

# Caracterización genética molecular del virus sincitial respiratorio humano en Cuba

REPORTE

✉ Odalys Valdés<sup>1</sup>, Clara Savón<sup>1</sup>, Ángel Goyenechea<sup>1</sup>, Lidice Palerm<sup>1</sup>, Grehete González<sup>1</sup>, Guelsys González<sup>1</sup>, José A Melero<sup>2</sup>, Isidoro Martínez<sup>2</sup>, Pilar Pérez<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí" (IPK)  
Autopista Novia del Mediodía Km. 6 e/ Carretera Central y Autopista Nacional  
AP 601, CP 13, Marianao, Ciudad de La Habana, Cuba  
Fax: 53 -7 204 6051; E-mail: odalys@ipk.sld.cu

<sup>2</sup>Instituto de Salud "Carlos III", España

## RESUMEN

Las infecciones respiratorias agudas (IRA) representan uno de los principales problemas de salud entre niños menores de 5 años de los países en desarrollo, y son la cuarta causa de morbilidad de las IRA en Cuba. Se plantea que los virus son los principales agentes causales, aunque el virus sincitial respiratorio humano (VSRH) constituye la causa principal de esta afección. Este virus provoca elevadas morbilidad y mortalidad en lactantes, niños pequeños, ancianos y pacientes inmunodeprimidos. Hasta la fecha no existen vacunas ni medicamentos antivirales eficaces que permitan su control, por lo que es necesario profundizar en la historia natural del virus, su evolución y diseminación en la población. La mayoría de los estudios de caracterización molecular del VSRH se han realizado en países desarrollados, con condiciones geográficas diferentes a las de Cuba, donde hasta el momento no se conocían los genotipos que circulan ni su relación filogenética con los de otras regiones del mundo. Esta investigación constituye la primera de su tipo en Cuba y en el Caribe. Los resultados permitirán hacer una valoración de la estrategia que se debe seguir en el diseño de futuras vacunas contra este agente patógeno. Se estudió la variabilidad genética y se realizó el análisis filogenético de la glicoproteína G de 64 cepas del VSRH, aisladas en muestras clínicas provenientes de niños menores de 1 año en 6 provincias de Cuba desde 1994 hasta 2000. De ellas, 58 pertenecieron al subgrupo antigénico A, y 6, al subgrupo B. Dentro del subgrupo A se detectaron 5 genotipos: genotipo antiguo, GA1, GA2, GA3 y GA5. Es importante destacar que las cepas del genotipo antiguo se agruparon filogenéticamente con una cepa antigua, la cepa prototipo Long, aislada en 1956. Este genotipo no se ha detectado de nuevo desde la fecha de su aislamiento. La circulación de cepas con genotipo antiguo fue un hallazgo particular en las cepas cubanas. A diferencia de lo ocurrido con las cepas del subgrupo A, las del subgrupo B se encuentran muy distantes de las cepas antiguas y se detectaron 2 genotipos: SAB1 y SAB3. Las cepas de ambos genotipos se agruparon con cepas que han circulado solo en Sudáfrica durante el mismo período.

## Introducción

El virus sincitial respiratorio humano (VSRH) es uno de los agentes patógenos más importantes de la infección en el tracto respiratorio de los niños pequeños [1-3]. Además, se ha visto que este virus produce infecciones respiratorias graves en ancianos y en pacientes inmunocomprometidos [4-6]. Su distribución es mundial, y las epidemias ocurren anualmente, durante los meses de invierno en los países de clima templado y durante las estaciones de lluvia en los países de clima tropical [7]. Sin embargo, se conoce muy poco acerca de la infección que causa en países subdesarrollados, en los cuales el patrón epidemiológico del virus pudiera seguir un comportamiento diferente.

Dos subgrupos antigénicos, A y B, se han identificado según su reacción frente a un panel de anticuerpos monoclonales [8]. Esta clasificación se confirmó luego, por análisis de la secuencia nucleotídica. Se plantea que durante una epidemia ambos subgrupos pueden circular simultáneamente; sin embargo, se ha identificado el subgrupo A más frecuentemente que el subgrupo B [9]. En cada epidemia también se ha observado la circulación de múltiples genotipos en cada subgrupo, con un reemplazamiento del genotipo predominante cada año [10].

Los estudios de variabilidad genética se han centrado en la glicoproteína G, debido a su propiedad de diferenciar cepas que pudieran ser idénticas en otros productos génicos. Varios investigadores han planteado

que existen cepas muy similares genéticamente, las cuales pueden circular en diferentes partes del mundo durante el mismo período. También se ha visto que hay virus aislados en lugares geográficamente distantes y en diferentes años, que pueden estar más relacionados genéticamente que otros virus aislados en un mismo lugar durante dos días consecutivos [11].

La glicoproteína G es el principal componente en la respuesta inmune protectora del virus, en la cual se presentan muchas sustituciones nucleotídicas que provocan cambios aminoacídicos. Estos cambios dan lugar a alteraciones en los epítomos y, por tanto, permiten que el virus escape de la inmunidad preexistente [12].

