

# La gravedad de la infección por el virus respiratorio sincicial (VRS) y la participación del polimorfismo -2871 A>G del gen TLR-9 en lactantes chilenos menores de 6 meses de edad

Jorge Silva M.<sup>(1)</sup>, Carlos Castillo M.<sup>(1)</sup>, Carmen Larrañaga L.<sup>(2)</sup>, Sandra Ampuero LI.<sup>(2)</sup>

<sup>(1)</sup>*Estudiante de Medicina, Facultad de Medicina, Universidad de Chile.*

<sup>(2)</sup>*Programa de Virología, Instituto de Ciencias Biomédicas, Facultad de Medicina, Universidad de Chile.*

Financiamiento: Proyecto Fondecyt 1100477.

## **SUMMARY**

Respiratory syncytial virus (RSV) is the most common cause of severe lower respiratory tract infection (LRTI) in infants. In Chile, 2% of children infected with RSV are hospitalized. Nowadays, genetic factors as Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs) in innate immune genes have been associated with the RSV infection severity. We studied the association between the SNP-2871 A>G (rs187084) in TLR9 gene and severity of infection in Chilean infants. Ninety seven, previously healthy term infants (< 6-months) with RSV-LRTI were analyzed. The severity of disease was determined by clinical scoring system. RSV and other respiratory virus were confirmed by immunofluorescence assays and, or reverse transcription-real time PCR in nasopharyngeal aspirate sample. SNP was analyzed by PCR and RFLP in blood sample. Unphased program and Armitage's test were used for genetic analysis. Infants were grouped in mild (n:31), moderate (n:28) and severe (n:38). There were no differences in sex or age between RSV groups. For all infants, the frequency for allele A was 0.639. Genotypic frequencies were 40.2% A/A; 47.4% A/G and 12.4% G/G. There were not statistical differences between infant groups. The SNP -2871 A>G in TLR9 is not associated to severity RSV infection in Chilean infants.

## INTRODUCCIÓN

Las infecciones respiratorias representan un problema prioritario de salud, tanto en Chile como a nivel mundial, especialmente al referirnos a la población infantil. En niños estas infecciones están mayoritariamente limitadas al tracto respiratorio superior; sin embargo, aproximadamente un tercio presenta una infección respiratoria aguda inferior o baja (IRAB). Esta infección se puede manifestar como bronquiolitis, exacerbaciones de asma o sibilancias y neumonía<sup>(1)</sup>.

El agente viral principal de la bronquiolitis es el virus respiratorio sincicial (VRS), aunque otros virus como metapneumovirus, parainfluenza, adenovirus, coronavirus y bocavirus también pueden ocasionar esta patología<sup>(2)</sup>. En nuestro país, estudios en población lactante han establecido una prevalencia similar de los virus respiratorios, siendo VRS el agente más importante<sup>(3,4)</sup>. Actualmente el rinovirus (RV), tradicionalmente asociado al resfrío común, también ha sido detectado como agente etiológico de bronquiolitis, presentándose como infección única o con VRS u otros virus respiratorios<sup>(5)</sup>. En nuestro país no hay antecedentes de la prevalencia de este virus en población con IRAB.

El VRS pertenece a la familia *Paramyxoviridae* y presenta una hebra de ARN de polaridad negativa de 15,2 Kb que codifica para 10 proteínas, las que son esenciales en su proceso de infección<sup>(6)</sup>. El RV pertenece a la familia *Picornaviridae* y está constituido de una hebra de ARN de polaridad positiva de 7 a 8 Kb. Codifica una poliproteína que es procesada en proteínas más pequeñas. Estas proteínas participan en la infección y replicación viral<sup>(7)</sup>.

