

## Vacuna frente al virus respiratorio sincitial

JAVIER DÍEZ Y VICTORIA PLANELLES

Centro Superior de Investigación en Salud Pública (CSISP). Valencia. España.

diez\_jav@gva.es; planelles\_viccan@gva.es

### Puntos clave

- El virus respiratorio sincitial (VRS) infecta a casi la totalidad de los niños en los primeros 2 años de vida, siendo el agente causal de infección del tracto respiratorio inferior más frecuente en el primer año de vida.
- El desarrollo de las vacunas frente a este virus tiene una gran limitación con la edad a la que se requiere vacunar, antes de los 2 meses de vida, donde puede haber interferencia con los anticuerpos maternos y hay inmadurez del sistema inmunitario.
- La primera vacuna frente al VRS, desarrollada en los años 1960, estaba inactivada con formol y provocó enfermedad más grave en los niños vacunados que en el grupo placebo.
- Para la vacunación del lactante se están desarrollando vacunas que simulan la infección natural, mediante la administración intranasal de virus vivos atenuados. En la actualidad la vacuna con virus quiméricos de parainfluenza bovino que expresa antígenos de VRS humanos está en desarrollo clínico.
- La protección del adulto requiere vacunas que eleven los anticuerpos neutralizantes. Se están desarrollando vacunas de subunidades de las glucoproteínas F y G que estimulan la formación de estos anticuerpos, pero que caen rápidamente con el tiempo, lo que requiere dosis repetidas anuales para su mantenimiento.
- Es probable que la vacunación de la población requiera la coexistencia de 2 tipos distintos de vacuna, una para el lactante y otra para el niño mayor y el adulto.



## Introducción

Las primeras vacunas frente al virus respiratorio sincitial (VRS) comenzaron a desarrollarse hace casi 4 décadas, y todavía estamos lejos de una vacuna de utilización sistemática en los niños. ¿Qué hace esta vacuna tan difícil de obtener? Hay limitaciones inherentes a la relación del virus con el ser humano y otras relacionadas con la dificultad en la experimentación, como por ejemplo que no hay modelos animales que permitan reproducir exactamente la infección en humanos<sup>1,2</sup>.

Prácticamente todos los niños han tenido al menos una infección por VRS a los 2 años de vida<sup>3</sup>. Las reinfecciones posteriores son frecuentes si bien se comportan como catarros de vías altas. En los últimos años este agente también se ha descrito como etiología de las neumonías y mortalidad en el adulto<sup>4</sup>. Las infecciones se producen en los meses de otoño o invierno y en temporadas puede alcanzar la primavera. Se desconoce el porqué de esta presentación estacional<sup>5</sup>.

El VRS es el agente etiológico más frecuente en las infecciones de vías bajas en lactantes y niños en todo el mundo. Incluso se ha llegado a relacionar con más del 20% de las neumonías con condensación alveolar<sup>6</sup>.

Clásicamente se ha descrito como el agente etiológico más frecuente de las bronquiolitis en el lactante y también de las neumonías en este grupo de edad. Se considera el patógeno que con más frecuencia provoca enfermedad en el lactante que condiciona hospitalización<sup>7</sup>. El impacto real de la infección por VRS es desconocido ya que continuamente se aprecia mayor número de infecciones en los niños, e incluso en adultos, por este virus<sup>5</sup>. Además hay una posible relación entre asma e infección por VRS en el primer año de vida que está todavía pendiente de aclarar definitivamente, lo que incrementaría el impacto de la infección sobre la sociedad<sup>8</sup>. En la Comunidad Valenciana los ingresos por bronquiolitis suponen 40,2 casos por 1.000 niños menores de un año, siendo aproximadamente el 70% de ellas producidas por VRS<sup>7</sup>.

La infección nosocomial es frecuente<sup>9</sup>. Las epidemias por VRS pueden coincidir en el tiempo con las epidemias de gripe y de rotavirus, donde la presión de hospitalización infantil es mayor. El VRS se transmite por medio de secreciones respiratorias y puede sobrevivir en fómites hasta 12 h.

Entre los factores de riesgo de presentar una infección grave por VRS se encuentra el ser varón, el hacinamiento (2 o más niños en la misma habitación), el ser fumador pasivo y es parcialmente protector el estar alimentado con lactancia materna. Además los grandes niños pretérmino, los niños con cardiopatías severas (especialmente las complicadas con hipertensión pulmonar) y los niños con enfermedad pulmonar crónica, como la displasia broncopulmonar, están también en mayor riesgo de presentar una infección grave y tener necesidad de cuidados intensivos<sup>10</sup>.