El VSRH presenta dos características importantes que se deben tener en cuenta para el desarrollo de una vacuna: en primer lugar, es capaz de infectar a niños en presencia de anticuerpos maternos, y en segundo lugar, causa infecciones repetidas a lo largo de la vida. La facultad de este virus de causar reinfecciones, pudiera deberse a una respuesta inmune inadecuada o a su variabilidad [13].

Por ello, a partir de la glicoproteína G del VSRH, se realizaron estudios de variabilidad genética en virus que se han detectado en 6 provincias de Cuba desde 1994 hasta el año 2000. Con estos estudios se obtendría información acerca de los genotipos que circulan en nuestro país y su relación filogenética con los que circulan en el mundo. Además, permitirán profundizar

1. Fisher RG, Gruber WC, Edwards KM, Reed GW, Tollefson SJ, Thompson JM, Wright PF. Twenty years of outpatient respiratory syncytial virus infection: a framework for vaccine efficacy trials. *Pediatrics* 1997;99:E7.

2. Boyce TG, Mellen BG, Mitchel EF, Jr Wright PF, Griffin MR. Rates of hospitalization for respiratory syncytial virus infection among children in medicaid. *J Pediatr* 2000;137:865-70.

3. Shay DK, Holman RC, Roosevelt GE, Clarke MJ, Anderson LJ. Bronchiolitis-associated mortality and estimates of respiratory syncytial virus-associated deaths among US children, 1979-1997. *J Infect Dis* 2001;183:16-22.

4. Falsey AR. Respiratory syncytial virus infection in older persons. *Vaccine* 1998; 16:1775-8.

5. McBride JT. Pulmonary function changes in children after respiratory syncytial virus infection in infancy. *J Pediatr* 1999;135:28-32.

6. Falsey AR, Walsh EE. Respiratory syncytial virus infection in adults. *Clin Microbiol Rev* 2000;13:371-84.

7. Zlateva KT, Lemey P, Vandamme AM, Van Ranst M. Molecular evolution and circulation patterns of human respiratory syncytial virus subgroup a: positively selected sites in the attachment G glycoprotein. *J Virol* 2004;78:4675-83.

✉ Autor de correspondencia

en el conocimiento de esta proteína, la cual es uno de los antígenos inductores de la respuesta inmune protectora, con el objetivo de contribuir al desarrollo de futuras vacunas.

## Materiales y métodos

Para examinar la epidemiología molecular y los patrones evolutivos de la glicoproteína G del VSRH se analizaron 64 cepas, aisladas en el Laboratorio Nacional de Referencia de Virus Respiratorios del Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourf", desde 1994 hasta 2000. Estas cepas se obtuvieron a partir de muestras clínicas provenientes de niños menores de un año, ingresados en las salas de enfermedades respiratorias con diagnóstico clínico de IRA baja, de posible causa viral, los cuales eran atendidos en hospitales pediátricos de la Ciudad de La Habana (de Centro Habana, "William Soler" y del Cerro) y hospitales provinciales (Sancti Spiritus, Cienfuegos, Holguín, Las Tunas y Santiago de Cuba). Las cepas se muestran en la tabla 1.

### Extracción de ARN

Se realizó la extracción de ARNv de las cepas controles (Long y CH18537) y de las cepas obtenidas en el laboratorio por el método del trizol (Invitrogen),

siguiendo las instrucciones del fabricante. Se tomó un volumen inicial de 500 mL. La mezcla se centrifugó a 12 000 rpm durante 15 minutos a 4 °C, se eliminó el sobrenadante, y el precipitado se resuspendió en 500 mL de trizol; luego, se incubó 5 minutos a temperatura ambiente. A continuación se añadieron 100 µL de cloroformo, se agitó fuertemente, se incubó 3 minutos a temperatura ambiente, se centrifugó en igualdad de condiciones y se transfirió la fase superior a otro microtubo de ensayo. Después, se añadieron 400 µL de isopropanol, se mezcló mediante agitación manual y se incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente, la mezcla se centrifugó durante 15 minutos con las mismas condiciones mencionadas antes. El ARN se lavó con 500 µL de etanol al 75%, se centrifugó 15 minutos en condiciones iguales, se eliminó el sobrenadante, se secó el ARN en el gabinete de seguridad y fue resuspendido en 30 µL de agua estéril, libre de ribonucleasa (RNasa).

### Transcripción reversa y reacción en cadena de la polimerasa

Para la transcripción reversa (TR) y el primer paso de amplificación, se añadieron a la mezcla de reacción 10 µL del ARN extraído. En la mezcla se emplearon

8. Anderson LJ, Hierholzer JC, Tsou C, Hendry RM, Fernie BF, Stone Y, McIntosh K. Antigenic characterization of respiratory syncytial virus strains with monoclonal antibodies. *J Infect Dis* 1985;151:626-33.

