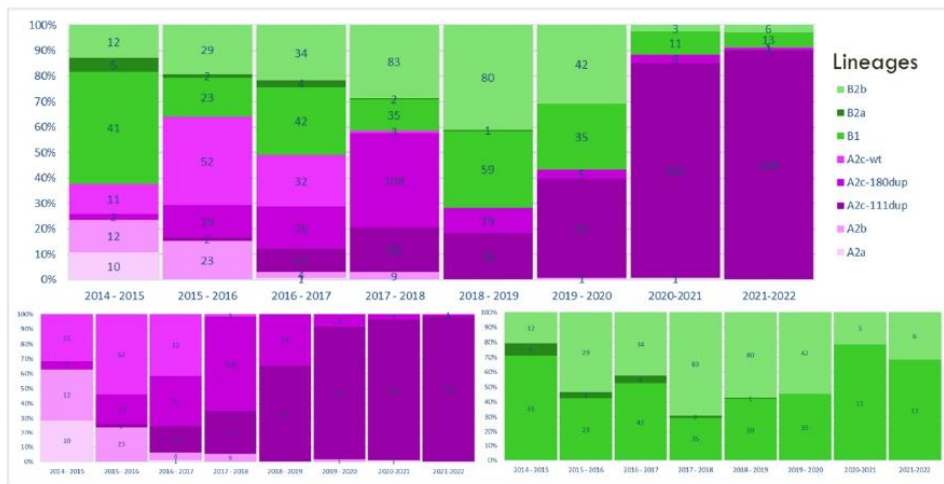
624

625



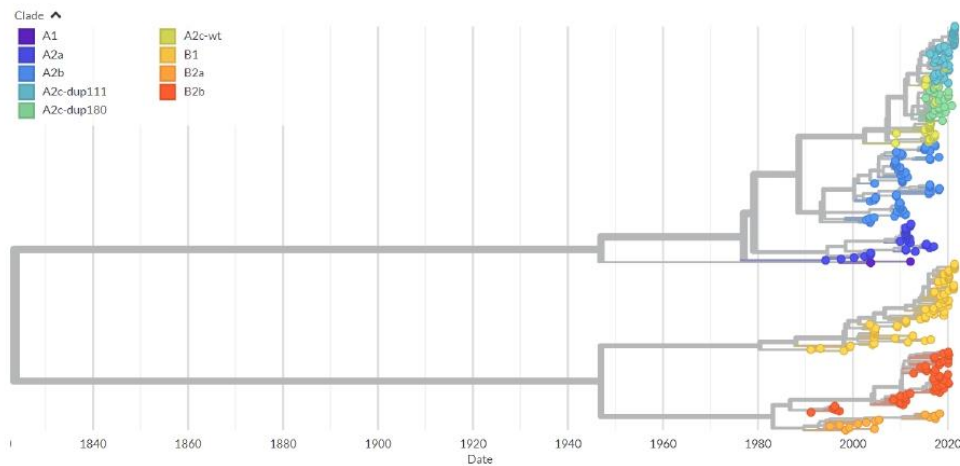
626

627 **Figure 1. Seasonality of HMPV, Influenza A, Influenza B and HRSV.** The X-axis  
628 represent the timeline of the study, the left Y-axis represents the number of total samples  
629 received and the right Y-axis represent the number of samples of each specific virus.  
630 The black arrow indicates the moment when the SARS-CoV-2 pandemic led to the  
631 lockdown in Spain.



632

633 **Figure 2. Circulation of the different subgenotypes and lineages of HMPV.** The  
 634 upper figure compares the circulation of both HMPV-A and -B throughout the study  
 635 period, while the figures below compare the subgenotypes and lineages within each  
 636 genotype.



637

638 **Figure 3. Phylodynamic analysis of whole-genome sequences from HMPV.** The  
 639 phylogenetic tree es shown as rendered by nextstrain, with sequenced labeled by  
 640 genetic group. The branch lengths correspond to the sampling date of the sample.

641

642 **Supplementary figure 1. Phylogenetic trees.** Phylogenetic trees G sequences from  
 643 HMPV-A and HMPV-B. The analyses were performed on G sequences from nucleotide  
 644 position 6340–6891 in reference to CAN97-83 strain (accession number AY297749) for  
 645 HMPV-A and 6319-6921 CAN98-75 (accession number AY297748) for HMPV-B. Both  
 646 phylogenetic trees were inferred by using the maximum likelihood method, based on  
 647 General Time Reversible. Numbers at the tree branch nodes represent the measure of  
 648 support calculated by the bootstrap method (1000 replicates); only those exceeding 70%  
 649 are shown. Sequences are marked with solid circles depending on when they were  
 650 collected (● 2014-2015, ● 2015-2016, ● 2016-2017, ● 2017-2018, ● 2018-2019, ○ 2019-  
 651 2020, ○ pandemic seasons). A2c sequences with duplications in the G protein have their  
 652 name in bold turquoise for the 180-nucleotide duplication and in bold pink for the 111-  
 653 nucleotide duplications

# Discusión



## 6 DISCUSIÓN

---

Hace 20 años del descubrimiento del HMPV, virus que según datos seroepidemiológicos ya había estado circulando por lo menos desde los años 50. Es un virus que desde un principio ya se asoció a una importante morbilidad en la población, observando un 100% de seroprevalencia en pacientes desde los 5 años de edad, lo cual demuestra que la exposición al virus ya ocurre en los primeros años de edad (1,86). Si bien este virus se asoció en un principio a la infección respiratoria aguda en población pediátrica (67,110,111), diferentes estudios han permitido desvelar que también juega un papel importante en la enfermedad respiratoria aguda del adulto en estos últimos años. A pesar del escaso conocimiento de la diversidad genética de este virus, que es incluso mayor que la del HRSV, sorprende el elevado número de estrategias diferentes que presenta para poder evadir el sistema inmune y así esquivar la inmunidad preexistente en individuos que ya han pasado la infección previamente, mediante las diferentes estrategias de interrupción de la vía de señalización que lleva a la producción de interferón, por ejemplo. Y todavía queda mucho por conocer sobre la naturaleza de este virus. Así, el objetivo que se persigue en esta Tesis Doctoral es conocer la prevalencia, estacionalidad y diversidad genética de los HMPV detectados en la población atendida en el HUVH, realizando una vigilancia de la emergencia y evolución de las posibles nuevas variantes de este virus, así como del impacto que puedan tener a nivel de población humana y viral, para contribuir en un mejor conocimiento de la infección respiratoria por este virus.

Esta Tesis Doctoral se ha desarrollado en tres fases que se han traducido en los tres artículos que se adjuntan. Ya que el virus clásicamente había sido considerado como un “virus pediátrico” (67,110,111), nuestro primer estudio se orientó al estudio de la infección respiratoria por HMPV en esta población, describiendo la prevalencia, estacionalidad, diversidad genética e impacto clínico en esa población durante dos temporadas. Tras observar la importancia del HMPV en el paciente pediátrico atendido en nuestro hospital y las últimas evidencias sugiriendo que el HMPV también era un patógeno importante en la población adulta (2), se realizó un segundo estudio de tres temporadas añadiendo también esta población, aportando datos actualizados sobre prevalencia, diversidad genética, y características clínicas, pero también llevando a cabo un estudio de biología estructural para conocer mejor la naturaleza tridimensional de las duplicaciones que se pudieron detectar en la proteína G en nuestra primera aproximación para describir la diversidad genética viral. Estos dos primeros artículos evidenciaron la importancia de realizar una vigilancia epidemiológica y virológica del



HMPV, como la que ya se realiza en virus con gran morbilidad como los virus de la gripe y el virus respiratorio sincitial humano. Esto motivó la realización de un tercer estudio que prolongó esta vigilancia hasta la temporada 2021-2022, esta vez trabajando con secuencias de genoma completo para su caracterización, que, además de describir su divergencia, ha permitido conocer mucho mejor su evolución.

La prevalencia del HMPV observada en los tres estudios fue similar en la mayoría de las temporadas, aunque con algunos cambios a lo largo del periodo de estudio, observando un aumento de esta proporción en los picos epidémicos de las temporadas 2017-2018 y en 2021. Esta prevalencia, habitualmente del 2-3% tanto en paciente pediátrico como en adulto, era ligeramente inferior en comparación a los resultados de otros estudios realizados en población pediátrica en España y otras regiones del mundo (112–116), de entre el 3 y el 14%, aunque muy similar a la observada en estudios que incluían pacientes de todas las edades (73,74,78,117), de entre el 2 y el 7%. De hecho, para ser un virus clásicamente considerado como pediátrico, sorprendió que la prevalencia en ambas poblaciones fuera tan similar, observando incluso como fue mayor en la población adulta en alguna de las temporadas.

Algunos cambios en la prevalencia observados a lo largo del estudio tienen una explicación metodológica. El incremento de la prevalencia del HMPV observado a lo largo de las tres primeras temporadas, fue probablemente debido a la implementación progresiva de las técnicas moleculares que había sido llevada a cabo en nuestro hospital desde el año 2013. Mientras que en la primera temporada la mayoría de las muestras eran procesadas por una técnica de inmunofluorescencia directa y solo unas pocas lo eran por RT-PCR, esta proporción fue revirtiendo hasta llegar a un 100% de muestras procesadas por RT-PCR en la temporada 2017-2018. Si bien ambas técnicas incluían el HMPV como dianas para el diagnóstico, las técnicas moleculares tienen una mayor sensibilidad, razón por la cual, a mayor uso de estas técnicas, mayor número de casos detectados.

Otro de los factores que también podrían influir en una menor prevalencia, aunque su efecto debería ser muy limitado, es el algoritmo diagnóstico de nuestro laboratorio, teniendo en cuenta tanto las técnicas rápidas como las técnicas de rutina. De entre las muestras estudiadas, un porcentaje importante de éstas fueron procesadas por técnicas rápidas para el diagnóstico de los virus de la gripe y HRSV, sobre todo durante los picos epidémicos anuales. Según este algoritmo diagnóstico, aquellas muestras que fueron positivas para HRSV o para los virus de la gripe mediante estas pruebas rápidas, no fueron procesadas más tarde por la PCR multiplex de rutina para el diagnóstico microbiológico de los virus respiratorios, entre ellos

HMPV. Así, es posible una infraestimación de los HMPV que pudieran estar en codetección con los virus de la gripe y el HRSV. Sin embargo, consideramos que esto es poco probable ya que las tasas de codetección de HMPV con estos virus respiratorios a partir de los datos de la PCR multiplex no son frecuentes.

En cuanto a la circulación del HMPV en nuestro medio, este trabajo describe un patrón habitual de estacionalidad con una mayor circulación a partir del descenso de la curva epidémica de los virus de la gripe, en el mes de febrero, y termina en los meses de primavera, en los meses de abril y mayo, tal como se había descrito en otros estudios (2,78,94,113,118,119). Es importante remarcar que esta estacionalidad es similar en las regiones templadas del hemisferio norte y sur (86), pero muy diferente a lo descrito en las zonas tropicales, donde se ha descrito una atemporalidad más relacionada con las épocas de monzón (73). Sin embargo, durante este periodo de estudio hemos podido observar cambios en esta circulación, como lo ocurrido en la temporada 2016-2017, cuando se observaron dos picos epidémicos bien diferenciados, el primero a mediados de diciembre y el segundo a finales de febrero y principios de marzo. Como detalle, no se observaron diferencias en los genotipos circulantes entre ambos picos epidémicos.

Como contexto del periodo incluido en este estudio, cabe destacar que en diciembre del año 2019 emergió el SARS-CoV-2, causante de la enfermedad COVID-19 (120). Tres meses después, en marzo de 2020, la organización mundial de la salud (OMS) declaró el estado de pandemia. Hemos podido observar cuál ha sido el impacto de la pandemia de SARS-CoV-2 en la detección y circulación del HMPV y otros virus respiratorios, especialmente el impacto de los confinamientos, la restricción del movimiento de personas y de las medidas no farmacológicas implementadas para el control de la pandemia y para reducir la transmisión de este virus. Seguramente, son estas medidas las que han cambiado el patrón de circulación de los virus respiratorios, desplazando su circulación al menos hasta los meses de verano de 2020 (121–123). Ese verano, diversos estudios describieron el repunte de rinovirus, enterovirus y adenovirus, todos ellos carentes de envuelta lipídica (124–126). Es importante remarcar que los virus que no tienen envuelta lipídica son más resistentes a los geles hidroalcohólicos y resisten en superficies durante más tiempo que los virus con envuelta. Tras el verano de 2020, llegó un invierno marcado por la emergencia de una nueva ola de SARS-CoV-2 (la tercera en nuestro país) (127) pero que destacó sobre todo por la ausencia de las esperadas epidemias de gripe, HRSV y HMPV (123,126). Esta ausencia de HMPV, igual que la ausencia de gripe o HRSV, podría ser debida a las medidas adoptadas por Salud Pública para frenar el avance de la pandemia. Sin embargo, cabe destacar que parte de lo ocurrido desde el inicio de la pandemia hasta los meses

de otoño de 2020 no esté probablemente bien descrito a nivel mundial en cuanto a la circulación de los virus respiratorios, ya que las prioridades de los sistemas de vigilancia y de los laboratorios clínicos estaban enfocadas a incrementar la capacidad para el diagnóstico del SARS-CoV-2, primero en el paciente ingresado y más tarde en la comunidad, relajando esa vigilancia virológica que nos ha permitido temporada tras temporada disponer de una información continuada y a tiempo real de la circulación de los diferentes virus respiratorios.

No fue hasta bien entrada la primavera de 2021 que se detectó un brote epidémico de HMPV, y más tarde en los meses de otoño e invierno, otro inesperado pico epidémico de HMPV, ambos picos epidémicos con la circulación paralela del HRSV, que también dibujó este patrón. A lo largo de ocho años de vigilancia, estos hechos ocurridos tras la pandemia de SARS-CoV-2 se consideran extraordinarios. Además, el segundo pico de HMPV mostró una prevalencia de casi el doble a la mediana observada en las temporadas pre-pandémicas, incrementando la prevalencia en la población pediátrica hasta un 12%. Este incremento de prevalencia en la población pediátrica sugiere que ha habido un incremento de población susceptible, pues hasta dos generaciones de niños y niñas no tuvieron ocasión de exponerse a la circulación de HMPV debido a la ausencia de circulación de éstos durante el invierno y primavera de 2020-2021, razón por la cual no habrían adquirido protección inmunitaria específica frente a la infección, un porcentaje de los cuales acaban siendo atendidos en los hospitales pediátricos. Esta alta incidencia había sido predicha para el HRSV (128), pero puede ser extrapolada para lo sucedido con el HMPV. Este hecho también había sido observado tras la pandemia de gripe del año 2009, donde el HMPV vio su estacionalidad afectada, y reemergió con intensidad y un gran aumento de prevalencia que no continuó en las siguientes temporadas (72).