## Agente causal

El VRS es un miembro de la familia *Paramyxoviridae*. Posee una hebra simple de ARN no segmentado, que codifica 10 proteínas virales. En su superficie tiene 3 glucoproteínas,

la F o proteína de fusión, la G y la SH (*small hydrophobic*). Presenta otras 5 proteínas estructurales de las cuales dos son proteínas de la matriz, M1 y M2, y 3 proteínas asociadas con la nucleocápside, N, P y L. Además tiene 2 proteínas no estructurales (NS1 y NS2).

La proteína F (de fusión) es responsable de la penetración del virus en la célula y de su diseminación célula a célula por fusión de las membranas celulares. La G es la proteína más grande de la envoltura viral y responsable de la adherencia viral a la célula.

Existen 2 grupos antigénicos de VRS, el A y el B, condicionados por cambios en las glucoproteínas F y G. El grupo más prevalente y que produce enfermedad más grave es el A. La proteína G tolera bien las mutaciones sin perder la función.

## Respuesta del huésped a la infección por virus respiratorio sincitial

La respuesta inmunitaria a la infección por VRS depende de la respuesta innata y de la activación de la inmunidad específica, tanto humoral como celular<sup>11,12</sup>. La importancia del análisis de la respuesta del huésped a la infección por VRS quedó demostrada con el resultado del ensayo con la vacuna de virus inactivados en formol. Los niños aquí vacunados tuvieron una respuesta inefectiva a la vacuna y desarrollaron una respuesta más grave a la infección natural.

— *Inmunidad innata*. Las células del epitelio respiratorio, que son las células diana del VRS, se comportan también como una primera línea de defensa. Cuando se infectan secretan opsoninas, colectinas y citocinas que inician la quimiotaxis de neutrófilos, CD4+ T *helper* y eosinófilos. También localmente hay macrófagos con una función primordial en la defensa como es la regulación de la respuesta inmunitaria. Entre las colectinas es primordial el surfactante A, que tiene una función de lavado del VRS.

— *Inmunidad celular*. Es un componente primordial en la defensa frente al VRS de forma que los sujetos con defectos en la inmunidad celular presentan formas de infección graves, con proliferación viral prolongada en el tracto respiratorio y neumonías progresivas, sin existir un componente de broncoconstricción. Por ello se sospecha que la respuesta celular interviene en la finalización de la infección, así como puede contribuir al desarrollo de asma tras la infección.

— *Inmunidad humoral*. No parece que la respuesta humoral influya sobre el curso de la primoinfección una vez se ha establecido, sin embargo hay pruebas concluyentes de que la protección para sucesivas infecciones está mediada por anticuerpos<sup>12</sup>. La administración profiláctica de anticuerpos monoclonales, administrados a los niños con alto riesgo de enfermedad grave, disminuye las posibilidades de padecer una bronquiolitis grave. Sin embargo no todos los tipos de respuesta humoral son beneficiosos, así la presencia de inmunoglobulina (Ig) E específica frente a VRS se asocia a enfermedad grave y posterior broncoconstricción.

### Variabilidad en la respuesta del huésped

No está claro el porqué unos niños presentan enfermedad más grave que otros. Hay variaciones genéticas que influyen sobre el comportamiento ante distintas infecciones<sup>12</sup>. En el caso del VRS se está estudiando intensamente, y parece que una variante genética en el locus de la interleucina 8 (IL-8) se acompaña de mayor susceptibilidad. Recientemente se ha asociado la gravedad de la infección con la carga viral en vías superiores<sup>13</sup>.

## Vacunas frente al virus respiratorio sincitial

Una vacuna frente al VRS debería prevenir las infecciones graves de vías bajas en los sujetos de riesgo. La población diana sería los lactantes y los ancianos, aunque los niños preescolares también podrían beneficiarse de la vacunación. Es posible que un programa de vacunación completo deba incluir diversos grupos de edad, de forma que los mayores podrían vacunarse con vacunas inactivadas y los lactantes podrían requerir vacunas vivas atenuadas.

La infección por VRS es posiblemente la que mayor impacto tiene en la sociedad, tanto desarrolladas como en vías de desarrollo. Ello hace que la prevención de esta infección sea prioritaria. Sin embargo, a pesar de la necesidad de desarrollar esta vacuna y de los esfuerzos que se hacen para conseguirlo, está todavía lejana.