9. Cane PA, Matthews DA, Pringle CR. Identification of variable domains of the attachment (G) protein of subgroup A respiratory syncytial viruses. *J Gen Virol* 1991;72(9):2091-6.

10. Cane PA, Pringle CR. Molecular epidemiology of respiratory syncytial virus: a review of the use of reverse transcription-polymerase chain reaction in the analysis of genetic variability. *Electrophoresis* 1995;16:329-33.

11. Melero JA, Garcia-Barreno B, Martinez I, Pringle CR, Cane PA. Antigenic structure, evolution and immunobiology of human respiratory syncytial virus attachment (G) protein. *J Gen Virol* 1997;78(10):2411-8.

12. Sullender WM. Respiratory syncytial virus genetic and antigenic diversity [table of contents]. *Clin Microbiol Rev* 2000; 13:1-15.

13. Morrison WI, Taylor G, Gaddum RM, Ellis SA. Contribution of advances in immunology to vaccine development. *Adv Vet Med* 1999;41:181-95.

Tabla 1. Nomenclatura, fecha de aislamiento y procedencia de las cepas

Cepas	Fecha de aislamiento	Origen	Cepas	Fecha de aislamiento	Origen
CHab52/94	1994	C. Habana	CHab114/97	1997	C. Habana
CHab54/94	1994	C. Habana	CHab125/97	1997	C. Habana
CHab60/94	1994	C. Habana	Tun135/97	1997	Las Tunas
CHab67/94	1994	C. Habana	Tun141/97	1997	Las Tunas
CHab69/94	1994	C. Habana	Tun145/97	1997	Las Tunas
CHab81/94	1994	C. Habana	CHab223/98	1998	C. Habana
CHab82/94	1994	C. Habana	CHab181/98	1998	C. Habana
CHab83/94	1994	C. Habana	CHab185/98	1998	C. Habana
CHab97/94	1994	C. Habana	CHab197/98	1998	C. Habana
CHab105/94	1994	C. Habana	CHab198/98	1998	C. Habana
CHab106/94	1994	C. Habana	Cfgo226/98	1998	Cienfuegos
CHab107/94	1994	C. Habana	Cfgo227/98	1998	Cienfuegos
CHab111/94	1994	C. Habana	Cfgo228/98	1998	Cienfuegos
CHab115/94	1994	C. Habana	Cfgo232/98	1998	Cienfuegos
CHab128/94	1994	C. Habana	CHab236/98	1998	C. Habana
CHab134/94	1994	C. Habana	CHab237/98	1998	C. Habana
CHab140/94	1994	C. Habana	CHab239/98	1998	C. Habana
CHab141/94	1994	C. Habana	CHab240/98	1998	C. Habana
CHab151/94	1994	C. Habana	Tun244/98	1998	Las Tunas
Hol167/95	1995	Holguín	Tun245/98	1998	Las Tunas
Hol168/95	1995	Holguín	SC93/99	1999	S. de Cuba
CHab5/95	1995	C. Habana	SC94/99	1999	S. de Cuba
CHab8/95	1995	C. Habana	CHab33/00	2000	C. Habana
CHab10/95	1995	C. Habana	CHab34/00	2000	C. Habana
CHab11/95	1995	C. Habana	CHab37/00	2000	C. Habana
CHab104/96	1996	C. Habana	CHab42/00	2000	C. Habana
CHab195/96	1996	C. Habana	CHab43/00	2000	C. Habana
CHab201/96	1996	C. Habana	Tun50/00	2000	Las Tunas
CHab220/96	1996	C. Habana	Tun53/00	2000	Las Tunas
CHab91/97	1997	C. Habana	Tun57/00	2000	Las Tunas
CHab102/97	1997	C. Habana	SS64/00	2000	S. Spiritus
CHab123/97	1997	C. Habana	SS65/00	2000	S. Spiritus

10  $\mu\text{L}$  de AMV/Tfl 5X, 1  $\mu\text{L}$  AMV RT (5 U/ $\mu\text{L}$ ), 1  $\mu\text{L}$  de Tfl ADN polimerasa (5 U/ $\mu\text{L}$ ), 6  $\mu\text{L}$  de  $\text{MgSO}_4$  (25 mM), 1  $\mu\text{L}$  de dNTP (10 mM), 1  $\mu\text{L}$  de cada oligonucleótido I<sub>2</sub>G/OF139 (100 ng) y se completó con agua bidestilada estéril libre y el volumen final fue de 50  $\mu\text{L}$ . La mezcla de reacción para la TR y la reacción en cadena de la polimerasa (TR-RCP) se colocó en un termociclador con el programa siguiente: para efectuar la TR, primero se incubó la mezcla de reacción a 65 °C durante 15 minutos y luego a 42 °C durante 45 minutos. La inactivación de esta reacción se efectuó a 94 °C durante 3 minutos. La RCP consistió en 30 ciclos de amplificación (desnaturalización del ADN a 94 °C durante 1 minuto y 30 segundos, la hibridación de los oligonucleótidos con el molde a 50 °C por 1 minuto y 30 segundos, y la elongación de las cadenas a 68 °C por 1 minuto y 30 segundos), seguida por una extensión final a 68 °C durante 5 minutos.