En la mayoría de los casos detectados en nuestro hospital, el HMPV fue el único virus detectado en las muestras estudiadas, aunque la tasa de codetección con otros virus respiratorios no difiere de lo publicado anteriormente (115,118,119). Hay mucha controversia con el papel que juegan las codetecciones en una mayor gravedad del curso clínico de los pacientes. Mientras algunos estudios concluyen que no hay ninguna asociación, otros la asocian a un peor pronóstico (129,130), siendo así no concluyentes. En cualquier caso, estos estudios de asociación deberían realizarse junto a otra técnica que demostrara la viabilidad del virus para demostrar cuál es el responsable de la infección activa, es decir, qué agente patógeno es el causante de la enfermedad respiratoria aguda que motiva el estudio de esa muestra respiratoria. En el caso de realizar este estudio sólo por técnicas moleculares, la detección de una determinada diana solo confirma la presencia de su material genético. Puede ser, por lo

tanto, que aún no se haya aclarado el virus o su material genético del tracto respiratorio tras una infección pasada, y por eso sea detectado por estas técnicas de gran sensibilidad. Aun así, en el caso de coinfecciones reales donde dos o más virus respiratorios están replicando al mismo tiempo, se suele dar una competición por los recursos disponibles en las células del huésped, predominando el virus que presenta una mayor tasa de replicación (129).

A lo largo de las seis primeras temporadas, aquellas correspondientes al periodo prepandémico, se observó que los virus más comúnmente detectados junto al HMPV eran, en orden descendente, rinovirus, adenovirus, bocavirus y enterovirus (115,118). Existen dos razones por las que estos virus son las codetecciones más usuales. Por una parte, el rinovirus, adenovirus y enterovirus son patógenos con una alta prevalencia, y la circulación atemporal de los rinovirus y adenovirus coincide con las epidemias del HMPV (131–133). Por otra parte, en el caso del bocavirus en particular, es un virus que tiene una excreción muy prolongada, con casi un 50% de codetecciones con otros virus respiratorios. El hecho que se pueda detectar hasta 6 meses después de la infección (134,135) podría ser la razón de esta alta tasa de codetecciones, también con HMPV. Dado que este estudio se ha realizado en un hospital terciario con pacientes de alta complejidad, una gran proporción de los pacientes presentan algún grado de inmunosupresión, por lo que no sería de extrañar que presentaran una excreción prolongada de diversos virus respiratorios, facilitando esta codetección de HMPV con rinovirus, adenovirus o enterovirus. Además, no se descarta para la mayor parte de los virus respiratorios que pueda existir excreción viral prolongada incluso cuando el paciente ha dejado de ser sintomático, como sabemos que ocurre con los rinovirus o el SARS-CoV-2 entre otros.

Mientras que la tasa de codetecciones se mantuvo estable a lo largo de las temporadas prepandémicas, en el segundo pico epidémico de 2021 tras la emergencia de SARS-CoV-2, y correspondiente a la temporada 2021-2022, la tasa de codetecciones aumentó hasta un 32%. El rinovirus continuó siendo el virus más observado en codetección con HMPV, pero el siguiente virus más detectado en codetección fue el enterovirus, a diferencia de lo observado en temporadas anteriores. Esta observación se puede asociar al cambio en el patrón estacional, pues es bien conocido que los enterovirus suelen tener una mayor circulación en otoño (133), y hay que resaltar que este otoño de 2021 se describió una epidemia de enterovirus de gran intensidad, marcada por una gran circulación de EV-D68 (136), que al igual que los virus de la gripe, el HRSV, y el HMPV, su circulación se había desplazado casi más allá de un año de los esperado debido a la pandemia.

En cuanto a las características demográficas de los pacientes afectados por HMPV, se observó una mayor incidencia en el paciente pediátrico menor de 2 años, como se había reportado previamente (2,86). Sin embargo, después de iniciarse la pandemia, la mediana de edad del paciente pediátrico aumentó hasta los 3 años. Estos datos serían coherentes con la hipótesis planteada anteriormente, donde al haber una mayor proporción de población pediátrica susceptible a la infección por HMPV, aumentarían tanto la prevalencia del virus como la edad mediana del paciente que requiere atención sanitaria. En cuanto al paciente adulto, la mediana de edad observada fue de 70 años, aunque se comienza a observar una mayor incidencia de este virus a partir de los 55 años de edad. Por otra parte, a lo largo de las ocho temporadas estudiadas, se observó una tendencia hacia una mayor detección de HMPV en paciente pediátrico de sexo masculino, que ya había sido descrito en otros artículos para diversos virus respiratorios, pues estos pacientes presentan una respuesta inmunitaria innata menos efectiva que la presentada por pacientes pediátricos de sexo femenino (137). Por el contrario, se observó una tendencia hacia una mayor afección en el paciente adulto de sexo femenino, lo cual podría estar asociado a cambios hormonales y a una respuesta inmunitaria innata menos eficiente que la del paciente adulto de sexo masculino (138).

Con el objetivo de describir la diversidad genética a nivel de genotipo, subgenotipo y linajes, se realizó la caracterización molecular de los HMPV detectados en nuestro hospital a partir de la secuencia parcial del gen codificante para la proteína G mediante el método Sanger. A lo largo de ocho temporadas se ha podido observar una co-circulación variable de los genotipos HMPV-A y HMPV-B, con cambios de predominio pero sin superar el 70%, similar a lo descrito previamente (117). Este cambio de predominio cíclico sugiere que la inmunidad creada por infecciones pasadas es efímera (66), permitiendo la reinfección del genotipo que ya había circulado anteriormente. Curiosamente, en la tercera temporada (2016-2017) se observó una circulación equivalente entre genotipos. Esto podría ser debido a un estado intermedio de alternancia de genotipos, o quizá podría estar relacionado con la emergencia de nuevas variantes virales del genotipo HMPV-A que aportarían nuevas características antigénicas que podrían evadir la inmunidad creada en la temporada anterior, pudiendo mantener así su prevalencia. Al llegar la temporada 2017-2018, se observó un aumento considerable de la prevalencia de HMPV. Esto sugiere que hubo un incremento de circulación de HMPV-B debido a la alternancia cíclica esperada, sin embargo, no hubo un descenso en la circulación de HMPV-A, probablemente debido a la emergencia de variantes con nuevas características antigénicas. Tras la emergencia del SARS-CoV-2, en los dos picos epidémicos descritos de HMPV en 2021 y fuera de lo que se consideraría periodo estacional típico, se observó que el predominio del

genotipo HMPV-A aumentó hasta superar el 90%, siendo un porcentaje de predominancia nunca observado en temporadas anteriores o publicado previamente en otras regiones.

En cuanto a la clasificación de subgenotipos y linajes, se observó la circulación de todos los hasta ahora descritos excepto la del subgenotipo A1, que no se ha detectado desde el año 2006 y que sería un subgenotipo ancestral ya extinguido (41). Es importante remarcar que entre la publicación del primer y segundo estudios hubo confusión en la nomenclatura a utilizar, donde los sublinajes denominados como A2b1 y A2b2 para algunos autores (72,139) eran genéticamente indistinguibles de los linajes denominados como A2b y A2c para otros (73,140), respectivamente. Aunque en nuestro primer estudio se utilizó la nomenclatura anterior, en esta Tesis Doctoral se ha utilizado la nomenclatura que incluye los linajes A2b y A2c. De nuevo, y como ocurre con HRSV, existe la necesidad urgente de una clasificación oficial, así como de definir unos criterios universales para determinar cuando son nuevos genotipos o linajes para una correcta vigilancia.

Disponer de una secuencia parcial de la región codificante de la proteína F permitió su caracterización. El análisis filogenético de estas secuencias permitió observar si se mantenía o no la agrupación y clasificación de secuencias tal como se observaba en la filogenia de las secuencias parciales de la proteína G. Se observó una congruencia entre filogenias mayoritaria que, dado que no ha habido descripción de ningún evento de recombinación en este virus, era lo esperado. Aunque sí ha habido un estudio que sugiere que haya habido eventos de recombinación en el pasado (85), no se ha encontrado ningún virus en el que se pueda ver claramente este tipo de evento genético.

Uno de los principales hallazgos del primer estudio incluido en esta Tesis Doctoral fue la descripción de una duplicación de 180 nucleótidos en el gen codificante para la proteína G. Esta duplicación ocurrió en el ectodominio de la proteína G de una variante perteneciente al linaje A2c. Esta fue la primera descripción de una duplicación en el género de los metapneumovirus, ya que nunca había sido reportado ni para el HMPV ni para el AMPV. Un evento genético similar ocurrió en HRSV, curiosamente, tanto en el grupo genético HRSV-A como en el HRSV-B, también en el ectodominio de la proteína G. Estas duplicaciones fueron de 72 y 60 nucleótidos (141,142), dando lugar a los nuevos genotipos ON1 y BA de HRSV, que tiempo después de su emergencia llegarían a reemplazar a todos los genotipos preexistentes, y que actualmente son solo estas variantes portadoras de duplicaciones las que se encuentran en circulación, sugiriendo que estas duplicaciones son una ventaja evolutiva (143). Poco después que comunicáramos este hallazgo en el congreso anual de la *European Society for Clinical Virology* (ESCV), en septiembre de 2016

(144), y al mismo tiempo que se publicaba nuestro primer trabajo, esta misma duplicación fue también detectada en Japón (145), revelando que estas variantes virales portadoras de la duplicación de 180 nucleótidos ya circulaban a nivel mundial, siendo de esperar que otros países también reportaran su detección más tarde (117,146). Muy poco tiempo después de la descripción de la duplicación de 180 nucleótidos, en 2017, describimos la emergencia de una segunda duplicación de 111 nucleótidos en la misma región donde había surgido la de 180, siendo excluyentes la una de la otra en el *European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* de abril de 2017 (147), publicado unos meses más tarde por el mismo equipo de Japón (148).

Se observó una ausencia de agrupación de la proteína F de los virus portadores de duplicaciones, y esto podría tener diversas causas. La primera, podría ser que fuera un evento genético tan reciente en el tiempo, que la proteína F, conocida por su lento avance evolutivo en comparación a la proteína G, no hubiera tenido tiempo de divergir lo suficiente como para poder observar separación de estos nuevos grupos genéticos del grupo original donde emergieron las mutaciones. La segunda explicación podría ser que realmente fueron diversos eventos genéticos independientes que llevaron a la emergencia de diferentes duplicaciones de 180 nucleótidos y diferentes duplicaciones de 111 en la misma región. Esta última hipótesis, aunque improbable, es la hipótesis que se tiene de las duplicaciones ocurridas en HRSV. Por una parte, Trento realizó una predicción de la estructura secundaria que tenía la secuencia de ARN viral en la región donde había encontrado la duplicación de 60 nucleótidos, del genotipo BA9. Esta estructura sugería que la región original que sería duplicada se encontraba en un *hairpin*, hecho que podría provocar que la polimerasa viral, al acabar de replicar esta región, saltara por error al inicio de este *hairpin*, replicando de nuevo esta región y creando así la duplicación (142). Por otra parte, Comas-García demostró años más tarde que la duplicación de 72 nucleótidos presente en el genotipo ON1 de HRSV no provenía de un solo evento, sino que había emergido paralelamente desde diversos virus pertenecientes al genotipo GA2 (149). Esta conclusión fue basada en la diferente huella genética que tenían los diferentes virus que presentaban esta duplicación. La forma más probable de que hubiera sucedido de esta manera sería que en este genotipo también se encontrara la estructura en *hairpin* que Trento demostró que se formaba en BA. A nuestro conocimiento, la estructura del ARN viral del gen codificante para la proteína G de HMPV aún no ha sido estudiada, pero en el caso que se encontrara un *hairpin* similar al descrito por Trento para HRSV, explicaría por qué se han dado las dos duplicaciones de 180 y 111 nucleótidos en esta proteína del HMPV, por qué ha sucedido en la misma región, y por qué no agrupan las secuencias de la proteína F para los virus portadores de estas dos duplicaciones.

En cuanto a la circulación de los diferentes subgenotipos y linajes pertenecientes al genotipo HMPV-A, parece que las variantes circulantes van siendo reemplazadas a medida que emergen nuevas variantes. El subgenotipo A1 se sugiere que ya se ha extinguido, pues no hay datos sobre su circulación en los últimos años (140), tampoco en nuestro estudio tal como hemos comentado, en favor de la circulación del subgenotipo A2. Este subgenotipo se subdividió en linajes con el tiempo, que también fueron desplazados a medida que emergían otros linajes nuevos. En nuestro estudio de ocho temporadas, podemos ver como el linaje A2a fue desplazado por el A2b, que a su vez fue desplazado por el A2c no portador de duplicaciones (A2c<sub>wt</sub>), y como con la emergencia de las variantes virales portadoras de duplicaciones, la prevalencia de los A2c<sub>wt</sub> comenzó a disminuir en favor de un aumento progresivo de la prevalencia de ambas variantes portadoras de duplicaciones. Sin embargo, debemos remarcar cómo la variante portadora de la duplicación de 180 nucleótidos (A2c<sub>180dup</sub>), la más prevalente en un inicio, fue sustituida de forma progresiva pero rápida por la variante portadora de la duplicación de 111 nucleótidos (A2c<sub>111dup</sub>), hasta el punto de ser el 99% de las variantes portadoras de duplicaciones detectadas en la última temporada.

En cuanto al genotipo HMPV-B, se observó una circulación muy similar de los subgenotipos B1 y B2. Este genotipo presentó un comportamiento muy diferente al observado para HMPV-A, donde los grupos genéticos B1 y B2b coexisten, dibujando un patrón de predominancia cíclica del grupo predominante, similar a lo que se había observado al comparar la circulación de HMPV-A y -B.

Poco antes del inicio de esta Tesis Doctoral, Leyrat hipotetizó que, debido al desorden intrínseco de la proteína G, su hipervariabilidad genética, su elevada O-glicosilación, y su co-localización con la proteína F, una de las funciones que podría tener la proteína G sería la de hacer de escudo de la proteína F para enmascarar sus epítomos antigénicos de la acción de los anticuerpos neutralizantes (37). Este mecanismo sería similar al descrito para otros virus que han demostrado evadir el sistema inmune gracias a las glicosilaciones presentes en sus proteínas de membrana. Entre estos virus se incluyen el virus del ébola, el virus de la hepatitis C, el virus de la gripe A, el virus de la inmunodeficiencia humana, el virus Nipah y el arenavirus (150).