La necesidad de vacunar a los lactantes muy pequeños es un punto crítico en el desarrollo. El pico de infección grave se encuentra entre las 6 y las 8 semanas de vida. En este momento los lactantes son inmunológicamente inmaduros y las IgG maternas transmitidas transplacentariamente suprimen la respuesta primaria de anticuerpos. La anatomía pulmonar del lactante es también un factor limitante ya que la elevada presión de las vías aéreas de los neonatos los hacen candidatos de una obstrucción espiratoria de la vía aérea, por lo tanto para el análisis de la seguridad en humanos de las vacunas candidatas debe hacerse primero estudios muy cuidadosos en adultos sanos, progresando a los niños con anticuerpos frente al VRS, posteriormente a lactantes con anticuerpos para finalizar en niños y lactante *naïve*. Esta estrategia es compleja y requiere un gran esfuerzo de investigación por grupos expertos<sup>1,3,10</sup>.

El grupo diana más importante para vacunar sería el lactante en el primer mes de vida y también el anciano. Cualquier vacuna candidata puede no ser óptima para todo el programa de vacunación ya que, por ejemplo, se ha visto que los virus vivos atenuados pueden replicar intensamente en el lactante, incluso provocar enfermedad, sin embargo en el adulto puede no ser siquiera inmune.

La vacunación del recién nacido es difícil dada su inmadurez inmunológica lo que llevaría al uso de múltiples dosis en las primeras semanas de vida. Además los anticuerpos maternos inhiben la respuesta inmunitaria frente al VRS. Dado que la seguridad en este grupo de edad es motivo de preocupación los estudios que deben realizarse antes de la comercialización serán importantes<sup>1,2</sup>.

La inmunidad de mucosa a la infección por VRS es incompleta y de corta duración. De hecho se ha demostrado que adultos con infección reciente por VRS pueden reinfectarse de forma seriada, por lo que la protección de vías altas es poco realista y el objetivo debe ser la protección de vías ba-

jas ya que la infección natural del lactante lo que protege es frente a la enfermedad de vías bajas.

Sin embargo, para obtener una vacuna realmente eficiente, sobre todo en lactantes y niños, se requiere que disminuya la transmisión viral mediante el estímulo de la inmunidad de las mucosas. De esta forma se obtendrá el efecto comunitario de la vacuna del que se beneficiarán grupos de edad no vacunados. En un modelo matemático recientemente publicado se demuestra que el impacto sobre la sociedad de un programa de vacunación infantil con una vacuna sin efecto comunitario apenas reduce el número de hospitalizaciones en los lactantes, pero la gran circulación viral no protege a otros grupos de edad por lo que los estudios farmacoeconómicos es muy posible que no sean coste-efectivos.

La vacuna además debería proteger frente a los 2 subgrupos de VRS, el A y el B, que se diferencian en la estructura de la proteína glucosilada G de superficie de membrana cuya acción es la unión del virus a la célula huésped. El organismo produce anticuerpos neutralizantes dirigidos frente a esta proteína.

Dadas las características del lactante pequeño se ha planteado la posibilidad de recurrir a la vacunación materna durante el tercer trimestre del embarazo. Esta aproximación tiene sus limitaciones en los ensayos clínicos con embarazadas, la ética y las posibles repercusiones en caso de teratogenicidad.

### Vacuna frente al virus respiratorio sincitial inactivada con formol

Esta vacuna se comenzó a ensayar en los años 60, cuando otras vacunas inactivadas como la del virus de la polio o de *Bordetella pertussis* estaban dando resultados extraordinarios en salud pública. Se administró en lactantes a partir de los 2 meses y en niños hasta los 7 años por vía intramuscular y en dosis repetidas.

Esta vacuna marcó el desarrollo de nuevas vacunas frente al VRS ya que los sujetos vacunados tuvieron más enfermedad y de mayor gravedad que el grupo control. Permitió conocer que la respuesta inmunitaria frente al VRS es distinta a la que ocurre tras la infección, por ejemplo, del virus de la gripe<sup>3,10</sup>.

No está totalmente esclarecido el porqué esta vacuna fue más perjudicial. Parece que la producción de anticuerpos neutralizantes fue insuficiente y con poca respuesta inmunitaria local. Además estimularía distintas vías inmunológicas que darían lugar a la producción local de interleucinas en el momento de la infección natural lo que produciría una inflamación pulmonar y broncoconstricción.