#### Reacción en cadena de la polimerasa anidada

Para la RCP anidada se añadieron 2  $\mu\text{L}$  de la primera RCP a la mezcla de reacción constituida por 0.25  $\mu\text{L}$  de AmpliTaq polimerasa (5 U/ $\mu\text{L}$ ), 5  $\mu\text{L}$  de solución amortiguadora RCP (10 X), 6  $\mu\text{L}$   $\text{MgCl}_2$  (2 mM), 0.8  $\mu\text{L}$  de dNTP (25 mM), 1  $\mu\text{L}$  de cada oligonucleótido interno (100 ng) y agua bidestilada estéril libre de RNasa para un volumen final de 50  $\mu\text{L}$ . La mezcla de la RCP anidada se colocó en el termociclador. Antes de la segunda reacción, el ADN fue desnaturalizado a 95 °C durante 3 minutos y, seguidamente, se efectuaron 30 ciclos de amplificación (desnaturalización a 94 °C por 1 minuto, hibridación a 55 °C por 1 minuto, polimerización a 72 °C por 1 minuto), con una extensión final de 72 °C durante 5 minutos. La mezcla de la RCP anidada se colocó en el mismo termociclador. Antes de la segunda reacción, el ADN fue desnaturalizado a 95 °C durante 3 minutos y seguidamente se efectuaron 30 ciclos de amplificación (desnaturalización a 94 °C por 1 minuto, hibridación a 55 °C por 1 minuto, polimerización a 72 °C por 1 minuto), con una extensión final de 72 °C durante 5 minutos. A las muestras clínicas se les realizó la segunda reacción de amplificación del gen G: los oligonucleótidos utilizados fueron I<sub>2</sub>G-OG316, OG295-OG695 y OG448-G/OF139.

#### Detección del producto amplificado

Una vez concluida la RCP, se tomaron 8  $\mu\text{L}$  de cada uno de los productos de la reacción de amplificación y se mezclaron con 2  $\mu\text{L}$  de solución estabilizadora de muestra 6 X (EDTA 500 mM, glicerol al 10%, azul de bromofenol al 0.01%). Estos productos fueron detectados en geles de agarosa al 1 y 2% en TBE 1 X (Tris 0.089 M, ácido bórico 0.089 M, EDTA 0.002 M) mediante tinción de bromuro de etidio (10 mg/mL). La corrida se realizó a 90 V durante 1 hora, con el empleo del Marker VIII (Promega) como marcador de peso molecular, con un rango entre 100 y 1 500 pares de bases (pb). La visualización de las bandas se realizó por exposición del gel a la luz ultravioleta en un transiluminador. El tamaño del fragmento amplificado para el gen G parcial fue 316 pb, 400 pb, 489 pb, y para el gen G completo fue 1 104 pb.

#### Purificación del producto amplificado

El ADN amplificado por la RCP anidada del gen G se purificó para realizar la secuenciación nucleotídica, según el protocolo descrito en el estuche comercial de secuenciación. Para la purificación, se mezclaron 40  $\mu\text{L}$  del producto amplificado de la RCP anidada, con 40  $\mu\text{L}$  de isopropanol y 8  $\mu\text{L}$  de acetato de amonio 5 M. Esta mezcla se centrifugó a 14 000 rpm durante 10 minutos a 4 °C, se eliminó el sobrenadante cuidadosamente y el precipitado se lavó con 200  $\mu\text{L}$  de etanol al 70%. Se centrifugó nuevamente en igualdad de condiciones. El precipitado se secó y se resuspendió en 10  $\mu\text{L}$  de agua destilada estéril libre de RNasa.