Las infecciones de estos virus se concentran en los meses fríos. La fuente de contagio son otros humanos y la historia clínica, generalmente asintomática, puede cursar con signos respiratorios leves, lle-

gando a causar bronquiolitis y en casos más graves, neumonía, pudiendo requerir cuidados intensivos, ventilación mecánica o incluso significar la muerte. Dentro del primer año de vida, dos tercios de los lactantes ya se han infectado con VRS y a los dos años el 100% ya se ha expuesto a este virus. La mayoría de ellos presentan una evolución sintomática leve; sin embargo, alrededor del 2% se deben hospitalizar por cuadros respiratorios más graves<sup>(8)</sup>.

Las evoluciones más graves están supeditadas a ciertos factores de riesgo, como las cardiopatías congénitas, displasia broncopulmonar, prematuridad, inmunodeficiencias o fibrosis quísticas. Sin embargo, la mayoría de los niños que requieren hospitalización no tiene factores de riesgo conocidos; son niños previamente sanos, por lo cual se han buscado factores asociados a la infección viral y factores del hospedero como es la predisposición genética. El estudio realizado por Thomsen estableció que la concordancia en la gravedad de la infección por VRS era mayor en el grupo de gemelos idénticos que en los fraternos, estableciendo un aporte de la genética del 20%<sup>(9)</sup>. Muchos estudios han analizado el impacto de la presencia de distintos alelos o genotipos de un polimorfismo en la infección por VRS<sup>(10)</sup>. La mayoría de estos estudios están dirigidos al análisis de polimorfismos de un nucleótido (SNP) en genes candidatos asociados a la patogénesis de la infección. Dentro de ellos, se han asociado genes que participan en la respuesta inmune innata como los genes de las proteínas del surfactante, SP-A1, SP-A2, SP-D y genes de los receptores tipo Toll (TLRs)<sup>(11-16)</sup>.

Los TLRs son receptores importantes en la respuesta inmune innata, reconociendo patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) y activando las respuestas de las células inmunes. Inicialmente la participación de los TLRs estaba restringida al reconocimiento de las infecciones bacterianas; sin embargo, actualmente se sabe que los receptores intracelulares como TLR3, TLR7,

TLR 8 y TLR9 son capaces de reconocer ácidos nucleicos virales induciendo una respuesta vía interferón tipo I<sup>(17)</sup>. Por otro lado, el TLR4 presente en la membrana celular se ha asociado al reconocimiento de la proteína F del VRS<sup>(18)</sup>. En el trabajo de Mailaparambil y cols. analizaron distintos polimorfismos en los genes de los TLR, detectando una asociación leve entre uno de los polimorfismos en el gen TLR9 y la infección por VRS<sup>(19)</sup>. En este gen se han descrito varios polimorfismos en la zona promotora. Uno de ellos es el SNP en la posición -2871 (rs187084) o según la posición genómica 52201031 (NT\_022517.18) en el cual hay un cambio de A por G<sup>(20)</sup>. En estudios poblacionales se ha encontrado que el alelo A sería el alelo ancestral y el alelo G se presentaría con una frecuencia menor. Este SNP al ubicarse en la zona promotora del gen podría tener implicancias en la expresión génica de su ARNm.

A la fecha no se ha descrito una asociación de este SNP con la evolución grave de la infección por VRS, a pesar de su participación en la respuesta inmune. Considerando además que los estudios genéticos siempre son dependientes de la población en la que se estudia, es importante analizar si en la población chilena, el alelo G de este polimorfismo confiere un riesgo de una evolución grave de la infección por VRS. El objetivo de este estudio fue establecer las frecuencias alélicas y genotípicas de este polimorfismo en una población de lactantes con primoinfección por VRS y su asociación con la gravedad de la infección.