Se puso de manifiesto que una vacuna para el lactante debería producir anticuerpos neutralizantes séricos, linfocitos T citotóxicos CD8+ específicos para el VRS y un patrón de respuesta de linfocitos CD4 similar al que provoca el virus salvaje<sup>2,3,10</sup>.

### Vacunas de subunidades de glucoproteínas F y G

El objetivo de estas vacunas sería el de inducir anticuerpos neutralizantes que protejan, fundamentalmente, de la infección del tracto respiratorio inferior<sup>14</sup>. Su población diana serían los adultos en riesgo, principalmente los mayores de 65 años, los niños en riesgo de infección grave y que ya han tenido una infección previa por VRS y la mujer embarazada. Estaría contraindicada en lactantes seronegativos ya que en modelos animales se ha demostrado una respuesta similar a la obtenida con la vacuna inactivada con formol de forma

que pondría al lactante en mayor riesgo de enfermedad grave de vías respiratorias inferiores.

Se han realizado ya algunos ensayos clínicos con distintas vacunas de subunidades: varias vacunas contienen una glucoproteína F purificada, llamada PFP, de forma que a las vacunas se las denominó PFP-1, PFP-2 y PFP-3<sup>3,10,15,17</sup>. La PFP-2 se ha administrado en ensayos clínicos fase I a 35 mujeres embarazadas<sup>18</sup>. La vacuna fue segura, bien tolerada por las madres y sin repercusión para el feto, sin embargo la vacuna fue poco inmunógena, con escasa producción de anticuerpos neutralizantes por lo que no cabría esperarse una protección adecuada para el recién nacido. En el seguimiento de estos niños, no se observó mayor incidencia de enfermedad grave.

La PFP-3, ensayada en niños con fibrosis quística y con anticuerpos frente al VRS, es decir, que habían pasado al menos una infección por este virus, se mostró como segura y si bien provocó una seroconversión frente a la proteína F, no protegió de la infección<sup>19,20</sup>.

En adultos se ha probado la administración intramuscular de una vacuna que contiene proteínas F, G y M purificadas. La seguridad de la vacuna fue adecuada. Se produjo una elevación significativa de anticuerpos neutralizantes pero disminuyeron rápidamente con el tiempo, de forma que sería necesario administrar dosis anuales para mantener valores de anticuerpos protectores<sup>21</sup>.

También se han desarrollado vacunas basadas en la glucoproteína G pero no cumplieron los criterios de seguridad requeridos, por lo que se paró su desarrollo clínico<sup>3,10</sup>.

En resumen, las vacunas de subunidades han mostrado resultados dispares, encontrándose estancado su desarrollo bien por problemas de seguridad o de mantenimiento de la protección inmunológica.

### Vacunas vivas atenuadas

Estas vacunas se están desarrollando para su administración tópica por vía nasal, para replicar la infección natural sin producir enfermedad. Una vacuna viva atenuada óptima debería ser segura, no provocar irritación clínica del aparato respiratorio y proteger tanto de la infección local como de la de vías respiratorias inferiores. En caso de que a pesar de la vacuna el niño se infecte, el resultado no debe ser de procesos de mayor gravedad que la infección natural en niños no vacunados. Además, se deberán administrar a niños pequeños, por lo que no debería haber interferencia con los anticuerpos maternos<sup>3</sup>.

A final de los años 1960 se utilizaron varias vacunas termosensibles, es decir, que no replicaban a temperaturas altas, con lo que se impedía la replicación pulmonar. Hubo varios modelos de vacunas que no llegaron a buen fin por dar respuestas inmunitarias muy variables, sin embargo sí demostraron que los niños vacunados con esta vacuna por vía intranasal no presentaban enfermedad grave cuando se infectaban por el VRS salvaje. Ensayos posteriores con otras vacunas vivas de nueva tecnología también tuvieron problemas por lo que no se llegó al desarrollo para su utilización en lactantes pequeños<sup>2,10</sup>, o bien provocaban gran congestión nasal que influía en el sueño y la alimentación del lactante<sup>2</sup>.

Recientemente se han desarrollado vacunas de virus vivos mediante ingeniería genética. Esta técnica permite introducir mutaciones en el genoma del VRS y analizar cómo influyen estas mutaciones en la atenuación del virus.

Han sido varias las aproximaciones a la obtención de vacunas atenuadas mediante ingeniería genética y se han probado algunas de ellas en seres humanos con resultados dispares. Dependiendo del gen modificado se han obtenido diversos grados de atenuación. Entre las vacunas probadas la que podría tener mayor importancia clínica es la que incluye virus con mutación 1030 ya que en estudios preliminares en lactantes seronegativos indujo una menor replicación del virus tras la segunda dosis si bien no hubo respuesta de anticuerpos séricos ni en la mucosa<sup>3,10</sup>.