#### Secuenciación nucleotídica automatizada

La secuenciación nucleotídica se realizó con el estuche comercial (Thermo Sequenase Cy5 Dye Terminator Cycle Sequencing Kit, Promega). Para esto, primero se prepararon 4 viales marcados con A, C, G y T. A cada vial se le adicionó la mezcla 1, compuesta por 2  $\mu\text{L}$  de Cy5-ddNTP (ddATP, ddCTP, ddGTP, ddTTP en correspondencia con los viales marcados), 4  $\mu\text{L}$  de dNTP (1.1 mM) y agua bidestilada estéril libre de RNasa. El volumen final fue de 22  $\mu\text{L}$ . Se agitó fuertemente, se le dio un golpe de centrifuga y se almacenó en hielo hasta su uso posterior. Para cada reacción de secuencia se preparó un vial con la mezcla de reacción 2, compuesta por 3.5  $\mu\text{L}$  del producto de RCP purificado, 2  $\mu\text{L}$  de *primer* 4 pmol, 3.5  $\mu\text{L}$  de solución amortiguadora de reacción, 1  $\mu\text{L}$  de la Thermo Sequenase I ADN polimerasa 10 U/ $\mu\text{L}$  y agua bidestilada estéril libre de RNasa. El volumen final fue de 27  $\mu\text{L}$ . Esta se mezcló agitando suavemente. Se prepararon nuevos viales marcados con A, C, G y T, los que se colocaron en hielo. A cada uno se le añadió 2  $\mu\text{L}$  de la mezcla 1, según el tubo marcado. A continuación se añadieron 6  $\mu\text{L}$  de la mezcla 2. Los viales se agitaron, seguido de un golpe de centrifuga. La mezcla de reacción se colocó en el termociclador descrito antes. Se efectuaron 30 ciclos de amplificación (desnaturalización a 95 °C por 30 segundos, hibridación a 60 °C por 30 segundos y extensión a 72 °C por 1 minuto y 20 segundos). Para la secuenciación se utilizaron los oligonucleótidos I<sub>2</sub>G, OG 448, OG 555, G/F20 y OF 139.

#### Purificación del producto de secuencia

El producto secuenciado se purificó según las instrucciones del estuche de secuenciación. Luego se le añadieron 2  $\mu\text{L}$  de acetato de amonio 7.5 M, 2  $\mu\text{L}$  de glicógeno y 30  $\mu\text{L}$  de etanol frío al 100%. Se agitó fuertemente y se incubó toda la noche a -20 °C para precipitar el ADN. Después, se centrifugó a 13 000 rpm durante 30 minutos a 4 °C. El sobrenadante se eliminó cuidadosamente con el empleo de pipetas. El precipitado se lavó con 200  $\mu\text{L}$  de etanol frío al 70% y se centrifugó bajo las mismas condiciones descritas. El sobrenadante se eliminó cuidadosamente, el precipitado se secó al vacío durante 2 a 3 minutos, luego se le añadieron 6  $\mu\text{L}$  de formamida y se resuspendió vigorosamente con agitación. Justo antes de aplicar en el gel, las muestras se calentaron en un bloque térmico a 70 °C durante 3 minutos e, inmediatamente, se colocaron en hielo.

Los productos de la secuenciación se separaron en gel desnaturante de poliacrilamida al 6% y urea 7 M. La polimerización del gel se realizó con luz UV durante 10 minutos, la solución amortiguadora de corrida fue el TBE 0.5 X. La corrida se realizó a 1 500 V durante 8 horas. La lectura de la secuencia se realizó mediante una computadora.

### Métodos empleados para analizar y comparar secuencias

Los datos de cada una de las secuencias se analizaron con el programa de computación Chromas (versión 1.3; C. McCarthy, 1996, Griffith University, Brisbane, Queensland, Australia). Los resultados a partir de la secuenciación de la cadena positiva y negativa de cada una de las muestras se empalmaron con el programa MegAlign (DNASTAR, Madison, Wis), para obtener las secuencias consenso finales. Las secuencias nucleotídicas y aminoácidas del subgrupo A y B del VSRH se alinearon por separado con el empleo del Clustal X 1.64b [14]. El análisis filogenético se hizo con el modelo de sustitución nucleotídica Tamura-Nei, gamma 0.5. La reconstrucción del árbol filogenético se realizó mediante el método de *neighbor joining*. El árbol filogenético se evaluó a partir del cálculo del *bootstrap* con 1 000 réplicas (paquetes de programas contenidos en el programa MEGA versión 2.3) [15].

### Secuencias de las cepas del VSRH

De la base de datos del GenBank se obtuvieron 32 secuencias del VSRH, las cuales se muestran en la tabla 2.

### Resultados y discusión

La detección del VSRH se realizó mediante la secuenciación nucleotídica del producto amplificado, obtenido a partir de una RT-PCR de 64 cepas, de las cuales 58 pertenecieron al subgrupo A, y 6 al subgrupo B. Los cambios más frecuentes fueron las sustituciones nucleotídicas, y las transiciones fueron más comunes que las transversiones. Las sustituciones nucleotídicas fueron de tres tipos: sustituciones de nucleótidos que no daban lugar a cambios de aa (sustituciones sinónimas), sustituciones de nucleótidos que daban lugar a cambios de aa (sustituciones no sinónimas) y sustituciones de nucleótidos que introducían cambios en la posición del codón de terminación. Las sustituciones de nucleótidos que provocan cambios de aa en la glicoproteína G, son los cambios genéticos encontrados con más frecuencia en la mayoría de las cepas estudiadas de otras partes del mundo [12, 16]. En estos estudios se observó que el extremo C de la glicoproteína G es una de las regiones donde se acumulan los cambios aminoácidos, y que esta contiene múltiples epítopos variables, reconocidos por anticuerpos monoclonales (AcMs). Esto sugiere que la selección de nuevas variantes por anticuerpos (Acs), pudiera ser uno de los factores que contribuyen a la generación de la diversidad del VSRH [11, 17, 18].