Las duplicaciones de 180 y 111 nucleótidos que describimos en las variantes de HMPV que han incrementado su prevalencia las últimas temporadas aportarían 23-26 y 12-14 lugares adicionales de O-glicosilación, respectivamente, probablemente para modificar las propiedades antigénicas de las nuevas variantes en comparación a las anteriores, en caso de ser cierta esta hipótesis. Con el objetivo de aportar nuevas evidencias a esta hipótesis se estudió el impacto de



estas dos duplicaciones en la estructura de esta proteína. Para poder comparar las estructuras de las proteínas con una duplicación con la de una proteína no portadora de duplicaciones, era necesario comprobar que la región duplicada tenía las mismas características estructurales que la original. Tras comprobar que las regiones de la duplicación eran tan desordenadas intrínsecamente como el resto de la secuencia del gen codificante para la proteína G, que no había segmentos autoagregativos y que el patrón de O-glicosilaciones era similar a la distribución observada en la proteína, se procedió a la comparación *in silico* del ensamblado más probable del ectodominio de las proteínas G de las variantes A2C<sub>wt</sub>, A2C<sub>180dup</sub> y A2C<sub>111dup</sub>. Esta predicción sugirió que las proteínas G portadoras de duplicación sobresalían de la membrana más que la proteína que no era portadora de la duplicación, alejándose de la membrana lipídica más allá de lo que mide la proteína F en un 23% de los casos en las variantes A2C<sub>wt</sub>, en un 39% de los casos en las variantes A2C<sub>111dup</sub>, y en un 46% de los casos en las variantes A2C<sub>180dup</sub>. Esta observación respalda la hipótesis de Leyrat (37) sobre el papel de la proteína G como escudo de la proteína F para enmascarar sus epítomos antigénicos, y por ello refuerza la hipótesis de que estas nuevas duplicaciones serían un mecanismo de evasión del sistema inmune.

Inicialmente podríamos pensar que, si la proteína G del linaje A2C<sub>180dup</sub> sobresale más y, por tanto, cubre mejor la proteína F que la proteína G del linaje A2C<sub>111dup</sub>, esta duplicación de 180 nucleótidos sería un mejor mecanismo de evasión, pudiendo ser el linaje más prevalente. Aunque en el inicio del periodo de estudio sí hemos podido ver como parecía que esto si iba a ocurrir, la variante portadora de la duplicación de 111 nucleótidos se acabó imponiendo. Dado el escaso conocimiento sobre el comportamiento evolutivo que pueden tener unas duplicaciones de este tamaño, en este trabajo se sugiere que, o bien la duplicación de 180 nucleótidos requería demasiada energía por parte del virus para mantenerla, o bien al cubrir demasiado la proteína F, el proceso de activación de esta proteína se veía afectado, limitando así la fusión de membranas y, por tanto, limitando la propagación del virus.

El linaje A2C<sub>111dup</sub>, pues, no solo ha logrado desplazar al resto de grupos genéticos de HMPV-A, también ha desplazado casi en su totalidad al genotipo HMPV-B tras la pandemia. No es la primera vez que se detecta un aumento de morbilidad de HMPV, que además estuviera relacionado con un cambio en los virus en circulación. En invierno de 2010, tras la pandemia de gripe A(H1N1)pdm09, se detectó un aumento de prevalencia de este virus, especialmente del genotipo HMPV-A, en Israel (72) Muy probablemente también ocurrió en otras áreas geográficas, pero no existe una gran vigilancia de este virus respiratorio a nivel mundial. Paralelamente, otro estudio publicado en esta misma época describió que el linaje A2c

(anteriormente denominado A2b2) había predominado más años que los subgenotipos B1 o B2, además de presentar una mayor distancia genética intragrupo que los demás grupos genéticos establecidos (151). Ambos estudios sugerían que este linaje A2c evadía el sistema inmune de una manera más eficiente que los subgenotipos de HMPV-B, hecho que explicaría el predominio que presenta. Así, las evidencias sugieren que la proteína G del linaje A2C<sub>111dup</sub> sería un mejor mecanismo de evasión de la respuesta inmunitaria que su predecesor A2C<sub>wt</sub>, observando la gran prevalencia que en general ha presentado el genotipo HMPV-A, y especialmente durante el último pico con una gran morbilidad asociada, por lo que podemos deducir que las próximas temporadas podríamos observar un nuevo salto evolutivo para este nuevo linaje.

La longitud de la proteína G no solo se ve afectada por la emergencia de estas dos duplicaciones de 180 y 111 nucleótidos. Otro fenómeno genético común en este virus es la adquisición de codones stop prematuros (140), también observado en la proteína G del HRSV (152). Los linajes A2b y A2C<sub>wt</sub> (no portadores de duplicación), por ejemplo, incluían proteínas G de 218 y 220 aminoácidos, respectivamente. En cuanto al subgenotipo B1, se observó la agrupación de las secuencias en dos clústeres diferentes, denominados I y II en este trabajo, tan solo para su diferenciación en la descripción, y mostraron tener una diferencia de 10 aminoácidos de longitud entre ellas, que quizá podrían evolucionar en nuevos linajes con el tiempo. Además de estas largas duplicaciones, y estos codones stop prematuros, la longitud de las proteínas G también se puede ver modificada por duplicaciones cortas en el subgenotipo B2. En este grupo genético hemos podido observar hasta dos duplicaciones de la pareja aminoacídica KE de la posición 160-161, y también se observó un grupo diferenciado que, en vez de tener estas pequeñas duplicaciones, tenía la inserción de una R tras el primer grupo KE. La emergencia de estas variantes del subgenotipo B2 deberían ser monitorizadas, como las duplicaciones de 180 y 111, o los nuevos subgenotipos B1 con codones stop prematuros para extrapolar una posible ventaja evolutiva.

En cuanto a la relevancia clínica del virus, resumida en los dos primeros estudios de esta Tesis Doctoral, la infección por HMPV se asocia sobre todo a infección del tracto respiratorio inferior. Además, se observó una asociación entre la infección de tracto respiratorio inferior y una menor edad del paciente pediátrico, mientras que esta asociación se invertía en el paciente adulto, siendo el de más edad el que tenía más probabilidad de desarrollar una infección de tracto respiratorio inferior, tal como se había descrito en la literatura (2). De hecho, los cálculos realizados permitieron dar un valor a esta asociación, estimando un incremento de 1,03 veces la probabilidad de sufrir infección del tracto respiratorio inferior por cada año de edad en el

paciente adulto. Las cardiopatías estaban más presentes en los casos con infección del tracto respiratorio inferior, aunque probablemente esta asociación era debida a que en este grupo se encontraba un gran número de pacientes mayores de 64 años. Las comorbilidades también fueron asociadas al desarrollo de infección de tracto respiratorio inferior en el paciente pediátrico, especialmente las comorbilidades respiratorias o la inmunosupresión, pero no la prematuridad, al contrario que otros estudios anteriores (153–156). Se observó un uso de tratamientos antibióticos mayor en los casos que con infección del tracto respiratorio inferior, aunque solo el 8% de pacientes pediátricos y el 30% de pacientes adultos tratados con antibióticos acabaron teniendo un cultivo positivo, pues la infección por HMPV rara vez se ve asociada con una infección bacteriana (157). Este uso de antibióticos siempre estaría no indicado. Así, si dispusiéramos de pruebas de diagnóstico rápido para HMPV para estos casos con sospecha de infección del tracto respiratorio inferior, tal como ya tenemos para HRSV o los virus de la gripe, no sería necesario instaurar este tratamiento antibiótico en el caso de un resultado positivo para HMPV.

En cuanto a las infecciones por el linaje A2c, los pacientes de pediatría parecían igual de afectados por los linajes A2c portadores de duplicaciones que por el A2c<sub>wt</sub> u otros subgenotipos o linajes. En cambio, en el paciente adulto sí que se encontró una asociación entre los linajes A2c portadores de duplicaciones y el desarrollo de infecciones del tracto respiratorio inferior. Aunque los adultos deberían tener una respuesta inmune eficiente (94) tienen 3,45 veces más probabilidades de manifestar una infección del tracto respiratorio inferior al infectarse con una variante portadora de duplicación que si esta variante no es portadora. Esto sugiere que, en el caso de la infección por estas nuevas variantes en el paciente adulto, aun con una previa exposición a otras variantes anteriores tal como ocurre con la mayoría de infecciones respiratorias virales, una de las infecciones más frecuentes a lo largo de la vida, la respuesta inmunitaria adquirida no era suficientemente efectiva para hacerle frente. Esto, junto a las otras evidencias de este trabajo, como son una mayor prevalencia o el impacto de estas duplicaciones en la estructura de la proteína G, respaldaría la hipótesis de Leyrat (37), donde el rol que juega la proteína G es la de enmascarar los epítomos de la proteína F, impidiendo el acceso a los anticuerpos neutralizantes, a la vez que respaldaría la hipótesis planteada en el primer trabajo de esta Tesis Doctoral, donde se proponía que las nuevas variantes portadoras de una duplicación habrían modificado esta función (108).

En cuanto a la relación de factores de gravedad como días de hospitalización, requerimiento de oxígeno y el tiempo de ingreso en planta o en la unidad de cuidados intensivos,

no se encontró ninguna asociación entre estas nuevas variantes y una mayor gravedad en la enfermedad en ninguna cohorte. Aun sin tener un valor estadísticamente significativo, se observó una tendencia general en los subgenotipos A2 y B2 a generar una mayor gravedad en el curso clínico, alargando la hospitalización o el requerimiento de oxígeno. El estudio de las características clínicas de los pacientes en asociación al grupo genético de HMPV había sido poco explorado hasta la publicación de este primer trabajo, algunos grupos coincidiendo en la mayor gravedad de A2 (158), y otros concluyendo que no había asociación entre una mayor gravedad y un grupo genético determinado (115,159).

Sin embargo, debemos tener en consideración una limitación importante a la hora de estudiar la gravedad o características de los pacientes en nuestro estudio, pues tan solo se incluyeron las muestras de pacientes atendidos en nuestro hospital, por lo que era de esperar observar una mayor gravedad de la que se esperaría en el caso de poder realizar este mismo estudio en la población general, donde el número de casos leves y asintomáticos podría ser mucho mayor, tal como se espera de cualquier otro virus respiratorio.

Además de la diversidad genética de los HMPV, es importante estudiar cómo el virus ha evolucionado a lo largo de los años, aspecto que quisimos abordar en el tercer trabajo de esta Tesis Doctoral. Para ello era necesario realizar secuenciación del genoma completo del HMPV, lo cual nos permitiría disponer de toda la información para obtener unos resultados de la máxima exactitud. Para intentar disponer de muestras anteriores al inicio de nuestro estudio, cuando se observaron las primeras variantes portadores de estas dos duplicaciones, hemos tenido la oportunidad de poder colaborar con el Hospital Universitario 12 de Octubre de Madrid, quienes aportaron muestras desde 2009 y hasta 2015.

Para poder realizar una secuenciación completa del genoma viral existían dos opciones, o bien una estrategia basada en amplicones o bien una aproximación metagenómica. Finalmente, ya que la aproximación metagenómica no era abordable con los recursos disponibles, no siendo coste-efectiva para la secuenciación de un gran número de muestras, finalmente se decidió por una secuenciación a partir de la amplificación de 4 amplicones solapantes de 4 kilobases cada uno, aproximadamente. Una de las limitaciones que presenta esta aproximación es poder disponer de las suficientes secuencias de referencia para el diseño de unos cebadores que puedan no limitar la amplificación de cualquiera de las variantes que durante este periodo hubieran estado en circulación. Dado que tan solo había 164 secuencias del genoma completo disponible en la base de datos GenBank, finalmente se escogieron los diseñados por Tulloch (160). La idea de amplificar todo el genoma en solo 4 amplicones, no solo reduce el trabajo, sino

que también limita el efecto de la deriva genética natural de este virus respiratorio a la complementariedad deseada de estos cebadores.

En este tipo de trabajo, el análisis bioinformático posterior a la secuenciación es clave para reconstruir el genoma preservando los posibles eventos genéticos que queremos detectar. Se probaron dos aproximaciones de ensamblado para optimizar el *script* de análisis para este virus, tanto portadores como no portadores de duplicaciones. La primera aproximación consistió en un ensamblado mediante el mapeo de los *reads* contra una secuencia de referencia. Tras la comparación de las secuencias consenso obtenidas con las obtenidas por Sanger, que nos había permitido la identificación de estas duplicaciones en la región correspondiente al ectodominio de la proteína G en estudios anteriores, se observó que no se encontraban las duplicaciones en la gran mayoría de casos, probablemente debido a que, al ser una región larga y los *reads* obtenidos, cortos, el programa forzaba el alineamiento de los *reads* que contenían la duplicación en la región original duplicada, perdiendo esta información. La segunda aproximación consistió en un ensamblado *de novo*, donde los *reads* se alinean entre ellos para acabar obteniendo una secuencia consenso sin compararla con una secuencia de referencia. Aunque esta aproximación no había sido la escogida en un primer momento debido a que era más compleja y requería de mayor tiempo de cómputo, resultó ser la más idónea para el análisis de las secuencias del genoma completo de HMPV. Así, esto también nos ha permitido explorar otras vías de análisis de secuencias de genomas completos como las que ya estamos obteniendo de otros virus respiratorios también con genoma ARN, y donde este tipo de inserciones o duplicaciones son también encontradas (161,162).

El estudio de presiones selectivas a través de cuatro algoritmos diferentes implementados en Datamonkey permitió el cálculo del dN/dS de todas las proteínas del virus, además de describir qué posiciones de cada proteína estaban bajo una presión selectiva negativa o positiva. Como era de esperar, las proteínas G y SH mostraron ser las más variables de todo el genoma, además de ser las que menos aminoácidos tenían bajo presión selectiva negativa, como se había observado previamente (85). Esto podría estar relacionado con que son proteínas de la envuelta, aunque no sean grandes determinantes antigénicos (163,164). Además, se observaron diferencias en los perfiles de selección positiva en estas dos proteínas al estudiar HMPV-A y HMPV-B por separado, indicando una selección específica en cada linaje. Además de lo observado para estas dos proteínas, también se detectó selección positiva en las proteínas L, M2-1 y P. Se desconoce la implicación que tienen los aminoácidos bajo presión selectiva positiva en estas tres proteínas, por lo que debería monitorizarse la posible fijación de mutaciones en

estas regiones de su genoma, cómo podrían afectar a su circulación o su gravedad, además de, por supuesto, realizar estudios fenotípicos adicionales para poder determinar y medir su efecto. Al contrario, las proteínas N, M y F fueron las más conservadas de todo el genoma. La proteína F, además de ser una proteína de la envuelta, es la única proteína que estimula una respuesta inmune neutralizante, y a pesar de la presión selectiva que podría ejercer la inmunidad poblacional, sorprende que tenga un grado de conservación tan elevado, sin posiciones aminoacídicas bajo selección positiva. Además, dos de las tres asparaginas localizadas en su ápex mostraron estar bajo selección negativa. Se ha sugerido que estas tres asparaginas juegan un papel en la evasión del sistema inmune mediante el enmascaramiento de sus propios epítomos a través de las N-glicosilaciones que tienen asociadas (54,55) hecho que explicaría la necesidad de conservación de estos aminoácidos. Por otra parte, la mayoría de aminoácidos pertenecientes a epítomos antigénicos reconocidos por anticuerpos neutralizantes, estaban bajo selección negativa, es decir, estaban muy conservados. Esto sugiere que el sistema inmune no ejerce una presión sobre esta proteína, y por lo tanto respalda la necesidad de enmascaramiento que le proporciona la proteína G para evitar el reconocimiento de los anticuerpos neutralizantes. Este alto grado de conservación hace de esta proteína una diana óptima para el desarrollo de vacunas, tal como se está haciendo actualmente (90–93), aunque el hecho de que podría estar enmascarada por la proteína G debería tenerse en cuenta en el diseño de estas vacunas.