## **PACIENTES Y MÉTODOS**

**Pacientes:** se enrolaron 140 lactantes chilenos menores de 6 meses previamente sanos con diagnóstico clínico de primoinfección respiratoria aguda adquirida en la comunidad, caracterizada por coriza, tos, disnea, taquipnea, dificultad espiratoria y condensación pulmonar y/o sibilancias. Se excluyeron del enrolamiento a aquellos lactantes con

una infección anterior por VRS u otra infección respiratoria por hospitalizaciones previas por cuadros respiratorios, lactantes con inmunodeficiencia, lactantes con enfermedades congénitas, cardiopatías, displasia broncopulmonar y prematurez.

Los pacientes se enrolaron en el Consultorio Cruz Melo, en el Servicio de Urgencia Pediátrica y salas de hospitalización pediátrica del Hospital Roberto del Río durante las epidemias del 2010 y 2011. Los padres o el tutor legal firmaron un consentimiento informado previamente aprobado por el Comité de Ética de la Facultad de Medicina, Universidad de Chile y por el Comité de Ética del Servicio de Salud Metropolitano Norte.

**Muestras:** a cada lactante se le tomó una muestra de aspirado nasofaríngeo (ANF) en medio Hanks al ingresar al estudio para realizar el diagnóstico virológico. Además se le tomaron 2 ml de sangre en tubo vacutainer-EDTA para el estudio genético. Ambas muestras fueron transportadas en frío inmediatamente al Programa de Virología de la Facultad de Medicina, Universidad de Chile.

**Evaluación clínica:** se registraron los parámetros clínicos de fiebre, tos, disnea, taquipnea, distrés respiratorio, signos clínicos de condensación pulmonar, asociación o no a obstrucción bronquial. Además se registraron los días de hospitalización, la necesidad de O<sub>2</sub> y FiO<sub>2</sub> máxima para poder obtener el puntaje de gravedad clínica según lo descrito por Larragaña y cols<sup>(21)</sup>. Según este puntaje los pacientes fueron divididos en leves (puntaje ≤ a 3), moderados (puntaje: 4-6) y graves (puntaje ≥ a 7). En caso de los pacientes hospitalizados, los parámetros clínicos fueron obtenidos al finalizar su estadía en el hospital.

**Diagnóstico virológico:** la detección viral se realizó mediante ensayos de inmunofluorescencia indirecta y transcripción inversa-reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) en tiempo real a partir de

la muestra de ANF. El detalle metodológico se ha descrito previamente<sup>(13)</sup>.

Genotipificación del SNP -2871 A>G del gen TLR9: se extrajo el ADN de las muestras de sangre mediante el método tiocianato de guanidinio-fenol-cloroformo. El ADN obtenido se cuantificó mediante espectrometría y se mantuvieron en alícuotas a -20°C.

La genotipificación del SNP se realizó mediante PCR y corte con enzima de restricción (PCR-RFLP). A partir de las muestras de ADN se amplificó un fragmento de 182 pares de base (pb) utilizando como partidor directo: 5' CTATGTTTCTCTTTGTCCTAA 3' y como partidor reverso 5' AGATATCAAGCACTTACTATG 3'. La reacción de PCR se realizó en un volumen final de 50 µl que incluía 200 ng de ADN, 0,2 nM de cada dNTP, 0,2 mM de cada partidor, 4 mM de MgCl<sub>2</sub>, 1x de *buffer* de reacción y 1,5 U de Taq polimerasa (BioTools). La amplificación se realizó con 1 ciclo a 95°C por 5 min, seguido de 30 ciclos de 95°C por 30 seg, 56°C por 30 seg y 72°C por 30 seg (PxE 0.2 Thermal Cycler). El producto amplificado se visualizó en un gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio. El producto obtenido fue tratado con la endonucleasa de restricción Afl II (New England Biolabs) según las condiciones indicadas por el fabricante. Los fragmentos obtenidos se visualizaron en un gel de poliacrilamida al 12% teñido con plata. Según la presencia de los alelos, los productos obtenidos posterior a la digestión fueron: un fragmento de 182 pares de bases (pb) cuando está el alelo G y dos fragmentos de 107 y 75 pb cuando está el alelo A.