Las sustituciones de nucleótidos que provocan alteraciones en la posición del codón de terminación, dan lugar a moléculas de diferente longitud. La glicoproteína G de los virus pertenecientes al subgrupo

Tabla 2. Nomenclatura, fecha de aislamiento, clasificación en subgrupos y procedencia de las cepas utilizadas en este estudio obtenidas de la base de datos del GenBank

Cepas	Fecha de aislamiento	Grupo	Origen
Long	1956	A	Estados Unidos
WV2780	1979	A	Estados Unidos
WV19983	1987	A	Estados Unidos
Mon/2/88	1988	A	Uruguay
Mon/3/88	1988	A	Uruguay
RSB642/89	1889	A	Reino Unido
RSB1734/89	1989	A	Reino Unido
Mon/5/90	1990	A	Uruguay
Mon/1/90	1990	A	Uruguay
Mon4/90	1990	A	Uruguay
ad/4/90	1990	A	España
CH57	1990-1995	A	Estados Unidos
Mon/5/91	1991	A	Uruguay
Mad6/93	1993	A	España
AL19376/94-5	1994-1995	A	Estados Unidos
NY103/94-5	1994-1995	A	Estados Unidos
MO01/94-5	1994-1995	A	Estados Unidos
Tx68532	1994-1995	A	Estados Unidos
AgA48/99	1999	A	Sudáfrica
AgK28/00	2000	A	Sudáfrica
AgK23/00	2000	A	Sudáfrica
AbJ81/00	2000	A	Sudáfrica
Ab03/00	2000	A	Sudáfrica
SAPT56/00	2000	A	Sudáfrica
8/60	1960	B	Suiza
18537	1962	B	Estados Unidos
B1/85	1985	B	Estados Unidos
CH10/90-4	1990-1994	B	Estados Unidos
NY01/94-5	1994-1995	B	Estados Unidos
NY97/94-5	1994-1995	B	Estados Unidos
SA934D/97	1997	B	Sudáfrica
SA800V/99	1999	B	Sudáfrica
SA439V99	1999	B	Sudáfrica
Moz/198/99	1999	B	Mozambique
SA25/00	2000	B	Sudáfrica
Ab27CT/00	2000	B	Sudáfrica
Ab5078P/01	2001	B	Sudáfrica
SA3064C/01	2001	B	Sudáfrica

B detectados en Cuba, presentaron una proteína de 295 aa con dos codones de parada diferentes (UAG o UAA). Sin embargo, dentro de las secuencias del subgrupo A se observaron dos tamaños de proteína (297 aa y 298 aa) con un solo codón de parada (UAG). Los cambios en el codón de parada se han asociado con importantes variaciones antigénicas de genes mutantes de escape del VSRH [11].

En los resultados de la secuenciación del gen G de las cepas que circularon en Cuba entre las cepas del período 1994 y 1996, se observó una elevada identidad entre ellas y la cepa Long de referencia. Todas las cepas fueron iguales entre sí y muy parecidas a Long, con solo 6 cambios de nucleótidos en el gen (posiciones 58, 260, 640, 659, 746 y 888). La cepa de CHab220/96 presentó, además, un cambio en la posición 824, y 6 fueron cambios aminoácidi-

14. Thompson JTG, FP, FJ, DH. The CLUSTAL X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res* 1997;25:4876-82.

15. Kumar S, Tamura K, Jakobsen I, Nei M. MEGA: molecular evolutionary genetics analyses software. Vol. 109. University Park: Pennsylvania State University;2001.

16. Cane PA. Molecular epidemiology of respiratory syncytial virus. *Rev Med Virol* 2001;11:103-16.

17. Garcia-Barreno B, Portela A, Delgado T, Lopez JA, Melero JA. Frame shift mutations as a novel mechanism for the generation of neutralization resistant mutants of human respiratory syncytial virus. *Embo J* 1990;9:4181-7.

cos (posiciones 15 K-Q, 82 Q-L, 209 K-E, 215 H-L, 244 I-T y 270 S-F); el cambio en la posición 888 fue silente.

La homogeneidad de las cepas del VSRH que circuló en la Ciudad de La Habana entre 1994 y 1996, y con una cepa antigua (cepa Long), constituye una característica única cuando son comparadas con las cepas del VSRH que circuló en países con clima templado y con diferentes estatus socioeconómicos, ya que en anteriores epidemias no se habían hallado cepas con secuencias antiguas. La estacionalidad de las infecciones por este virus difiere entre las zonas de clima tropical y las de clima templado. Mientras que las epidemias en los países con clima templado ocurren en invierno, en Cuba, a pesar de ser un país tropical, las infecciones por este virus se distribuyen desde septiembre hasta febrero. La influencia de la estacionalidad en la evolución del virus se desconoce, pero las características geográficas de Cuba pudieran estar influyendo en este comportamiento inusual.