En cuanto al análisis evolutivo llevado a cabo con Nextstrain (165), y respaldado con los resultados de BEAST, se observó que la divergencia de los genotipos HMPV-A y HMPV-B fue mucho más reciente de lo que se había calculado en estudios anteriores (164), aunque éstos contaban con un número más reducido de secuencias disponibles. Los dos únicos estudios de evolución de genoma completo de HMPV donde se calcula esta divergencia habían obtenido estimaciones muy diferentes. Mientras un estudio situaba el antecesor común de ambos genotipos el año 1622 (85), el otro estudio lo hacía en un rango de años de 1645 a 1858 (164), debido a la diferencia encontrada entre las diferentes proteínas. Esta diferencia entre las fechas estimadas en nuestro estudio en comparación a los anteriores podría estar relacionada con la inclusión de un mayor número de muestras estudiadas, pues en el momento del estudio tan solo había 164 secuencias de genoma completo disponibles en GenBank, y el trabajo realizado para esta Tesis Doctoral contribuye con 187 nuevas secuencias de entre 2009 y 2021. Por otra parte, sería importante poder disponer de un mayor número de secuencias HMPV ancestrales, incluso anteriores a su descubrimiento hace tan solo 20 años, pues los estudios seroepidemiológicos realizados ya han demostrado su circulación al menos desde 1958 (1). Realmente, realizar una vigilancia virológica de este virus respiratorio, al igual que lo hacemos con otros virus también

asociados a una importante morbilidad como son los virus de la gripe y HRSV, ha permitido detectar estas variantes portadoras de largas duplicaciones con un rol en el enmascaramiento de las características antigénicas, suponiendo un cambio en su epidemiología, sólo 3-4 años después de que emergieran según las estimaciones evolutivas, seguramente como resultado de dos eventos genéticos independientes, tal como propuso Saikusa (148) y tal como se había propuesto para HRSV también (149).

Aunque los subgenotipos y linajes de HMPV-A y HMPV-B tenían diferentes patrones de predominio, HMPV-A y HMPV-B están en una evolución constante, probablemente con el objetivo de evadir la respuesta inmune adquirida en temporadas anteriores, lo que les permite seguir circulando en población humana. Este dato pone en evidencia la necesidad de seguir manteniendo esta vigilancia virológica para monitorizar su evolución en los próximos años.

La vigilancia genómica es importante para monitorizar la evolución de HMPV, ya que permite detectar la emergencia de nuevas variantes y la asociación de estos hallazgos a características clínicas, hecho muy relevante para la salud pública. Nextstrain es una herramienta que ha demostrado su versatilidad y utilidad, especialmente durante la pandemia de SARS-CoV-2, permitiendo el estudio de miles de secuencias de una forma rápida (166). En este último trabajo de la Tesis Doctoral, Nextstrain ha permitido visualizar la evolución del HMPV en tiempo real y de manera interactiva, conocimiento que hemos hecho público a través de la página <https://nextstrain.org/groups/valldebronvirology/metapneumovirus/AB/timetree>. Este tipo de análisis se ha convertido en un modelo para trazar la evolución de otros patógenos respiratorios virales, como ya se hace actualmente para el enterovirus D68 (167). La creación del grupo /valldebronvirology bajo el dominio de Nextstrain permitirá compartir la vigilancia epidemiológica que hacemos actualmente con otros virus como el HRSV, los virus de la gripe, o los enterovirus, compartiendo una información siempre actualizada, el cual es uno de los objetivos principales de una vigilancia virológica. Esta información microbiológica, junto con la disponible en otras fuentes de información, tanto epidemiológica como clínica, deben permitir la vigilancia de la emergencia, impacto y evolución de nuevas variantes.

# Conclusiones





## 7 CONCLUSIONES

---

1. Esta Tesis Doctoral ha permitido disponer de valiosa información sobre la emergencia de nuevas variantes del HMPV, de su prevalencia, de su impacto y de su evolución.
2. La prevalencia del HMPV en general ha sido del 3% en el periodo de estudio que, aun siendo un porcentaje moderado en comparación a la de otros virus respiratorios, tiene relevancia debido a su fuerte asociación con la infección del tracto respiratorio inferior. El aumento de prevalencia observado en la temporada 2017-2018 ha sido asociado a la emergencia de nuevas variantes virales, mientras que el aumento de prevalencia observado en la temporada 2021-2022 ha sido asociado a una mayor población susceptible a una infección primaria.
3. La estacionalidad típica de los HMPV observada en nuestra área geográfica comienza al decaer la curva epidémica de los virus de la gripe en los meses de invierno, y termina durante los meses de primavera. La pandemia de SARS-CoV-2 interrumpió la epidemia de HMPV de la temporada 2019-2020, y retrasó la siguiente curva epidémica hasta el verano de 2021, que fue seguida por un segundo pico epidémico en otoño-invierno del mismo año.
4. Se ha descrito un porcentaje significativo de casos de HMPV en codetección con otros virus respiratorios, especialmente con rinovirus, adenovirus, bocavirus y enterovirus. Estos son algunos de los virus respiratorios más prevalentes en nuestro territorio, que coinciden en su circulación con las epidemias de HMPV, hechos que podrían explicar su alta codetección, entre otros motivos.
5. Se ha remarcado la importancia que tiene el HMPV en la infección respiratoria del paciente adulto, con una especial incidencia en los pacientes a partir de 55-60 años. La detección de HMPV en el paciente adulto presenta una prevalencia muy similar a la observada en el paciente pediátrico, y representa el 45% de los casos detectados.
6. El estudio filogenético de las secuencias parciales de la región codificante de la proteína G ha permitido describir una alta diversidad genética, donde los linajes emergentes han ido ganando prevalencia en detrimento de los que circulaban previamente.

7. Aun habiendo cocirculación de los dos genotipos de HMPV, A y B, hasta antes de la pandemia de SARS-CoV-2 existía un cambio en el predominio de uno sobre el otro que podría estar determinado por la inmunidad de la población.
8. Esta Tesis Doctoral ha permitido describir dos eventos de duplicación en el género de los metapneumovirus. Estas dos duplicaciones, de 180 y 111 nucleótidos, están situadas en el ectodominio de la proteína G de los virus pertenecientes al linaje A2c.
9. Las nuevas variantes virales han presentado un aumento de prevalencia progresivo, llevando finalmente al predominio de la variante A2c portadora de la duplicación de 111 nucleótidos, sugiriendo que aporta unas nuevas características antigénicas al virus favorecedoras para su continuidad. De hecho, el patrón observado en esta alternancia HMPV-A y B descrito en las temporadas antes del inicio de la pandemia, se vio alterada las dos últimas temporadas, con la expansión del genotipo HMPV-A, liderado por esta nueva variante.
10. Las proteínas G portadoras de una duplicación son tan desordenadas intrínsecamente como lo son las proteínas no portadoras, sin segmentos autoagregativos y con un patrón de glicosilación similar. La proteína G se mantiene en una conformación extendida que sobresale por encima de la proteína F, obstaculizando el paso de los anticuerpos neutralizantes con sus numerosas O-glicosilaciones. Esta función se vería potenciada por las duplicaciones emergentes, pues éstas aportarían una longitud extra a la proteína que provocaría que sobresaliera todavía más sobre la proteína F.
11. En este trabajo, el HMPV ha sido principalmente asociado a una infección del tracto respiratorio inferior, y por lo tanto a una mayor gravedad, aunque cabe destacar que esta observación podría estar sesgada debido a que este estudio se ha realizado en un contexto hospitalario. Estos resultados podrían ser diferentes en el caso de incluir casos detectados en la comunidad.
12. No encontró asociación entre la gravedad del curso clínico y los subgenotipos y linajes de HMPV no portadores de duplicaciones.
13. Las nuevas variantes portadoras de duplicaciones, A2c<sub>180dup</sub> y A2c<sub>111dup</sub>, fueron asociadas a una mayor probabilidad de desarrollar una infección del tracto respiratorio inferior en el paciente adulto, sugiriendo que la respuesta inmune adquirida por estos pacientes en infecciones pasadas no era tan eficiente frente estas variantes.

14. El aumento de la prevalencia de las variantes virales portadoras de duplicaciones a lo largo del periodo estudiado, la asociación de éstas a la infección del tracto respiratorio inferior en adultos y la predicción de una mayor cobertura de la proteína F por parte de estas variantes sugiere que las duplicaciones podrían estar aportando una ventaja evolutiva mediante un enmascaramiento estérico mejorado en comparación a las variantes no portadoras, contribuyendo a la evasión del sistema inmune durante la infección.
15. Se ha demostrado la importancia de la optimización y validación del análisis bioinformático de las secuencias genómicas del HMPV, y de todos los virus respiratorios con un genoma de ARN, en los que es muy probable se pueden dar eventos genéticos de inserción o delección. Un ensamblado mediante mapeo contra una secuencia de referencia puede inducir errores en caso de largas duplicaciones, por lo que debería realizarse este análisis también mediante aproximaciones *de novo*.
16. Esta Tesis Doctoral ha contribuido enormemente con nuevas secuencias y evidencias a un mejor conocimiento de la evolución del HMPV, hasta ahora bastante limitado por el escaso número de estudios realizados.
17. La vigilancia genómica es importante para la monitorización de la evolución de HMPV, la detección de variantes emergentes y la asociación de mutaciones o grupos genéticos a factores poblacionales o clínicos, como son la edad, el sexo o la gravedad de la sintomatología del paciente.



# Bibliografía



## 8 BIBLIOGRAFÍA

---

1. van den Hoogen BG, de Jong JC, Groen J, Kuiken T, De Groot R, Fouchier RAM, et al. A newly discovered human pneumovirus isolated from young children with respiratory tract disease. *Nat Med*. 2001;7(6):719–24.
2. Shafagati N, Williams J. Human metapneumovirus - what we know now. *F1000Research*. 2018 Feb 1;7.
3. Kuhn JH, Dietzgen RG, Easton AJ, Kurath G, Nowotny N, Rima BK, et al. Elevation of the paramyxoviral subfamily Pneumovirinae to family status as family Pneumoviridae in the order Mononegavirales; and renaming of one pneumoviral genus. *ICTV*. 2015;1–14.
4. Schildgen V, van den Hoogen B, Fouchier R, Tripp RA, Alvarez R, Manoha C, et al. Human metapneumovirus: Lessons learned over the first decade. *Clin Microbiol Rev*. 2011;24(4):734–54.
5. Van Den Hoogen BG, Bestebroer TM, Osterhaus ADME, Fouchier RAM. Analysis of the genomic sequence of a human metapneumovirus. *Virology*. 2002;295(1):119–32.
6. Ruigrok RWH, Crépin T, Kolakofsky D. Nucleoproteins and nucleocapsids of negative-strand RNA viruses. *Curr Opin Microbiol*. 2011;14(4):504–10.
7. Renner M, Bertinelli M, Leyrat C, Paesen GC, Saraiva de Oliveira LF, Huiskonen JT, et al. Nucleocapsid assembly in pneumoviruses is regulated by conformational switching of the N protein. *Elife*. 2016 Feb 15;5(FEBRUARY2016):1–12.
8. Renner M, Paesen GC, Grison CM, Granier S, Grimes JM, Leyrat C. Structural dissection of human metapneumovirus phosphoprotein using small angle x-ray scattering. *Sci Rep*. 2017;7(1):1–16.
9. Pan J, Qian X, Lattmann S, El Sahili A, Yeo TH, Jia H, et al. Structure of the human metapneumovirus polymerase phosphoprotein complex. *Nature*. 2020 Jan 9;577(7789):275–9.
10. Leyrat C, Renner M, Harlos K, Grimes JM. Solution and crystallographic structures of the central region of the phosphoprotein from human metapneumovirus. *PLoS One*.



- 2013;8(11):1–16.
11. Buchholz UJ, Biacchesi S, Pham QN, Tran KC, Yang L, Luongo CL, et al. Deletion of M2 Gene Open Reading Frames 1 and 2 of Human Metapneumovirus: Effects on RNA Synthesis, Attenuation, and Immunogenicity. *J Virol*. 2005;79(11):6588–97.
  12. Biacchesi S, Pham QN, Skiadopoulou MH, Murphy BR, Collins PL, Buchholz UJ. Infection of Nonhuman Primates with Recombinant Human Metapneumovirus Lacking the SH, G, or M2-2 Protein Categorizes Each as a Nonessential Accessory Protein and Identifies Vaccine Candidates. *J Virol*. 2005;79(19):12608–13.
  13. Esperante SA, Alvarez-Paggi D, Salgueiro M, De Prat Gay G. Mechanism of Tetramer Dissociation, Unfolding, and Oligomer Assembly of Pneumovirus M2-1 Transcription Antiterminators. *ACS Omega*. 2018;3(11):14732–45.
  14. Leyrat C, Renner M, Harlos K, Huiskonen JT, Grimes JM. Drastic changes in conformational dynamics of the antiterminator M2-1 regulate transcription efficiency in pneumovirinae. *Elife*. 2014;2014(3):1–23.
  15. Ren J, Wang Q, Kolli D, Prusak DJ, Tseng C-TK, Chen ZJ, et al. Human Metapneumovirus M2-2 Protein Inhibits Innate Cellular Signaling by Targeting MAVS. *J Virol*. 2012;86(23):13049–61.
  16. Ren J, Liu G, Go J, Kolli D, Zhang G, Bao X. Human metapneumovirus M2-2 protein inhibits innate immune response in monocyte-derived dendritic cells. *PLoS One*. 2014;9(3):1–9.
  17. Kitagawa Y, Sakai M, Funayama M, Itoh M, Gotoh B. Human Metapneumovirus M2-2 Protein Acts as a Negative Regulator of Alpha Interferon Production by Plasmacytoid Dendritic Cells. García-Sastre A, editor. *J Virol*. 2017 Oct 15;91(20):1–15.
  18. Kolli D, Bao X, Casola A. Human metapneumovirus antagonism of innate immune responses. *Viruses*. 2012;4(12):3551–71.
  19. Liang B. Structures of the Mononegavirales Polymerases. *J Virol*. 2020;94(22):1–20.
  20. Fearn R, Plemper RK. Polymerases of paramyxoviruses and pneumoviruses. *Virus Res*. 2017 Apr;234:87–102.
  21. Slovic A, Kosutic-Gulija T, Santak M, Ivancic-Jelecki J, Jagusic M, Ljubin-Sternak S, et al.