Actualmente están en desarrollo vacunas que utilizan virus quiméricos<sup>21,22</sup>. Una de éstas, llamada MEDI-534, utiliza un virus Parainfluenzae-3 en el que se incluyen segmentos genéticos para que exprese las proteínas F y G del VRS, de forma que podría proteger frente a ambos virus el Parainfluenzae-3 y VRS<sup>24</sup>. Se trata de una vacuna congelada, para administración por vía intranasal. En los ensayos clínicos fase I sobre niños de 1 a 9 años se ha visto que es muy segura, con una reactogenicidad similar a la del placebo, y que no induce la excreción de virus mutados genéticamente<sup>25</sup>. Sin embargo, la inmunogenicidad es pobre. En la actualidad, según se describe en la base de datos clinicaltrials.gov [acceso 1 septiembre 2010], se están llevando a cabo 2 ensayos clínicos en niños a partir de 6 meses para evaluar la seguridad, tolerabilidad, inmunogenicidad y excreción de virus virales.

El futuro de la vacunación frente al VRS posiblemente requiera 2 tipos de vacunas, según las distintas necesidades de la población. Los adultos requerirán vacunas inactivadas, que eleven los anticuerpos neutralizantes, mientras que los lactantes necesitarán también la protección de las mucosas frente a la infección mediante vacunas atenuadas.

Las vacunas en desarrollo deben demostrar una serie de datos, imprescindibles previo a su incorporación al calendario vacunal. Deberán ser vacunas seguras y que protejan de la enfermedad grave desde edades muy tempranas.

Los vacunados, en caso de infección, no tendrán una enfermedad potenciada.

Se debe demostrar la relación entre asma e infección grave por VRS, en caso de que exista, y que la vacuna puede disminuir la incidencia de asma.

Será importante demostrar si las vacunas pueden neutralizar la replicación viral en las mucosas, ya que en estos casos la vacuna podría tener un efecto comunitario, fundamental para estimar el impacto sobre la sociedad<sup>25,26</sup>.

## Bibliografía



● Importante    ●● Muy importante

- Polack FP, Karron RA. The future of respiratory syncytial virus vaccine development. *Pediatr Infect Dis J.* 2004;23 Suppl 1:S65-73.
- Schickli JH, Dubovsky F, Tang RS. Challenges in developing a pediatric RSV vaccine. *Hum Vaccin.* 2009;5:582-91.
- Karron RA. Respiratory syncytial virus and parainfluenza virus vaccines. En: Plotkin S, Oresstein W, Offit P, editores. *Vaccines.* 5th edition. Philadelphia: Saunders-Elsevier; 2008. p. 1283-94.