Las cepas encontradas en Cuba, pertenecientes al subgrupo A, se agruparon filogenéticamente en 5 genotipos, de acuerdo con el porcentaje de similitud nucleotídica con los genotipos de referencias (genotipo antiguo, GA1, GA2, GA3 y GA5). Los resultados se muestran en la figura 1.

Dentro del genotipo antiguo se agruparon todas las cepas que circularon en la Ciudad de La Habana entre 1994 y 1996; una cepa, también de Ciudad de La Habana, aislada en 1998 y una cepa que circuló en Las Tunas durante el año 2000. Estas cepas se agruparon con 99% de similitud nucleotídica con una cepa antigua, la cepa prototipo Long, aislada en 1956. Este genotipo no se ha detectado de nuevo desde la fecha de su aislamiento. La circulación de cepas con genotipo antiguo fue una característica única en las cepas cubanas. Todas las cepas agrupadas dentro de este genotipo presentaron secuencias nucleotídicas idénticas o casi idénticas.

Resultados parecidos se reportaron previamente en Dinamarca, durante varias epidemias consecutivas (desde 1993 hasta 1995). El genotipo predominante mostró un patrón de restricción idéntico a la cepa prototipo A2, aislada en 1961 [19]. Cepas con igual patrón de restricción se encontraron en estudios posteriores de diferentes regiones de este mismo país, en dos de las cuales este genotipo continuó siendo el dominante. Los autores plantean que determinados genotipos que no han sido detectados durante muchas epidemias en otras partes del mundo, pueden mantenerse circulando de forma estable endémicamente en una población durante años, con manifestaciones esporádicas [20].

La mayoría de los virus que circularon entre 1995 y 1999 en las diferentes provincias cubanas se agruparon filogenéticamente con cepas del genotipo GA1, con 97% de similitud nucleotídica. Los virus pertenecientes a este genotipo encontrados en Cuba, se agruparon con cepas que circularon varios años atrás en Uruguay, Estados Unidos y Reino Unido (entre 1979 y 1991). Este genotipo fue común en la década de los 80 y en la actualidad se ha detectado con muy baja frecuencia. Nuevamente se observó la circulación de cepas con este genotipo con secuencias nucleotídicas casi idénticas.