- Genetic Variability and Sequence Relatedness of Matrix Protein in Viruses of the Families Paramyxoviridae and Pneumoviridae. *Intervirology*. 2018;60(5):181–9.
22. Leyrat C, Renner M, Harlos K, Huiskonen JT, Grimes JM. Structure and Self-Assembly of the Calcium Binding Matrix Protein of Human Metapneumovirus. *Structure*. 2014 Jan;22(1):136–48.
  23. Biacchesi S, Skiadopoulou MH, Yang L, Lamirande EW, Tran KC, Murphy BR, et al. Recombinant human Metapneumovirus lacking the small hydrophobic SH and/or attachment G glycoprotein: deletion of G yields a promising vaccine candidate. *J Virol*. 2004;78(23):12877–87.
  24. Masante C, El Najjar F, Chang A, Jones A, Moncman CL, Dutch RE. The Human Metapneumovirus Small Hydrophobic Protein Has Properties Consistent with Those of a Viroporin and Can Modulate Viral Fusogenic Activity. *J Virol*. 2014;88(11):6423–33.
  25. Bao X, Kolli D, Esham D, Velayutham T, Casola A. Human Metapneumovirus Small Hydrophobic Protein Inhibits Interferon Induction in Plasmacytoid Dendritic Cells. *Viruses*. 2018 May 23;10(6):278.
  26. Hastings AK, Amato KR, Wen SC, Peterson LS, Williams J V. Human metapneumovirus small hydrophobic (SH) protein downregulates type I IFN pathway signaling by affecting STAT1 expression and phosphorylation. *Virology*. 2016 Jul;494(412):248–56.
  27. Bao X, Kolli D, Liu T, Shan Y, Garofalo RP, Casola A. Human Metapneumovirus Small Hydrophobic Protein Inhibits NF- $\kappa$ B Transcriptional Activity. *J Virol*. 2008 Aug 15;82(16):8224–9.
  28. Le Nouen C, Hillyer P, Brock LG, Winter CC, Rabin RL, Collins PL, et al. Human Metapneumovirus SH and G Glycoproteins Inhibit Macropinocytosis-Mediated Entry into Human Dendritic Cells and Reduce CD4+ T Cell Activation. *J Virol*. 2014;88(11):6453–69.
  29. Le VB, Dubois J, Couture C, Cavanagh MH, Uyar O, Pizzorno A, et al. Human metapneumovirus activates NOD-like receptor protein 3 inflammasome via its small hydrophobic protein which plays a detrimental role during infection in mice. *PLoS Pathog*. 2019;15(4):1–24.
  30. Ishiguro N, Ebihara T, Endo R, Ma X, Kikuta H, Ishiko H, et al. High Genetic Diversity of the

- Attachment (G) Protein of Human Metapneumovirus. *J Clin Microbiol.* 2004;42(8):3406–14.
31. Cox RG, Williams J V. Breaking in: Human metapneumovirus fusion and entry. *Viruses.* 2013;5(1):192–210.
  32. Chang A, Masante C, Buchholz UJ, Dutch RE. Human Metapneumovirus (HMPV) Binding and Infection Are Mediated by Interactions between the HMPV Fusion Protein and Heparan Sulfate. *J Virol.* 2012;86(6):3230–43.
  33. Bao X, Liu T, Shan Y, Li K, Garofalo RP, Casola A. Human Metapneumovirus Glycoprotein G Inhibits Innate Immune Responses. Baric RS, editor. *PLoS Pathog.* 2008 May 30;4(5):e1000077.
  34. Cheemarla N, Guerrero-Plata A. Human Metapneumovirus Attachment Protein Contributes to Neutrophil Recruitment into the Airways of Infected Mice. *Viruses.* 2017 Oct 22;9(10):310.
  35. Huang J, Chopra P, Liu L, Nagy T, Murray J, Tripp RA, et al. Structure, Immunogenicity, and Conformation-Dependent Receptor Binding of the Postfusion Human Metapneumovirus F Protein. Schultz-Cherry S, editor. *J Virol.* 2021 Aug 25;95(18):1–16.
  36. Liu L, Bastien N, Li Y. Intracellular Processing, Glycosylation, and Cell Surface Expression of Human Metapneumovirus Attachment Glycoprotein. *J Virol.* 2007;81(24):13435–43.
  37. Leyrat C, Paesen G, Charleston J, Renner M, Grimes J. Structural insights into the human metapneumovirus glycoprotein ectodomain. *J Virol.* 2014;88(19):11611–6.
  38. Loo LH, Jumat MR, Fu Y, Aji TC, Wong PS, Tee NWSS, et al. Evidence for the interaction of the human metapneumovirus G and F proteins during virus-like particle formation. *Virol J.* 2013;10:1–13.
  39. Padhi A, Verghese B. Positive natural selection in the evolution of human metapneumovirus attachment glycoprotein. *Virus Res.* 2008;131(2):121–31.
  40. Skiadopoulos MH, Biacchesi S, Buchholz UJ, Amaro-Carambot E, Surman SR, Collins PL, et al. Individual contributions of the human metapneumovirus F, G, and SH surface glycoproteins to the induction of neutralizing antibodies and protective immunity. *Virology.* 2006;345(2):492–501.

41. Papenburg J, Carbonneau J, Isabel S, Bergeron MG, Williams J V, De Serres G, et al. Genetic diversity and molecular evolution of the major human metapneumovirus surface glycoproteins over a decade. *J Clin Virol.* 2013;58(3):541–7.
42. Smith EC, Popa A, Chang A, Masante C, Dutch RE. Viral entry mechanisms: The increasing diversity of paramyxovirus entry. *FEBS J.* 2009;276(24):7217–27.
43. Feuillet F, Lina B, Rosa-Calatrava M, Boivin G. Ten years of human metapneumovirus research. *J Clin Virol.* 2012 Feb;53(2):97–105.
44. Klimyte EM. Elucidating binding, fusion and entry of human metapneumovirus. University of Kentucky; 2016.
45. Battles MB, Más V, Olmedillas E, Cano O, Vázquez M, Rodríguez L, et al. Structure and immunogenicity of pre-fusion-stabilized human metapneumovirus F glycoprotein. *Nat Commun.* 2017 Dec 16;8(1):1528.
46. Olmedillas Cela E. Caracterización antigénica de metapneumovirus humano y de proteína homóloga del virus respiratorio sincitial humano. Universidad Autónoma de Madrid; 2017.
47. Chang A, Dutch RE. Paramyxovirus fusion and entry: Multiple Paths to a common end. *Viruses.* 2012;4(4):613–36.
48. Schowalter RM, Smith SE, Dutch RE. Characterization of Human Metapneumovirus F Protein-Promoted Membrane Fusion: Critical Roles for Proteolytic Processing and Low pH. *J Virol.* 2006;80(22):10931–41.
49. Herfst S, Mas V, Ver LS, Wierda RJ, Osterhaus ADME, Fouchier RAM, et al. Low-pH-Induced Membrane Fusion Mediated by Human Metapneumovirus F Protein Is a Rare, Strain-Dependent Phenomenon. *J Virol.* 2008 Sep;82(17):8891–5.
50. Mas V, Herfst S, Osterhaus ADME, Fouchier RAM, Melero JA. Residues of the Human Metapneumovirus Fusion (F) Protein Critical for Its Strain-Related Fusion Phenotype: Implications for the Virus Replication Cycle. *J Virol.* 2011;85(23):12650–61.
51. Kinder JT, Klimyte EM, Chang A, Williams J V., Dutch RE. Human metapneumovirus fusion protein triggering: Increasing complexities by analysis of new HMPV fusion proteins. *Virology.* 2019 May;531(1):248–54.

52. Cox RG, Mainou BA, Johnson M, Hastings AK, Schuster JE, Dermody TS, et al. Human Metapneumovirus Is Capable of Entering Cells by Fusion with Endosomal Membranes. *PLoS Pathog.* 2015;11(12).
53. Yang H, He H, Tan B, Liu E, Zhao X, Zhao Y. Human metapneumovirus uses endocytosis pathway for host cell entry. *Mol Cell Probes.* 2016 Aug;30(4):231–7.
54. Huang J, Diaz D, Mousa JJ. Antibody Epitopes of Pneumovirus Fusion Proteins. *Front Immunol.* 2019;10(November).
55. Xiao X, Tang A, Cox KS, Wen Z, Callahan C, Sullivan NL, et al. Characterization of potent RSV neutralizing antibodies isolated from human memory B cells and identification of diverse RSV/hMPV cross-neutralizing epitopes. *MAbs.* 2019 Nov 17;11(8):1415–27.
56. Ulbrandt ND, Ji H, Patel NK, Barnes AS, Wilson S, Kiener PA, et al. Identification of antibody neutralization epitopes on the fusion protein of human metapneumovirus. *J Gen Virol.* 2008;89(12):3113–8.
57. Melero JA, Mas V. The Pneumovirinae fusion (F) protein: A common target for vaccines and antivirals. *Virus Res.* 2015 Nov;209:128–35.
58. Olmedillas E, Cano O, Martínez I, Luque D, Terrón MC, McLellan JS, et al. Chimeric Pneumoviridae fusion proteins as immunogens to induce cross-neutralizing antibody responses. *EMBO Mol Med.* 2018;10(2):175–87.
59. Mousa JJ, Binshtein E, Human S, Fong RH, Alvarado G, Doranz BJ, et al. Human antibody recognition of antigenic site IV on Pneumovirus fusion proteins. *PLoS Pathog.* 2018;14(2):1–19.
60. Wen X, Krause JC, Leser GP, Cox RG, Lamb RA, Williams J V, et al. Structure of the human metapneumovirus fusion protein with neutralizing antibody identifies a pneumovirus antigenic site. *Nat Struct Mol Biol.* 2012 Apr 4;19(4):461–3.
61. Huang J, Diaz D, Mousa JJ. Antibody recognition of the Pneumovirus fusion protein trimer interface. Bukreyev A, editor. *PLOS Pathog.* 2020 Oct 9;16(10):e1008942.
62. Wen X, Pickens J, Mousa JJ, Leser GP, Lamb RA, Crowe JE, et al. A Chimeric Pneumovirus Fusion Protein Carrying Neutralizing Epitopes of Both MPV and RSV. *PLoS One.* 2016;11(5):1–17.

63. Anderson EJ, Carosone-Link P, Yogev R, Yi J, Simões EAF. Effectiveness of Palivizumab in High-risk Infants and Children: A Propensity Score Weighted Regression Analysis. *Pediatr Infect Dis J.* 2017;36(8):699–704.
64. Biacchesi S, Skiadopoulos MH, Boivin G, Hanson CT, Murphy BR, Collins PL, et al. Genetic diversity between human metapneumovirus subgroups. *Virology.* 2003;315(1):1–9.
65. Vinci A, Lee PJ, Krilov LR. Human metapneumovirus infection. *Pediatr Rev.* 2018;39(12):623–4.
66. Hermos CR, Vargas SO, McAdam AJ. Human metapneumovirus. *Clin Lab Med.* 2010;30(1):131–48.
67. Hodinka RL. Respiratory RNA Viruses. Hayden RT, Wolk DM, Carroll KC, Tang Y-W, editors. *Microbiol Spectr.* 2016 Aug 12;4(4).
68. Soto JA, Gálvez NMS, Benavente FM, Pizarro-Ortega MS, Lay MK, Riedel C, et al. Human metapneumovirus: mechanisms and molecular targets used by the virus to avoid the immune system. *Front Immunol.* 2018;9(OCT):1–11.
69. Ballegeer M, Saelens X. Cell-Mediated Responses to Human Metapneumovirus Infection. *Viruses.* 2020 May 14;12(5):542.
70. Huck B, Scharf G, Neumann-Haefelin D, Puppe W, Weigl J, Falcone V. Novel human metapneumovirus sublineage. *Emerg Infect Dis.* 2006;12(1):147–50.
71. Carr MJ, Waters A, Fenwick F, Toms GL, Hall WW, O’Kelly E. Molecular epidemiology of human metapneumovirus in Ireland. *J Med Virol.* 2008;80:510–6.
72. Regev L, Meningher T, Hindiyeh M, Mendelson E, Mandelboim M. Increase human metapneumovirus mediated morbidity following pandemic influenza infection. *PLoS One.* 2012;7(4):2–7.
73. Chow WZ, Chan YF, Oong XY, Ng LJ, Nor’E SS, Ng KT, et al. Genetic diversity, seasonality and transmission network of human metapneumovirus: identification of a unique sub-lineage of the fusion and attachment genes. *Sci Rep.* 2016;6(January):1–10.
74. Cattoir L, Vankeerberghen A, Boel A, Van Vaerenbergh K, De Beenhouwer H. Epidemiology of RSV and hMPV in Belgium: a 10-year follow-up. *Acta Clin Belg.* 2019 Jul

- 4;74(4):229–35.
75. Haynes AK, Fowlkes AL, Schneider E, Mutuc JD, Armstrong GL, Gerber SI. Human metapneumovirus circulation in the United States, 2008 to 2014. *Pediatrics*. 2016;137(5).
  76. Sloots TP, Mackay IM, Bialasiewicz S, Jacob KC, McQueen E, Harnett GB, et al. Human Metapneumovirus, Australia, 2001–2004. *Emerg Infect Dis*. 2006 Aug;12(8):1263–6.
  77. Thongpan I, Suntronwong N, Vichaiwattana P, Wanlapakorn N, Vongpunsawad S, Poovorawan Y. Respiratory syncytial virus, human metapneumovirus, and influenza virus infection in Bangkok, 2016–2017. *PeerJ*. 2019;2019(4):2016–7.
  78. Reiche J, Jacobsen S, Neubauer K, Hafemann S, Nitsche A, Milde J, et al. Human metapneumovirus: Insights from a ten-year molecular and epidemiological analysis in Germany. *PLoS One*. 2014;9(2).
  79. Tsukagoshi H, Nakamura M, Hirano E, Ishiguro F, Mizuta K, Noda M, et al. Molecular epidemiology of human metapneumovirus from 2005 to 2011 in Fukui, Japan. *Jpn J Infect Dis*. 2013;66(1):56–9.
  80. Devasiri V, Kurukulasooriya R, Hsiang J, Nicholson B, Shapiro D, Reller ME, et al. Burden and Seasonality of Viral Acute Respiratory Tract Infections among Outpatients in Southern Sri Lanka. *Am J Trop Med Hyg*. 2017 Jul 12;97(1):88–96.
  81. García-García ML, Calvo C, Rey C, Díaz B, Molinero MDM, Pozo F, et al. Human metapneumovirus infections in hospitalized children and comparison with other respiratory viruses. 2005–2014 prospective study. *PLoS One*. 2017;12(3):1–12.
  82. Moriyama M, Hugentobler WJ, Iwasaki A. Seasonality of Respiratory Viral Infections. *Annu Rev Virol*. 2020 Sep 29;7(1):83–101.
  83. Li Y, Reeves RM, Wang X, Bassat Q, Brooks WA, Cohen C, et al. Global patterns in monthly activity of influenza virus, respiratory syncytial virus, parainfluenza virus, and metapneumovirus: a systematic analysis. *Lancet Glob Heal*. 2019;7(8):e1031–45.
  84. Lam TTY, Zhu H, Guan Y, Holmes EC. Genomic Analysis of the Emergence, Evolution, and Spread of Human Respiratory RNA Viruses. *Annu Rev Genomics Hum Genet*. 2016;17:193–218.