Análisis estadístico: los análisis demográficos y parámetros clínicos se realizaron con el programa SigmaStat 3.5. El equilibrio de Hardy-Weinberg y los análisis de asociación para las frecuencias genotípicas se calcularon mediante el programa [\[ihg.gsf.de/cgi-bin/hw/hwa1.pl\]\(http://ihg.gsf.de/cgi-bin/hw/hwa1.pl\). Las comparaciones de las frecuencias alélicas y genotípicas se realizaron utilizando el programa Unphased 3.0<sup>\(22\)</sup>.](http://</a></p></div><div data-bbox=)

## RESULTADOS

Análisis demográfico, evolución clínica y diagnóstico virológico: de los 140 pacientes que aceptaron participar en el estudio, se excluyeron 19 pacientes porque no cumplían con los requisitos de inclusión luego de la revisión de los antecedentes clínicos; no se logró obtener la muestra de sangre para el análisis genético o porque no se comprobó una infección viral, ya que el ingreso sólo fue por el cuadro clínico.

En el resultado del diagnóstico virológico de los 121 lactantes, 97 (79,5%) fueron VRS positivos presentando una infección única o coinfección con otro virus respiratorio. Los otros 24 pacientes presentaron infección por RV (19; 15,7%) o infección con un virus distinto a RV o VRS (5; 4,1%).

Los resultados que a continuación se presentan son aquellos obtenidos sólo con el grupo VRS positivo (n: 97).

Los 97 pacientes fueron distribuidos según su puntaje clínico en grave, moderado y leve. Los datos de edad y género, además de los antecedentes clínicos, se detallan en la Tabla 1. No hubo diferencia entre la distribución de género ni la edad de los pacientes según la evolución de la infección. Los requerimientos clínicos máximos fueron significativamente diferentes entre los grupos, resultado esperable considerando que el puntaje clínico de la evolución se basa en esos parámetros.

En la Tabla 2 se detalla el diagnóstico virológico del grupo VRS en relación a la infección única o coinfectado con RV u otro virus respiratorio.

Análisis genético del SNP-2871A>G en el gen TLR9: se determinaron las frecuencias alélicas y

**Tabla 1. Características clínicas y demográficas de los lactantes estudiados**

Grupo	Número de casos	Sexo		Significancia (valor p)	Edad (meses) media ± EE	Significancia (valor p)
		M	F			
Grupo VRS(+)	97	43	54		2,44 ± 0,18	
Subgrupo VRS graves	38	19	19	0,632	2,49 ± 0,30	0,852
Subgrupo VRS moderados	28	12	16		2,19 ± 0,28	
Subgrupo VRS leves	31	12	19		2,30 ± 0,27	

Características clínicas de los pacientes VRS (+)	Total de los casos VRS (+)	Resultados clínicos al alta			Significancia (valor p) <sup>a</sup>
		Graves	Moderados	Leves	
Números de casos	97	38	28	31	
Oxigenoterapia	66	38	28	0	<0,001
Unidad de Cuidados Intensivos (UCI)	22	22	0	0	<0,001
Ventilación mecánica (VM)	21	21	0	0	<0,001
Kinesioterapia respiratoria	76	34	25	17	0,246
Broncodilatadores	72	33	21	18	0,322
Corticoides endovenosos	13	12	1	0	<0,001
Apoyo hemodinámico	5	5	0	0	0,023

Requerimientos clínicos máximos <sup>c</sup>	Graves	Moderados	Leves	Significancia (valor p) <sup>b</sup>
Días de hospitalización	12,2 ± 1,1	4,0 ± 0,2	2,2 ± 0,3	<0,05*
Días con oxigenoterapia	10,2 ± 1	2,4 ± 0,2	0	<0,05
Días en UCI	7,9 ± 1,2	0	0	