4. Thomson WW, Shay D, Weintrauts E, Brammer L, Cox N, Anderson L, et al. Mortality associated with influenza and respiratory syncytial Virus in the United States. *JAMA*. 2003;289:179-86.
5. Acedo L, Díez-Domingo J, Moráño JA, Villanueva RJ. Mathematical modelling of respiratory syncytial virus (RSV): vaccination strategies and budget applications. *Epidemiol Infect*. 2010;138:853-60.
6. Wolf DG, Greenberg D, Shemer-Avni Y, Givon-Lavi N, Bar-Ziv J, Dagan R. Association of human metapneumovirus with radiologically diagnosed community-acquired alveolar pneumonia in young children. *J Pediatr*. 2010;156:115-20.
7. Díez-Domingo J, Ridaio-López M, Úbeda-Sansano I, Ballester Sanz A. Incidencia y costes de la hospitalización por bronquiolitis de las infecciones por virus respiratorio sincitial en la Comunidad Valenciana. Años 2001 y 2002. *An Pediatr*. 2006;65:325-30.
8. Pérez-Yarza EG, Moreno A, Lázaro P, Mejías A, Ramilo O. The association between respiratory syncytial virus infection and the development of childhood asthma: a systematic review of the literature. *Pediatr Infect Dis J*. 2007;26:733-9.
9. Breese Hall C. Nosocomial respiratory syncytial virus infections: the cold war has not ended. *CID*. 2002;31:590-6.
10. ● ● Picazo JJ, González Romo F. **Virus respiratorio sincitial**. En: **Comité Asesor de Vacunas de la Asociación Española de Pediatría**. 4.ª edición. **Manual de vacunas en pediatría 2008**. Madrid: Boan; 2008. p. 746-54.
11. Graham BS. Pathogenesis of respiratory syncytial virus vaccine-augmented pathology. *Am J Respir Crit Care Med*. 1995;152(4 Pt 2):S63-6.
14. Paradiso PR, Hildreth SW, Hogerman DA, Speelman DJ, Lewin EB, Oren J, et al. Safety and immunogenicity of a subunit respiratory syncytial virus vaccine in children 24 to 48 months old. *Pediatr Infect Dis J*. 1994;13:792-8.
12. Hacking D, Hull J. Respiratory Syncytial Virus—Viral Biology and the Host Response. *J Infection*. 2002;45:18-24.
13. DeVicenzo JP, Saleeby CM, Bush AJ. Respiratory Syncytial virus load predicts disease severity in previous healthy infants. *JID*. 2005;191:1861-8.
15. Tristram DA, Welliver RC, Mohar CK, Hogerman DA, Hildreth SW, Paradiso P. Immunogenicity and safety of respiratory syncytial virus subunit vaccine in seropositive children 18-36 months old. *J Infect Dis*. 1993;167:191-5.
16. Langley JM, Sales V, McGeer A, Guasparini R, Predy G, Meekison W, et al. A dose-ranging study of a subunit Respiratory Syncytial Virus subtype A vaccine with and without aluminum phosphate adjuvantation in adults > or =65 years of age. *Vaccine*. 2009;27:5913-9.
17. Falsey AR, Walsh EE, Capellan J, Gravenstein S, Zambon M, Yau E, et al. Comparison of the safety and immunogenicity of 2 respiratory syncytial virus (rsv) vaccines--nonadjuvanted vaccine or vaccine adjuvanted with alum--given concomitantly with influenza vaccine to high-risk elderly individuals. *J Infect Dis*. 2008;198:1317-26.
18. Munoz FM, Piedra PA, Glezen WP. Safety and immunogenicity of respiratory syncytial virus purified fusion protein-2 vaccine in pregnant women. *Vaccine*. 2003;21:3465-7.
19. Piedra PA, Cron SG, Jewell A, Hamblett N, McBride R, Palacio MA, et al. Purified Fusion Protein Vaccine Study Group. Immunogenicity of a new purified fusion protein vaccine to respiratory syncytial virus: a multi-center trial in children with cystic fibrosis. *Vaccine*. 2003;21:2448-60.
20. Piedra PA, Grace S, Jewell A, Spinelli S, Bunting D, Hogerman DA, Malinoski F, Hiatt PW. Purified fusion protein vaccine protects against lower respiratory tract illness during respiratory syncytial virus season in children with cystic fibrosis. *Pediatr Infect Dis J*. 1996;15:23-31.
21. Tristram DA, Welliver RC, Hogerman DA, Hildreth SW, Paradiso P. Second-year surveillance of recipients of a respiratory syncytial virus (RSV) F protein subunit vaccine, PFP-1: evaluation of antibody persistence and possible disease enhancement. *Vaccine*. 1994;12:551-6.
22. Murphy BR, Hall SL, Kulkarni AB, Crowe JE Jr, Collins PL, Connors M, et al. An update on approaches to the development of respiratory syncytial virus (RSV) and parainfluenza virus type 3 (PIV3) vaccines. *Virus Res*. 1994;32:13-36.
23. Tang RS, Spaete RR, Thompson MW, MacPhail M, Guzzetta JM, Ryan PC, et al. Development of a PIV-vectored RSV vaccine: preclinical evaluation of safety, toxicity, and enhanced disease and initial clinical testing in healthy adults. *Vaccine*. 2008;26:6373-82.
24. Lee MS, Walker RE, Mendelman PM. Medical burden of respiratory syncytial virus and parainfluenza virus type 3 infection among US children. Implications for design of vaccine trials. *Hum Vaccin*. 2005;1:6-11.
25. Gomez M, Mufson M, Dubovsky F, Knightly C, Zeng W, Losonsky G. Phase-I Study Medi-534, of A Live, attenuated intranasal vaccine against respiratory syncytial virus and parainfluenza-3 virus in seropositive children. *Pediatr Infect Dis J*. 2009;28:655-8.
26. Acedo L, Moráño JA, Díez-Domingo J. Cost analysis of a vaccination strategy for respiratory syncytial virus (RSV) in a network model. *Mathematical and Computer Modelling*. 2010;52:1016-22.