85. Kim J Il, Park S, Lee I, Park KS, Kwak EJ, Moon KM, et al. Genome-Wide Analysis of Human Metapneumovirus Evolution. Tee KK, editor. PLoS One. 2016 Apr 5;11(4):e0152962.
86. Panda S, Mohakud NK, Pena L, Kumar S. Human metapneumovirus: Review of an important respiratory pathogen. *Int J Infect Dis*. 2014;25:45–52.
87. Charlton CL, Babady E, Ginocchio CC, Hatchette TF, Jerris RC, Li Y, et al. Practical Guidance for Clinical Microbiology Laboratories: Viruses Causing Acute Respiratory Tract Infections. *Clin Microbiol Rev*. 2018 Dec 19;32(1).
88. Folgueira L, Moral N, Pascual C, Delgado R. Comparison of the Panther Fusion and Allplex assays for the detection of respiratory viruses in clinical samples. *PLoS One*. 2019;14(12):1–12.
89. Chanock RM, Jensen K, Parrott RH. Respiratory Syncytial Virus Disease in Infants. *Am J Epidemiol*. 1969;89(4):422–34.
90. Ren J, Phan T, Bao X. Recent vaccine development for human metapneumovirus. *J Gen Virol*. 2015;96(7):1515–20.
91. Lévy C, Aerts L, Hamelin MÈ, Granier C, Szécsi J, Lavillette D, et al. Virus-like particle vaccine induces cross-protection against human metapneumovirus infections in mice. *Vaccine*. 2013;31(25):2778–85.
92. Herfst S, Schrauwen EJA, de Graaf M, van Amerongen G, van den Hoogen BG, de Swart RL, et al. Immunogenicity and efficacy of two candidate human metapneumovirus vaccines in cynomolgus macaques. *Vaccine*. 2008;26(33):4224–30.
93. Cox RG, Erickson JJ, Hastings AK, Becker JC, Johnson M, Craven RE, et al. Human Metapneumovirus Virus-Like Particles Induce Protective B and T Cell Responses in a Mouse Model. *J Virol*. 2014;88(11):6368–79.
94. Kumar P, Srivastava M. Prophylactic and therapeutic approaches for human metapneumovirus. *VirusDisease*. 2018 Dec 20;29(4):434–44.
95. Haas LEM, Thijsen SFT, van Elden L, Heemstra KA. Human metapneumovirus in adults. *Viruses*. 2013;5(1):87–110.
96. Williams J V., Chen Z, Cseke G, Wright DW, Keefer CJ, Tollefson SJ, et al. A Recombinant



- Human Monoclonal Antibody to Human Metapneumovirus Fusion Protein That Neutralizes Virus In Vitro and Is Effective Therapeutically In Vivo. *J Virol.* 2007;81(15):8315–24.
97. Corti D, Bianchi S, Vanzetta F, Minola A, Perez L, Agatic G, et al. Cross-neutralization of four paramyxoviruses by a human monoclonal antibody. *Nature.* 2013;(7467):439–43.
98. Schuster JE, Cox RG, Hastings AK, Boyd KL, Wadia J, Chen Z, et al. A broadly neutralizing human monoclonal antibody exhibits in vivo efficacy against both human metapneumovirus and respiratory syncytial virus. *J Infect Dis.* 2015;211(2):216–25.
99. Más V, Rodríguez L, Olmedillas E, Cano O, Palomo C, Terrón MC, et al. Engineering, Structure and Immunogenicity of the Human Metapneumovirus F Protein in the Postfusion Conformation. Plemper RK, editor. *PLOS Pathog.* 2016 Sep 9;12(9):e1005859.
100. Wen X, Mousa JJ, Bates JT, Lamb RA, Crowe JE, Jardetzky TS. Structural basis for antibody cross-neutralization of respiratory syncytial virus and human metapneumovirus. *Nat Microbiol.* 2017 Apr 30;2(4):16272.
101. Bar-Peled Y, Diaz D, Pena-Briseno A, Murray J, Huang J, Tripp RA, et al. A Potent Neutralizing Site III-Specific Human Antibody Neutralizes Human Metapneumovirus In Vivo. Dutch RE, editor. *J Virol.* 2019 Oct;93(19):1–15.
102. Deffrasnes C, Hamelin MÈ, Prince GA, Boivin G. Identification and evaluation of a highly effective fusion inhibitor for human metapneumovirus. *Antimicrob Agents Chemother.* 2008;52(1):279–87.
103. Miller SA, Tollefson S, Crowe JE, Williams J V., Wright DW. Examination of a Fusogenic Hexameric Core from Human Metapneumovirus and Identification of a Potent Synthetic Peptide Inhibitor from the Heptad Repeat 1 Region. *J Virol.* 2007;81(1):141–9.
104. Deffrasnes C, Cavanagh M-H, Goyette N, Cui K, Ge Q, Seth S, et al. Inhibition of human metapneumovirus replication by small interfering RNA. *Antivir Ther.* 2008;13(6):821–32.
105. Preston FM, Straub CP, Ramirez R, Mahalingam S, Spann KM. siRNA against the G gene of human metapneumovirus. *Viol J.* 2012 Dec 10;9(1):105.
106. Wyde PR, Moylett EH, Chetty SN, Jewell A, Bowlin TL, Piedra PA. Comparison of the inhibition of human metapneumovirus and respiratory syncytial virus by NMSO3 in tissue

- culture assays. *Antiviral Res.* 2004;63(1):51–9.
107. Spetch L, Bowlin TL, Casola A. Effect of NMSO3 treatment in a murine model of human metapneumovirus infection. *J Gen Virol.* 2008;89(11):2709–12.
  108. Piñana M, Vila J, Gimferrer L, Valls M, Andrés C, Codina MG, et al. Novel human metapneumovirus with a 180-nucleotide duplication in the G gene. *Future Microbiol.* 2017 Jun;12(7):565–71.
  109. Piñana M, Vila J, Maldonado C, Galano-Frutos JJ, Valls M, Sancho J, et al. Insights into immune evasion of human metapneumovirus: novel 180- and 111-nucleotide duplications within viral G gene throughout 2014-2017 seasons in Barcelona, Spain. *J Clin Virol.* 2020 Nov;132(August):104590.
  110. Kodama F, Nace DA, Jump RLP. Respiratory Syncytial Virus and Other Noninfluenza Respiratory Viruses in Older Adults. *Infect Dis Clin North Am.* 2017;31(4):767–90.
  111. Principi N, Esposito S. Paediatric human metapneumovirus infection: Epidemiology, prevention and therapy. *J Clin Virol.* 2014 Mar;59(3):141–7.
  112. Manoha C, Espinosa S, Aho SL, Huet F, Pothier P. Epidemiological and clinical features of hMPV, RSV and RVs infections in young children. *J Clin Virol.* 2007;38(3):221–6.
  113. García-García ML, Calvo C, Martín F, Pérez-Breña P, Acosta B, Casas I. Human metapneumovirus infections in hospitalised infants in Spain. *Arch Dis Child.* 2006;91(4):290–5.
  114. Taylor S, Lopez P, Weckx L, Borja-Tabora C, Ulloa-Gutierrez R, Lazcano-Ponce E, et al. Respiratory viruses and influenza-like illness: Epidemiology and outcomes in children aged 6 months to 10 years in a multi-country population sample. *J Infect.* 2017 Jan;74(1):29–41.
  115. Park JY, Yun KW, Lim JW, Lee MK, Lim IS, Choi ES. Clinical and genetic features of human metapneumovirus infections in children. *Pediatr Int.* 2015;(January 2011):22–6.
  116. García-García ML, Calvo C, Rey C, Díaz B, Molinero MDM, Pozo F, et al. Human metapneumovirus infections in hospitalized children and comparison with other respiratory viruses. 2005-2014 prospective study. *PLoS One.* 2017;12(3):e0173504.

117. Jagusic M, Slovic A, Ivancic-Jelecki J, Ljubin-Sternak S, Vilibić-Čavlek T, Tabain I, et al. Molecular epidemiology of human respiratory syncytial virus and human metapneumovirus in hospitalized children with acute respiratory infections in Croatia, 2014–2017. *Infect Genet Evol.* 2019;76(September).
118. Zhang L, Liu W, Liu D, Chen D, Tan W, Qiu S, et al. Epidemiological and clinical features of human metapneumovirus in hospitalised paediatric patients with acute respiratory illness: a cross-sectional study in Southern China, from 2013 to 2016. *BMJ Open.* 2018;8:6–12.
119. Camps M, Ricart S, Dimova V, Rovira N, Muñoz-Almagro C, Garcia JJ, et al. Prevalence of human metapneumovirus among hospitalized children younger than 1 year in Catalonia, Spain. *J Med Virol.* 2008;80:1452–60.
120. Gorbalenya AE, Baker SC, Baric RS, de Groot RJ, Drosten C, Gulyaeva AA, et al. The species Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus: classifying 2019-nCoV and naming it SARS-CoV-2. *Nat Microbiol.* 2020;5(4):536–44.
121. Nawrocki J, Olin K, Holdrege MC, Hartsell J, Meyers L, Cox C, et al. The Effects of Social Distancing Policies on Non-SARS-CoV-2 Respiratory Pathogens. *Open Forum Infect Dis.* 2021;8(7):1–7.
122. Agca H, Akalin H, Saglik I, Hacimustafaoglu M, Celebi S, Ener B. Changing epidemiology of influenza and other respiratory viruses in the first year of COVID-19 pandemic. *J Infect Public Health.* 2021 Sep;14(9):1186–90.
123. De Francesco MA, Pollara C, Gargiulo F, Giacomelli M, Caruso A. Circulation of respiratory viruses in hospitalized adults before and during the COVID-19 pandemic in Brescia, Italy: A retrospective study. *Int J Environ Res Public Health.* 2021;18(18).
124. Takashita E, Kawakami C, Momoki T, Saikusa M, Shimizu K, Ozawa H, et al. Increased risk of rhinovirus infection in children during the coronavirus disease-19 pandemic. *Influenza Other Respi Viruses.* 2021;15(4):488–94.
125. Liu P, Xu M, Cao L, Su L, Lu L, Dong N, et al. Impact of COVID-19 pandemic on the prevalence of respiratory viruses in children with lower respiratory tract infections in China. *Virol J.* 2021 Dec 3;18(1):159.

126. Diesner-Treiber SC, Voitl P, Voitl JJM, Langer K, Kuzio U, Riepl A, et al. Respiratory Infections in Children During a Covid-19 Pandemic Winter. *Front Pediatr*. 2021 Oct 18;9(October):1–9.
127. Andrés C, Piñana M, Borrás-Bermejo B, González-Sánchez A, García-Cehic D, Esperalba J, et al. A year living with SARS-CoV-2: an epidemiological overview of viral lineage circulation by whole-genome sequencing in Barcelona city (Catalonia, Spain). *Emerg Microbes Infect*. 2021 Nov 29;1–30.
128. Zheng Z, Pitzer VE, Shapiro ED, Bont LJ, Weinberger DM. Estimation of the Timing and Intensity of Reemergence of Respiratory Syncytial Virus Following the COVID-19 Pandemic in the US. *JAMA Netw Open*. 2021;4(12):e2141779.
129. Pinky L, Dobrovolyň HM. Coinfections of the respiratory tract: Viral competition for resources. *PLoS One*. 2016;11(5):1–19.
130. Lim FJ, De Klerk N, Blyth CC, Fathima P, Moore HC. Systematic review and meta-analysis of respiratory viral coinfections in children. *Respirology*. 2016;21(4):648–55.
131. Antón A, Marcos M, Torner N, Isanta R, Camps M, Martínez A, et al. Virological surveillance of influenza and other respiratory viruses during six consecutive seasons from 2006 to 2012 in Catalonia, Spain. *Clin Microbiol Infect*. 2016;22(6):1–9.
132. Andrés C, Peremiquel-Trillas P, Gimferrer L, Isern A, Piñana M, Rodrigo-Pendás JÁ, et al. Genetic diversity of rhinoviruses detected at a tertiary hospital in Catalonia (Spain) during the 2014-2017 seasons. *Future Microbiol*. 2018;13(14).
133. Andrés C, Vila J, Gimferrer L, Piñana M, Esperalba J, Codina MG, et al. Surveillance of enteroviruses from paediatric patients attended at a tertiary hospital in Catalonia from 2014 to 2017. *J Clin Virol*. 2019 Jan;110:29–35.
134. Peltola V, Söderlund-Venermo M, Jartti T. Human Bocavirus Infections. *Pediatr Infect Dis J*. 2013;32(2):178–9.
135. Martin ET, Fairchok MP, Kuypers J, Magaret A, Zerr DM, Wald A, et al. Frequent and prolonged shedding of bocavirus in young children attending daycare. *J Infect Dis*. 2010;201(11):1625–32.
136. Benschop KS, Albert J, Anton A, Andrés C, Aranzamendi M, Armannsdóttir B, et al. Re-

- emergence of enterovirus D68 in Europe after easing the COVID-19 lockdown, September 2021. *Eurosurveillance*. 2021 Nov 11;26(45).
137. Regis E, Fontanella S, Lin L, Howard R, Haider S, Curtin JA, et al. Sex differences in innate anti-viral immune responses to respiratory viruses and in their clinical outcomes in a birth cohort study. *Sci Rep*. 2021;11(1):1–15.
  138. Ursin RL, Klein SL. Sex Differences in Respiratory Viral Pathogenesis and Treatments. *Annu Rev Virol*. 2021;8:393–414.
  139. Neemuchwala A, Duvvuri VR, Marchand-Austin A, Li A, Gubbay JB. Human metapneumovirus prevalence and molecular epidemiology in respiratory outbreaks in Ontario, Canada. *J Med Virol*. 2015;87:269–74.
  140. Jagušić M, Slović A, Ljubin-Sternak S, Mlinarić-Galinović G, Forčić D. Genetic diversity of human metapneumovirus in hospitalized children with acute respiratory infections in Croatia. *J Med Virol*. 2017;89(11):1885–93.
  141. Eshaghi AR, Duvvuri VR, Lai R, Nadarajah JT, Li A, Patel SN, et al. Genetic variability of human respiratory syncytial virus A strains circulating in Ontario: A novel genotype with a 72 nucleotide G gene duplication. *PLoS One*. 2012;7(3).
  142. Trento A, Galiano M, Videla C, Carballal G, García-Barreno B, Melero J, et al. Major changes in the G protein of human respiratory syncytial virus isolates introduced by a duplication of 60 nucleotides. *J Gen Virol*. 2003;84(11):3115–20.
  143. Gimferrer L, Vila J, Piñana M, Andrés C, Rodrigo-Pendás JA, Peremiquel-Trillas P, et al. Virological surveillance of human respiratory syncytial virus A and B at a tertiary hospital in Catalonia (Spain) during five consecutive seasons (2013-2018). *Future Microbiol*. 2019;14(5):373–81.
  144. Piñana M, Vila J, Gimferrer L, Valls M, Andrés C, Ramón J, et al. (Abstract no. 321 for Presentation at ESCV2016) Genetic variability of human metapneumovirus A strain circulating in Catalonia during the 2014–2015 and 2015–2016 seasons: a 180-nucleotide G gene duplication reported. *J Clin v*. 2016;82S:S125.
  145. Saikusa M, Kawakami C, Nao N, Takeda M, Usuku S, Sasao T, et al. 180-nucleotide duplication in the G gene of human metapneumovirus A2b subgroup strains circulating