<sup>a</sup> Prueba de Chi-cuadrado

<sup>b</sup> Prueba de Kruskal-Wallis varianza de rangos,

\* Diferencia significativa entre graves y leves y entre graves y moderados

Datos se presentan como media geométrica ± EE

**Tabla 2. Distribución de los lactantes según el diagnóstico virológico y la evolución de la infección**

Infección viral	Total (n:97)	Grave (n:38)	Moderado (n:28)	Leve (n:31)
VRS	63 (65,0%)	29 (76,3 %)	16 (57,7 %)	18 (58,1%)
VRS y RV	17 (17,5%)	3 ( 7,9%)	37 (25,0 %)	7 (22,6 %)
VRS, RV y otro	10 (10,3%)	3 ( 7,9%)	3 (10,7 %)	4 (12,9 %)
VRS y otro*	7 ( 7,2%)	3 ( 7,9 %)	2 ( 7,2%)	2 ( 6,4 %)

\*Distinto de RV

genotípicas de este SNP en los 97 pacientes VRS positivos. En la población estudiada este SNP se encuentra en equilibrio de Hardy-Weinberg.

Las frecuencias alélicas obtenidas por grupo según la gravedad de la infección se detallan en la Tabla 3 y las frecuencias genotípicas se de-

tallan en la Tabla 4. Al comparar las frecuencias alélicas y genotípicas entre los grupos VRS leve, moderado y grave o entre leve con moderado frente al grupo grave, no se encontraron diferencias significativas. Al analizar si este polimorfismo se asociaba a la gravedad de la infección mediante el test de Armitage tampoco

**Tabla 3. Frecuencias alélicas del SNP -2871 A>G del gen TLR9 en una población de lactantes chilenos VRS positivos con distinta de gravedad de la infección.**

SNP -2871A>G Alelo	Total (n:194)		Grave (n:76)		Moderado (n:56)		Leve (n:62)	
	n	%	n	%	n	%	n	%
A	124	0,639	46	0.605	40	0.679	38	0.645
G	70	0,361	30	0.395	22	0.321	18	0.355

n: número de cromosomas

**Tabla 4. Frecuencias genotípicas del SNP -2871 A>G del gen TLR9 en una población de lactantes chilenos VRS positivos con distinta gravedad de la infección.**

SNP -2871A>G Genotipo	Total (n:97)		Grave (n:38)		Moderado (n:28)		Leve (n:31)	
	n	%	n	%	n	%	n	%
A/A	39	40,2	14	36,8	13	46,4	12	38,7
A/G	46	47,4	18	47,4	12	42,9	16	51,6
G/G	12	12,4	6	15,8	3	10,7	3	9,7

n: número de individuos

encontramos diferencias significativas; sólo se aprecia que el alelo G tendría un mayor riesgo a la gravedad (OR: 1.247) al comparar el grupo de pacientes graves con leves; sin embargo, estadísticamente no es significativo.

### DISCUSIÓN

Nuestro estudio estuvo enfocado en el análisis de la participación del SNP-2871A>G del gen TLR9 en la evolución de la infección por VRS en una población de lactantes menores de 6 meses que presentaban una primoinfección por este agente viral, sin antecedentes conocidos de riesgo a desarrollar una infección grave. Considerando el grupo inicial de lactantes (n:121), el 80,2% (n:97) presentaba una infección por VRS, como infección única o con otro agente viral. Este resultado era esperable, considerando que el VRS es mundialmente el principal agente de las IRAB. El otro agente detectado fue el RV en el 16,5% de los casos, antecedente que no había sido descrito en nuestra población. El análisis posterior se realizó en el subgrupo VRS positivo donde el 39,2% tuvo una evolución grave y 31,9% una evolución leve según el puntaje clí-

nico<sup>(21)</sup>. Dentro de los subgrupos por gravedad no existieron diferencias significativas entre género y edad. Mientras que las diferencias en los distintos parámetros clínicos eran esperables, ya que el puntaje para establecer la gravedad de la infección está basado en varios de esos parámetros.