- in Yokohama city, Japan, since 2014. *Front Microbiol.* 2017;8(March):1–11.
146. Xie Z, Xu J, Ren Y, Cui A, Wang H, Song J, et al. Emerging human metapneumovirus gene duplication variants in patients with severe acute respiratory infection, China, 2017-2019. *Emerg Infect Dis.* 2021;27(1):275–7.
147. Piñana M, Gimferrer L, Andrés C, Codina MG, Martín MC, Fuentes F, et al. A novel human metapneumovirus carrying 180- and 111-nucleotide duplications within the G gene detected at a tertiary university hospital in Catalonia since the 2014-2015 season. In: 27th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases [Internet]. 2017. Available from: [https://www.escmid.org/escmid\\_publications/escmid\\_elibrary/material/?mid=52716](https://www.escmid.org/escmid_publications/escmid_elibrary/material/?mid=52716)
148. Saikusa M, Nao N, Kawakami C, Usuku S, Sasao T, Toyozawa T, et al. A novel 111-nucleotide duplication in the G gene of human metapneumovirus. *Microbiol Immunol.* 2017 Nov;61(11):507–12.
149. Comas-García A, Noyola DE, Cadena-Mota S, Rico-Hernández M, Bernal-Silva S. Respiratory syncytial virus-A ON1 genotype emergence in central Mexico in 2009 and evidence of multiple duplication events. *J Infect Dis.* 2018;217(7):1089–98.
150. Cook JD, Lee JE. The Secret Life of Viral Entry Glycoproteins: Moonlighting in Immune Evasion. *PLoS Pathog.* 2013;9(5).
151. Li J, Ren L, Guo L, Xiang Z, Paranhos-Baccalà G, Vernet G, et al. Evolutionary dynamics analysis of human metapneumovirus subtype A2: Genetic evidence for its dominant epidemic. *PLoS One.* 2012;7(3):1–9.
152. Gaunt ER, Jansen RR, Poovorawan Y, Templeton KE, Toms GL, Simmonds P. Molecular epidemiology and evolution of human respiratory syncytial virus and human metapneumovirus. *PLoS One.* 2011;6(3):1–11.
153. Schuster JE, Khuri-Bulos N, Faouri S, Shehabi A, Johnson M, Wang L, et al. Human Metapneumovirus Infection in Jordanian Children. *Pediatr Infect Dis J.* 2015;34(12):1335–41.
154. Pancham K, Sami I, Perez GF, Huseni S, Kurdi B, Rose MC, et al. Human metapneumovirus infection is associated with severe respiratory disease in preschool children with history

- of prematurity. *Pediatr Neonatol*. 2016;57(1):27–34.
155. Papenburg J, Hamelin MÈ, Ouhoummane N, Carbonneau J, Ouakki M, Raymond F, et al. Comparison of risk factors for human metapneumovirus and respiratory syncytial virus disease severity in young children. *J Infect Dis*. 2012;206(2):178–89.
  156. Davis CR, Stockmann C, Pavia AT, Byington CL, Blaschke AJ, Hersh AL, et al. Incidence, morbidity, and costs of human metapneumovirus infection in hospitalized children. *J Pediatric Infect Dis Soc*. 2016;5(3):303–11.
  157. Esposito S, Mastrolia MV. Metapneumovirus infections and respiratory complications. *Semin Respir Crit Care Med*. 2016;37(4):512–21.
  158. Arnott A, Vong S, Sek M, Naughtin M, Beauté J, Rith S, et al. Genetic variability of human metapneumovirus amongst an all ages population in Cambodia between 2007 and 2009. *Infect Genet Evol*. 2013;15:43–52.
  159. Xiao N, Xie Z, Zhang B, Yuan X, Song J, Gao H, et al. Prevalence and Clinical and Molecular Characterization of Human Metapneumovirus in Children With Acute Respiratory Infection in China. *Pediatr Infect Dis J*. 2010;29(2):131–4.
  160. Tulloch RL, Kok J, Carter I, Dwyer DE, Eden J-S. An Amplicon-Based Approach for the Whole-Genome Sequencing of Human Metapneumovirus. *Viruses*. 2021 Mar 18;13(3):499.
  161. Schobel SA, Stucker KM, Moore ML, Anderson LJ, Larkin EK, Shankar J, et al. Respiratory Syncytial Virus whole-genome sequencing identifies convergent evolution of sequence duplication in the C-terminus of the G gene. *Sci Rep*. 2016;6(May):26311.
  162. Walls AC, Tortorici MA, Frenz B, Snijder J, Li W, Rey FA, et al. Glycan shield and epitope masking of a coronavirus spike protein observed by cryo-electron microscopy. *Nat Struct Mol Biol*. 2016;23(10):899–905.
  163. Oketch JW, Kamau E, Otieno GP, Otieno JR, Agoti CN, Nokes DJ. Human metapneumovirus prevalence and patterns of subgroup persistence identified through surveillance of pediatric pneumonia hospital admissions in coastal Kenya, 2007-2016. *BMC Infect Dis*. 2019;19(1):1–13.
  164. Nao N, Saikusa M, Sato K, Sekizuka T, Usuku S, Tanaka N, et al. Recent molecular

- evolution of human metapneumovirus (HMPV): Subdivision of HMPV a2b strains. *Microorganisms*. 2020;8(9):1–14.
165. Hadfield J, Megill C, Bell SM, Huddleston J, Potter B, Callender C, et al. Nextstrain: real-time tracking of pathogen evolution. *Bioinformatics*. 2018 Dec;34(23):4121.
166. Van Poelvoorde LAE, Bogaerts B, Fu Q, De Keersmaecker SCJ, Thomas I, Van Goethem N, et al. Whole-genome-based phylogenomic analysis of the Belgian 2016–2017 influenza A(H3N2) outbreak season allows improved surveillance. *Microb Genomics*. 2021 Sep 3;7(9).
167. Dyrdak R, Mastafa M, Hodcroft EB, Neher RA, Albert J. Intra- and interpatient evolution of enterovirus D68 analyzed by whole-genome deep sequencing. *Virus Evol*. 2019 Jan 1;5(1):1–9.





Anexos  
Anexos



## 9 ANEXOS

---

### 9.1 PRODUCCIÓN CIENTÍFICA RELACIONADA CON LA TESIS DOCTORAL

#### 9.1.1 Artículos

1. Piñana M, González-Sánchez A, Andrés C, Abanto M, Vila J, Esperalba J, et al. **The emergence, impact, and evolution of human metapneumovirus variants all over 8 pre- and pandemic seasons.** Unpublished.
2. Piñana M, Vila J, Maldonado C, Galano-Frutos JJ, Valls M, Sancho J, et al. **Insights into immune evasion of human metapneumovirus: novel 180- and 111-nucleotide duplications within viral G gene throughout 2014-2017 seasons in Barcelona, Spain.** J Clin Virol. 2020 Nov;132(August):104590.
3. Piñana M, Vila J, Gimferrer L, Valls M, Andrés C, Codina MG, et al. **Novel human metapneumovirus with a 180-nucleotide duplication in the G gene.** Future Microbiol. 2017 Jun;12(7):565–71. Vs

#### 9.1.2 Comunicaciones orales

1. Piñana M, Gimferrer L, Andrés C, Codina MG, Fuentes F, Martín MC, Rubio S, Alcubilla P, Pumarola T, Antón A. **Noves variants de metapneumovirus humà portadores de duplicacions de 180 i 111 nucleòtids al gen G detectades a un hospital universitari terciari a Catalunya des de la temporada 2014-2015.** Jornada UAB 2017.
2. Piñana M, Gimferrer L, Andrés C, Codina MG, Martín MC, Fuentes F, Saiz R, Alcubilla P, Pumarola T, Antón A. **A novel human metapneumovirus carrying a 180-nucleotide duplication within the coding G protein region detected at a tertiary university hospital in Catalonia since the 2014-2015 season.** 27th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases in Vienna.

#### 9.1.3 Pósters

1. Piñana M, Galano-Frutos JJ, Vila J, Nuvials FX, Andrés C, Sancho J, Valls M, Maldonado C, Gimferrer L, Esperalba J, Codina MG, Pumarola T, Antón A. **Novel**

- duplications in human metapneumovirus G gene: Are we witnessing the evolution of an immune evasion mechanism?** XV Congreso Nacional de Virología en Barcelona.
2. Piñana M, Galano-Frutos JJ, Vila J, Nuvials FX, Andrés C, Sancho J, Valls M, Maldonado C, Gimferrer L, Esperalba J, Codina MG, Pumarola T, Antón A. **Novel duplications in human metapneumovirus G gene: Are we witnessing the evolution of an immune evasion mechanism?** 28th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases in Amsterdam.
  3. Piñana M, Andrés C, Gimferrer L, Codina MG, Martín MC, Esperalba J, Fuentes F, Rubio S, Alcubilla P, Pumarola T, Antón A. **Human metapneumovirus: Are the new duplications within the G gene responsible for doubling its prevalence?** 12a Jornada Científica VHIR.
  4. Piñana M, Andrés C, Gimferrer L, Codina MG, Martín MC, Esperalba J, Fuentes F, Rubio S, Alcubilla P, Pumarola T, Antón A. **Human metapneumovirus: Are the new duplications within the G gene responsible for doubling its prevalence?** XVII Jornada de Virologia a Barcelona.
  5. Piñana M, Andrés C, Gimferrer L, Codina MG, Martín MC, Esperalba J, Fuentes F, Rubio S, Alcubilla P, Pumarola T, Antón A. **Human metapneumovirus: Are the new duplications within the G gene responsible for doubling its prevalence?** 21st annual Meeting of the European Society for Clinical Virology, 2018 (Atenes, Grècia).
  6. Piñana M, Galano-Frutos JJ, Vila J, Nuvials FX, Andrés C, Sancho J, Valls M, Maldonado C, Gimferrer L, Esperalba J, Codina MG, Pumarola T, Antón A. **Novel duplications in human metapneumovirus G gene: Are we witnessing the evolution of an immune evasion mechanism?** 28th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases in Amsterdam.
  7. Piñana M, Galano-Frutos JJ, Vila J, Nuvials FX, Andrés C, Sancho J, Valls M, Maldonado C, Gimferrer L, Esperalba J, Codina MG, Pumarola T, Antón A. **Novel duplications in human metapneumovirus G gene: Are we witnessing the evolution of an immune evasion mechanism?** XV Congreso Nacional de Virología en Barcelona.

8. Piñana M, Andrés C, Gimferrer L, Codina MG, Fuentes F, Martín MC, Rubio S, Alcubilla P, Isern A, Osuna M, Pumarola T, Antón A. **A novel human metapneumovirus carrying a 111-nucleotide duplication within the G gene detected at a tertiary university hospital in Catalonia since the 2015-2016 season.** 20th European Society for Clinical Virology Congress in Stresa.

## 9.2 PRODUCCIÓN CIENTÍFICA INDEPENDIENTE DE LA TESIS DOCTORAL

### 9.2.1 Artículos

1. Andrés C, Piñana M, Borrás-Bermejo B, González-Sánchez A, García-Cehic D, Esperalba J, et al. **A year living with SARS-CoV-2: an epidemiological overview of viral lineage circulation by whole-genome sequencing in Barcelona city (Catalonia, Spain).** Emerg Microbes Infect. 2021 Nov 29;1–30.
2. Sauleda S, Palacios L, Brès V, Piñana M, Alonso-Hernandez L, Bes M, et al. **Clinical evaluation of the Procleix SARS-CoV-2 assay, a sensitive, high-throughput test that runs on an automated system.** Diagn Microbiol Infect Dis. 2022 Jan;102(1):115560.
3. Gregori J, Cortese MF, Piñana M, Campos C, Garcia-Cehic D, Andrés C, et al. **Host-dependent editing of SARS-CoV-2 in COVID-19 patients.** Emerg Microbes Infect. 2021 Jan 1;10(1):1777–89.
4. Piñana M, Abril JF, Andrés C, Silgado A, Navarro A, Suy A, et al. **Viral populations of SARS-CoV-2 in upper respiratory tract, placenta, amniotic fluid and umbilical cord blood support viral replication in placenta.** Clin Microbiol Infect. 2021 Oct;27(10):1542–4.
5. Cribiù FM, Erra R, Pugni L, Rubio-Perez C, Alonso L, Simonetti S, et al. **Severe SARS-CoV-2 placenta infection can impact neonatal outcome in the absence of vertical transmission.** J Clin Invest. 2021 Mar 15;131(6).
6. Alm E, Broberg EK, Connor T, Hodcroft EB, Komissarov AB, Maurer-Stroh S, et al. **Geographical and temporal distribution of SARS-CoV-2 clades in the WHO European Region, January to June 2020.** Eurosurveillance. 2020;25(32):1–8.

7. Andrés C, Garcia-Cehic D, Gregori J, Piñana M, Rodriguez-Frias F, Guerrero-Murillo M, et al. **Naturally occurring SARS-CoV-2 gene deletions close to the spike S1/S2 cleavage site in the viral quasispecies of COVID19 patients.** *Emerg Microbes Infect.* 2020;9(1):1900–11.
8. Andrés C, Piñana M, Vila J, Esperalba J, Trejo-Zahínos J, Codina MG, et al. **The high genetic similarity between rhinoviruses and enteroviruses remains as a pitfall for molecular diagnostic tools: A three-year overview.** *Infect Genet Evol.* 2019;75.
9. Andrés C, Guasch E, Piñana M, Fernandes P, Gimferrer L, Easo DV, et al. **Recombinant CV-A6 strains related to hand-foot-mouth disease and herpangina at primary care centers (Barcelona, Spain).** *Future Microbiol.* 2019;14(6).
10. Andrés C, Peremiquel-Trillas P, Gimferrer L, Piñana M, Codina MG, Rodrigo-Pendás JÁ, et al. **Molecular influenza surveillance at a tertiary university hospital during four consecutive seasons (2012–2016) in Catalonia, Spain.** *Vaccine.* 2019 Apr;37(18):2470–6.
11. Gimferrer L, Vila J, Piñana M, Andrés C, Rodrigo-Pendás JA, Peremiquel-Trillas P, et al. **Virological surveillance of human respiratory syncytial virus A and B at a tertiary hospital in Catalonia (Spain) during five consecutive seasons (2013–2018).** *Future Microbiol.* 2019;14(5):373–81.
12. Andrés C, Vila J, Gimferrer L, Piñana M, Esperalba J, Codina MG, et al. **Surveillance of enteroviruses from paediatric patients attended at a tertiary hospital in Catalonia from 2014 to 2017.** *J Clin Virol.* 2019;110.
13. Andrés C, Peremiquel-Trillas P, Gimferrer L, Isern A, Piñana M, Rodrigo-Pendás JÁ, et al. **Genetic diversity of rhinoviruses detected at a tertiary hospital in Catalonia (Spain) during the 2014–2017 seasons.** *Future Microbiol.* 2018;13(14).
14. Fernández-Naval C, Arando M, Espasa M, Antón A, Gimferrer L, Piñana M, et al. **Novel tp0548 Sequence-Type of *Treponema pallidum* Identified in Barcelona, Spain.** *Sex Transm Dis.* 2019 May;46(5):e50–2.
15. Gimferrer L, Andrés C, Rando A, Piñana M, Codina MG, Martín M del C, et al. **Evaluation of Seegene Allplex Respiratory Panel 1 kit for the detection of**

**influenza virus and human respiratory syncytial virus.** J Clin Virol. 2018 Aug;105(April):31–4.

### 9.2.2 Comunicaciones orales

1. Andrés C, Abril JF, Piñana M, García-Cehic D, Esperalba E, Rando A, Campos C, Codina MG, Martín MC, Castillo C, Pumarola T, Quer J, Antón A. **Epidemiological overview of SARS CoV 2 circulation by whole genome sequencing during the first wave in Barcelona (Catalonia, Spain).** 13a Jornada Científica del VHIR, Barcelona.
2. Piñana M, Andrés C, García-Cehic D, Guerrero-Murillo M, Rando A, Martín M, Esperalba J, Pumarola T, Quer J, Antón A. **Caracterización del SARS-CoV-2 por NGS en paciente leve y grave en Vall d’Hebron.** I Congreso Nacional COVID19, online.
3. Piñana M, Guerrero-Murillo M, Vila J, Lera E, Gimferrer L, Rodrigo-Pendás JA, Rabella N, Moliner E, Marín P, del Cuerpo M, Muñoz-Almagro C, Esteva C, Jordan I, Ricart S, Alexandre C, Ramilo O, Casanovas JM, Ferrer J, de Quixano M, Caro I, Vila M, Valente AM, van Ezzo D, Andrés C, Esperalba J, Mejias A, Pumarola T, Antón A. **Mutations associated with severe respiratory syncytial virus infection in infants by whole genome sequencing.** ESCV, Copenhagen, Denmark
4. Andrés C, Vila J, Piñana M, Gimferrer L, Codina MG, Barnés M, Martín MC, Fuentes F, Rubio S, Rodrigo C, Pumarola T, Antón A. **Virological and clinical surveillance (2014-2017) of respiratory enteroviruses from paediatric patients attended at a tertiary hospital in Catalonia (Spain).** XVII Jornada de Virologia a Barcelona.
5. Piñana M, Vila J, Saura J, Andrés C, Gimferrer L, Codina MG, Subirana I, Fuentes F, Martín MC, Rubio S, Rodrigo C, Pumarola T, Antón A. **Molecular characterisation and clinical impact of human bocavirus at a tertiary university hospital in Barcelona (Catalonia, Spain).** 36th Annual Meeting of the European Society for Paediatric Infectious Diseases in Malmö.
6. Andrés C, del Cuerpo M, Gimferrer L, Rabella N, Piñana M, Codina MG, Fuentes F, Pumarola T, Antón A. **Detection of reassortant influenza B strains from 2004 to 2015 seasons in Barcelona (Spain) by whole genome sequencing (WGS).** 20th European Society for Clinical Virology Congress in Stresa.



### 9.2.3 Pósters

1. Andrés C, Piñana M, Borràs-Bermejo B, Abril JF, García-Cehic D, Rando A, Campos C, Codina MG, Martín MG, Castillo C, García-Comuñas K, Vázquez-Mercado R, Martins-Martins R, Esperalba J, Campins-Martí M, Pumarola T, Quer J, Antón A. **A year living with SARS-CoV-2: Epidemiological overview of its circulation by whole-genome sequencing in Barcelona (Catalonia, Spain)**. 23rd annual Meeting of the European Society for Clinical Virology, 2021, online.
2. Piñana M, Borràs B, Andrés C, Zules-Oña RG, Esperalba J, García-Cehic D, Rando A, Campos C, Codina MG, Martín MC, Castillo C, García-Comuñas K, Vázquez-Mercado R, Martins-Martins R, Pumarola T, Campins M, Quer J, Antón A. **Characteristics of 25 cases of reinfection of SARS-CoV-2 in a tertiary university hospital in Barcelona, Spain**. 23rd annual Meeting of the European Society for Clinical Virology, 2021, online.
3. Recio G, Benvanet C, Martín-Grau C, Picó-Plana E, Bastón N, Gutiérrez C, Sans T, Olona M, Mestre MT, Castillo C, Piñana M, Andrés C, Antón A. **Confirmed reinfection of SARS-CoV-2 by whole genome sequencing**. 31st European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, online.
4. Piñana M, Abril JF, Andrés C, Silgado A, Fernández C, García-Ruiz I, Martín MC, Castillo C, Campos C, García-Cehic D, Rando A, Esperalba J, Codina MG, Suy A, Sulleiro E, Pumarola T, Quer J, Antón A. **Viral populations of SARS CoV 2 detected in placenta, amniotic fluid and umbilical cord blood from a transplacental transmission case in Barcelona, Spain**. 13a Jornada Científica del VHIR, Barcelona.
5. Silgado A, Andrés C, Piñana M, Fernández-Naval C, Guerrero-Murillo M, Garcia-Ruiz I, García-Cehic D, Esperalba J, Suy A, Sulleiro E, Quer J, Pumarola T, Antón A. **Caracterización genética de SARS-CoV-2 en un caso de transmisión transplacentaria**. I Congreso Nacional COVID19, online.
6. Andrés C, Abril JF, Piñana M, García-Cehic D, Esperalba E, Rando A, Campos C, Codina MG, Martín MC, Castillo C, Pumarola T, Quer J, Antón A. **Epidemiological overview of SARS CoV 2 circulation by whole genome sequencing during the first wave in Barcelona (Catalonia, Spain)**. 13a Jornada Científica del VHIR, Barcelona.

7. Peremiquel-Trillas P, Vila J, Antón A, Lera E, Gimferrer L, Martínez-Mitjana L, Barceló-Carceller I, Borrás-Bermejo B, Piñana M, Rodrigo-Pendás JA, Rodrigo C, Campins-Martí M, Pumarola T. **Pediatric population during four consecutive seasons in a tertiary care hospital in Barcelona (Spain)**. ESCAIDE, Stockholm, Sweden.
8. Antón A, Muñoz-Almagro C, Rabella N, Casañ N, Sanfeliu I, Bernet A, Castellarnau E, Tejerina P, Rodrigo-Pendás JA, Piñana M, Vila J, Esteva C, Ludwig G, Jordan I, Marin P, Moliner E, Valle J, Figueras T, Prat C, Matas L, Mendez M, Pineda V, Solé E, Gutierrez C, Guarch B, Ramírez J, Pumarola T. **Virological surveillance of respiratory syncytial virus (RSV) through a hospital-based surveillance network in Catalonia (2015-2019)**. Present, past and future. ESCAIDE, Stockholm, Sweden.
9. Andrés C, Fernandes P, Piñana M, Gimferrer L, Guasch E, Van Esso D, Codina MG, Esperalba J, Martín MC, Fuentes F, Rubio S, Pumarola T, Group for EV Surveillance in Paediatric Primary Care, Antón A. **Predominance of nonrecombinant and recombinant CV-A6 strains related to Hand, Food and Mouth disease and Herpangina at primary care centers (Barcelona, Spain) during the 2017-2018 season**. 21st annual Meeting of the European Society for Clinical Virology, 2018 (Atenes, Grècia).
10. Gimferrer L, Piñana M, Andrés C, Chavarría-Miró G, Codina MG, Martín MC, Esperalba J, Fuentes F, Rubio S, Alcubilla P, Pumarola T, Antón A. **Genetic and phylodynamics analysis of human respiratory syncytial virus A and B fusion protein**. 21st annual Meeting of the European Society for Clinical Virology, 2018 (Atenes, Grècia).
11. Andrés C, Piñana M, Esperalba J, Codina MG, Martín MC, Fuentes F, Rubio S, Pumarola T, Antón A. **Clinical evaluation of the Panther Fusion respiratory system at a tertiary university hospital in Catalonia (Spain)**. 28th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases in Amsterdam.
12. Andrés C, Piñana M, Vila J, Esperalba J, Codina MG, Martín MC, Fuentes F, Rubio S, Pumarola T, Sole A, Antón A. **High genetic similarity between rhinoviruses and enteroviruses remains as a pitfall for molecular diagnostic tools: a three-year overview**. 28th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases in Amsterdam.

13. Vila J, Andrés C, Gimferrer L, Piñana M, Codina MG, Barnés M, Martín MC, Fuentes F, Rubio S, Rodrigo C, Pumarola T, Antón A. **Clínica i virologia de les infeccions respiratòries per enterovirus a la població pediàtrica entre les temporades 2014-2017**. 12a Jornada Científica VHIR.
14. Andrés C, Vila J, Piñana M, Esperalba J, Trejo-Zahínos J, Codina MG, Martín MC, Fuentes F, Rubio S, Rodrigo C, Pumarola T, Antón A. **Surveillance of EV-D68 (2014-2018) in hospitalised paediatric population: a task focused on severe cases**. XV Congreso Nacional de Virología en Barcelona.
15. Andrés C, Vila J, Gimferrer L, Piñana M, Esperalba J, Codina MG, Barnés M, Martín MC, Fuentes F, Rubio S, Rodrigo C, Pumarola T, Antón A. **Virologic and clinical surveillance of respiratory enteroviruses from paediatric patients attended at a tertiary university hospital in Catalonia (Spain) during the 2014-2017 seasons**. 36th Annual Meeting of the European Society for Paediatric Infectious Diseases in Malmö.
16. Fernández-Naval C, Arando M, Antón A, González JJ, Espasa M, Fernández-Huerta M, Andrés C, Piñana M, Serra-Pladevall J, Pumarola T, Vall-Mayans M, Esperalba J. **High macrolide resistance from different strain types of *Treponema pallidum* in Barcelona**. The International Union against Sexually Transmitted Infections (IUSTI) 2018 in Dublin.
17. Fernández-Naval C, Arando M, Antón A, Gimferrer L, Piñana M, González-López JJ, Codina MG, Fernández-Huerta M, Espasa M, Serra-Pladevall J, Pumarola T, Vall-Mayans M, Esperalba J. **Molecular typing of *Treponema pallidum*: Is the stage of syphilis influencing on the treponemal detection and typing efficiencies?** 28th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases in Madrid.
18. Andrés C, Osuna M, Gimferrer L, Piñana M, Isern A, Codina MG, Fuentes F, Martín MC, Alcubilla P, Rubio S, Pumarola T, Antón A. **Virological surveillance of respiratory enteroviruses from attended patients at a tertiary university hospital in Catalonia (Spain) during the 2014-2017 seasons**. 20th European Society for Clinical Virology Congress in Stresa.
19. Andrés C, Gimferrer L, Piñana M, Peremiquel-Trillas P, Borrás-Bermejo B, Codina MG, Rodrigo-Pendás JA, Campins M, Fuentes F, Alcubilla P, Pumarola T, Antón A.

- Virological surveillance of influenza viruses during the 2016-2017 season at a tertiary university hospital in Catalonia (Spain).** 20th European Society for Clinical Virology Congress in Stresa.
20. Gimferrer L, Piñana M, Andrés C, Vall A, Codina MG, Fuentes F, Martín MC, Rubio S, Pumarola T, Antón A. **Molecular epidemiology of human mastadenovirus detected in respiratory specimens at a tertiary care university hospital in Catalonia (Spain) during the 2013-2015 seasons.** 20th European Society for Clinical Virology Congress in Stresa.
21. Andrés C, Gimferrer L, Piñana M, Peremiquel P, Codina MG, Campins M, Martín MC, Fuentes F, Saiz R, Alcubilla P, Almirante Gragera B, Melendo S, Pumarola T, Antón A. **Molecular characterization of influenza viruses during the 2012-2016 seasons at a tertiary university hospital in Catalonia (Spain).** 27th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases in Vienna.
22. Andrés C, Gimferrer L, Piñana M, Codina MG, Fuentes F, Martín MC, Saiz R, Alcubilla P, Pumarola T, Antón A. **Molecular characterization of rhinoviruses detected at a tertiary university hospital during the 2014-2016 seasons in Catalonia (Spain).** 27th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases in Vienna.
23. Andrés C, Gimferrer L, Piñana M, Peremiquel-Trillas P, Codina MG, Rodrigo-Pendas JA, Campins M, Martín MC, Fuentes F, Alcubilla P, Pumarola T, Antón A. **Virological surveillance of influenza viruses during the 2012-2017 seasons at a tertiary university hospital in Catalonia (Spain).** XIV Congreso Nacional de Virología en Cádiz.
24. Isern A, Andrés C, Gimferrer L, Piñana M, Osuna M, Codina MG, Martín MC, Fuentes F, Alcubilla P, Pumarola T, Antón A. **Genetic diversity of rhinoviruses detected at a tertiary university hospital from 2014 to 2017 in Catalonia, Spain.** XIV Congreso Nacional de Virología en Cádiz.
25. Gimferrer L, Andrés C, Piñana M, Rodrigo-Pendas JA, Codina MG, Peremiquel-Trillas P, Martín MC, Fuentes F, Alcubilla P, Vila J, Campins M, Rodrigo C, Pumarola T, Antón A. **Four years (2013-2017) of virological surveillance of human**

**respiratory syncytial virus at the Vall d'Hebron University Hospital, Barcelona (Spain).** XIV Congreso Nacional de Virología en Cádiz.

26. Andrés C, Gimferrer L, Piñana M, Peremiquel-Trillas P, Codina MG, Campins M, Martín MC, Fuentes F, Saiz R, Alcubilla P, Melendo S, Pumarola T, Antón A. **Molecular characterisation of influenza viruses during the 2012-2016 seasons at a tertiary paediatric university hospital in Catalonia (Spain).** European Society for Paediatric Infectious Diseases.