En el análisis genético no detectamos diferencias significativas en las frecuencias alélicas y genotípicas del SNP-2871A>G del gen TLR9 entre los grupos VRS grave, moderado y leve. El alelo G fue el alelo menos frecuente (0.361) en el grupo total de niños. Esta frecuencia es muy similar a las frecuencias detectadas en los subgrupos grave, moderado y leve (Tabla 3). En el estudio de Mailaparambil y col.<sup>(19)</sup> en población alemana tampoco detectaron diferencia entre el grupo VRS y el grupo control en este SNP. Sin embargo, a diferencia de ese estudio, nosotros realizamos las comparaciones dentro de un grupo que presentaba la infección, pero que tenía distinta evolución clínica y no solamente entre pacientes VRS positivos y VRS negativos. A pesar de ello, en ambos estudios la frecuencia para el alelo G en el grupo VRS es muy similar: 0,366 en el grupo alemán y 0,361 en nuestro estudio.

En los datos publicados en otras poblaciones<sup>(23)</sup>, pero no relacionados con infección, se aprecia una similar frecuencia alélica de nuestra población con la población europea (alelo G: 0,352), no así con la población asiática que presenta una frecuencia mucho mayor (0,454) o con la población de África Subsahariana (0,267). Estas distintas frecuencias apoyan el valor de realizar estudios genéticos en cada población, pues los resultados pueden variar dependiendo de la distribución étnica que exista en la población estudiada.

En nuestra población de lactantes y en los datos del grupo alemán, el genotipo heterocigoto es el más frecuente (47,4% y 50% respectivamente) seguido del homocigoto A/A (40,2% y 38,4%). En la población asiática estos porcentaje son diferentes, aunque se mantiene la misma tendencia (A/G: 51,8; A/A: 28,7%).

Mediante el test de Armitage, el alelo G se presenta como un alelo de riesgo al comparar el grupo grave con el leve (OR: 1.247); sin embargo, estadísticamente no es significativo. Este resultado puede deberse al número de casos, pues al reagrupar los 97 lactantes según su evolución clínica, el número de cada grupo disminuye y afecta el poder estadístico del resultado. Se debería aumentar el número de casos graves y leves para poder confirmar esta tendencia de riesgo del alelo G del SNP-2871A>G del gen TLR9 con la gravedad de la infección.

En conclusión, en este estudio no encontramos una asociación entre la presencia de uno de los alelos del SNP -2871A>G del gen TLR9 con una evolución más grave de la infección por VRS en un grupo de lactantes chilenos.

## REFERENCIAS

1. Tregoning J, Schwarze J. Respiratory viral infections in infants: causes, clinical symptoms, symptoms, virology, and immunology. *Clin Microbiol Rev* 2010;23:74-8.
2. Pavia A. Viral infections of the lower respiratory tract: old viruses, new viruses, and the role of diagnosis. *Clin Infect Dis* 2011;52:S284-S289.
3. Avendaño L, Palomino MA, Larrañaga C. Surveillance for respiratory syncytial virus in infants hospitalized for acute lower respiratory infection in Chile (1989 to 2000). *J Clin Microbiol* 2003;41:4879-82.
4. Luchsinger V, Escobar C, Avendaño L. Detección de metapneumovirus humano en niños hospitalizados por infección respiratoria aguda baja en Santiago, Chile. *Rev Med Chile* 2005;133:1059-64.
5. Marguet C, Lubrano M, Gueudin M, Le Roux P, Deschildre A, Forget C, *et al.* In Very young infants severity of acute bronchiolitis depends on carried viruses. *PLoS ONE* 2009;4:e4596.
6. Collins P, Graham B. Viral and host factors in Human Respiratory Syncytial Virus pathogenesis. *J Virol* 2008;82:2040-55.
7. Kennedy JL, Turner RB, Braciale T, Heymann PW, Borish L. Pathogenesis of rhinovirus infection. *Curr Opin Virol* 2012;2:87-93.
8. Shay DK, Holman RC, Newman RD, Liu LL, J. Stout JW, Anderson LJ. Bronchiolitis associated hospitalizations among US children, 1980-1996. *JAMA* 1999; 282:1440-6.
9. Thomsen SF, Stensballe L, Skytthe A, Kyvik KO, Backer V, Bisgaard H. Increased concordance of severe respiratory syncytial virus infection in identical twins. *Pediatrics* 2008;121:493-496.
10. Miyairi I, DeVincenzo JP. Human Genetic Factors and Respiratory Syncytial Virus Disease Severity. *Clin Microbiol Rev* 2008;21:686-703.

11. Löfgren, J, Ramet M, Renko M, Marttila R, Hallman M. Association between surfactant protein A gene locus and severe respiratory syncytial virus infection in infants. *J Infect Dis* 2002;185:283–9.
12. Ramet M, Hallman M. Surfactant protein D gene polymorphism associated with severe respiratory syncytial virus infection. *Pediatr Res* 2002;51:696–9.
13. Ampuero S, Luchsinger V, Tapia L, Palomino MA, Larrañaga CE. SP-A1, SP-A2 and SP-D gene polymorphisms in severe acute respiratory syncytial infection in Chilean infants. *Infect Genet Evol* 2011;11:1368–77.
14. Tal G, Mandelberg A, Dalal I, Cesar K, Somekh E, Tal A, *et al.* Association between common Toll-like receptor 4 mutations and severe respiratory syncytial virus disease. *J Infect Dis* 2004;189:2057–63.
15. Puthothu, B, Forster J, Heinzmann A, Krueger M. TLR-4 and CD14 polymorphisms in respiratory syncytial virus associated disease. *Dis Markers* 2006;22:303–8.
16. Paulus SC, Hirschfeld AF, Victor RE, Brunstein J, Thomas E, Turvey SE. Common human Toll-like receptor 4 polymorphisms—role in susceptibility to respiratory syncytial virus infection and functional immunological relevance. *Clin Immunol* 2007;123:252–7.
17. Thompson AJ, Locarnini SA. Toll-like receptors, RIG-I-like RNA helicases and the antiviral innate immune response *Immunol Cell Biol* 2007;85:435–45.
18. Kurt-Jones E A, Popova L, Kwinn L, Haynes LM, Jones LP, Tripp RA *et al.* Pattern recognition receptors TLR4 and CD14 mediate response to respiratory syncytial virus. *Nat Immunol* 2000;1:398–401.
19. Mailaparambil B, Krueger M, Heinze J, Forster J, Heinzmann A. Polymorphisms of toll like receptors in the genetics of severe RSV associated diseases. *Dis Markers* 2008;25:59–65.
20. Kormann MS, Depner M, Hartl D, Klopp N, Illig T, Adamski J *et al.* Toll-like receptor heterodimer variants protect from childhood asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2008;122:86–92
21. Larrañaga C, Ampuero S, Luchsinger V, Carrión F, Aguilar N, Morales P *et al.* Impaired immune response in severe human lower tract respiratory infection by respiratory syncytial virus. *Pediatr Infect Dis J* 2009;28:867–73.
22. Dubdridge F. Likelihood-based association analysis for nuclear families and unrelated subjects with missing genotype data. *Hum Hered* 2008;66:87–98.
23. Consultado en: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp\\_ref.cgi?rs=187084](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ref.cgi?rs=187084)

#### CORRESPONDENCIA



Dra. Sandra Ampuero Llanos  
 Programa de Virología, Instituto de Ciencias Biomédicas  
 Facultad de Medicina, Universidad de Chile  
 Av. Independencia 1027, Santiago  
 Fono: 2978 6961  
 E-mail: sampuero@med.uchile.cl