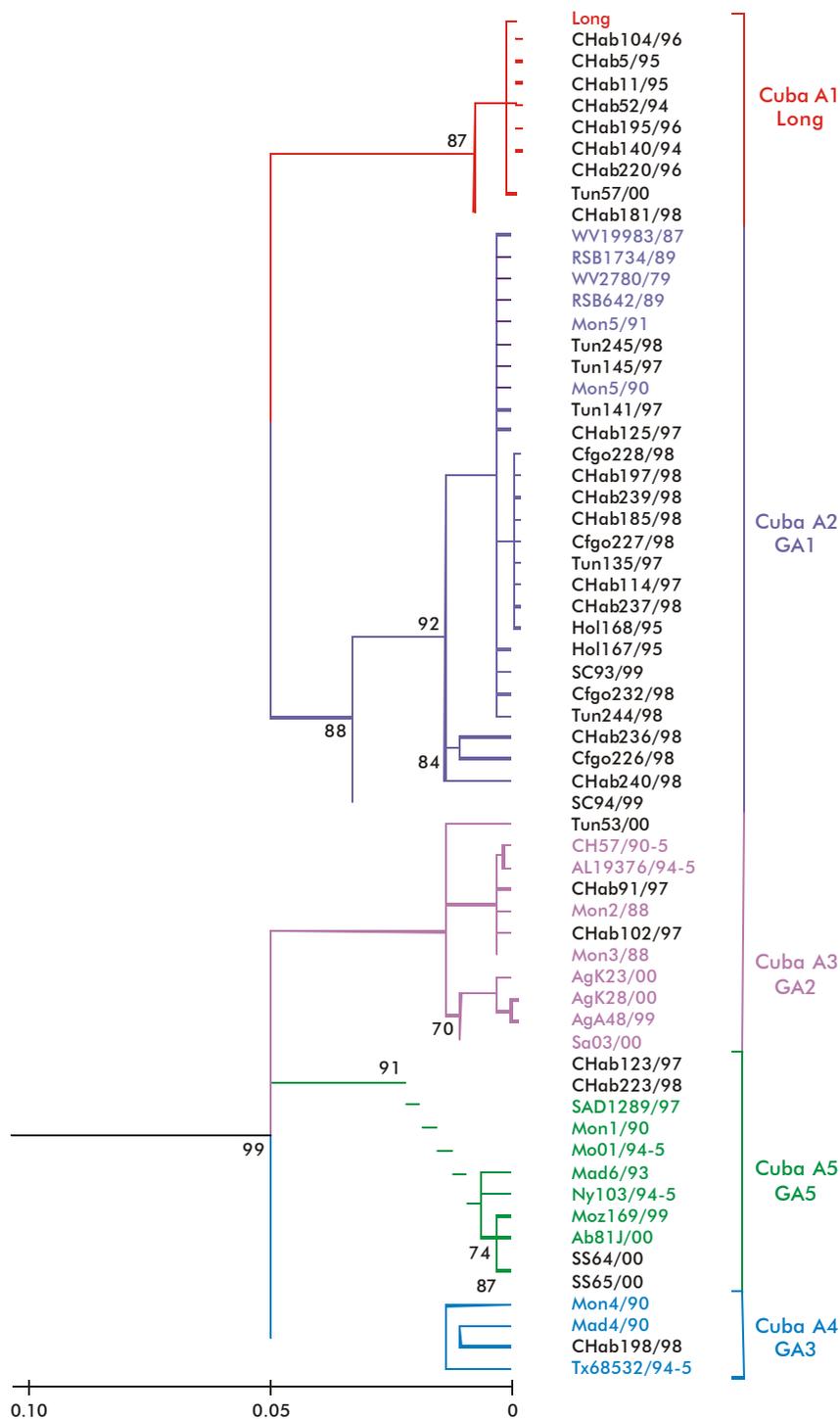


Figura 1. Árbol filogenético del VSRH del subgrupo A que circuló en algunas provincias de Cuba y en otras áreas geográficas. Los virus de Cuba están señalados con color negro.

Previamente, en otras localidades se apreciaron resultados similares. Durante 1993, en Gambia, se agruparon filogenéticamente virus aislados con una cepa circulante en Madrid detectada durante 1984 [21]. Esta variante fue relativamente común en Europa durante la década de los 80 y no se ha detectado desde entonces [10, 22].

18. Rueda P, Delgado T, Portela A, Melero JA, García-Barrero B. Premature stop codons in the G glycoprotein of human respiratory syncytial viruses resistant to neutralization by monoclonal antibodies. *J Virol* 1991;65:3374-8.

En Dinamarca, durante varias epidemias consecutivas (entre 1992 y 1998) se describieron virus, cuyos patrones de restricción fueron similares a los virus aislados en Estados Unidos entre 1982 y 1986 [19, 20]. Estas descripciones sugieren que la fluctuación temporal de un genotipo predominante en un área geográficamente restringida, podría deberse a un estado inmunológico condicionado en el hospedero, que favorece a determinadas cepas de la población circulante, más que por la evolución molecular inducida por la presión inmune selectiva. En estos trabajos se plantea que determinados genotipos que no se han reconocido durante varios inviernos, podrían mantenerse endémicos en una población durante años y manifestarse ocasionalmente. Hace poco se estudió la variabilidad genética de cepas del VSRH del subgrupo A, aisladas en Buenos Aires, Argentina, durante 1996 y 1998. En este período se detectó la circulación del virus con el genotipo GA1 con muy baja frecuencia [23].

La minoría de las cepas que circularon en el período de 1997 y 1998 y durante el año 2000, se agruparon filogenéticamente en los genotipos GA2, GA3 y GA5 con cepas que circularon posteriormente, en otras partes del mundo, durante el mismo período o en períodos diferentes.

El genotipo GA2 contenía cepas que circularon en distintos períodos en Sudáfrica, Montevideo y Norte América. Con este genotipo se agruparon dos virus detectados en la Ciudad de La Habana, que circularon durante 1997, y un virus que circuló en Las Tunas en el año 2000. Los virus detectados durante 1997 se relacionaron con cepas de Norte América y Montevideo, Argentina, que circularon en la primera década de los 90 y durante el año 1988, respectivamente. El virus CHab198/98 se agrupó con el genotipo GA3 junto con cepas de virus que circularon entre 1990 y 1995 en Montevideo, Madrid y Estados Unidos. Con el genotipo GA5 se agruparon dos virus detectados en la Ciudad de La Habana durante 1997 y 1998, y dos virus que circularon en Sancti Spíritus en el año 2000. Con igual genotipo se agruparon cepas que circularon en este mismo tiempo en áreas geográficamente distantes, y cepas aisladas en períodos y áreas geográficamente diferentes. Los virus detectados en Sancti Spíritus estaban muy relacionados con las cepas de los virus que circularon en Sudáfrica y Mozambique durante el mismo período epidémico.

El análisis por RFLP y la secuenciación parcial de un segmento de los genes SH, N y G revelaron que en países muy distantes se presentan, simultáneamente, virus muy similares [24, 25]. Los genotipos del VSRH tienen una distribución mundial. En lugares distantes y en tiempos diferentes se han detectado virus aislados, que pueden estar más relacionados entre sí, que otros virus aislados durante dos epidemias consecutivas [11]. En diferentes partes del mundo, durante una misma temporada epidémica, también se han identificado virus con el mismo genotipo [22, 26].

Los virus del subgrupo B detectados en Cuba se agruparon filogenéticamente en dos líneas evolutivas principales. Los resultados se muestran en la figura 2.

Los virus con ambos genotipos se agruparon con los de genotipos previamente identificados en Sudáfrica [27]. Con el genotipo SAB1 o Cuba B1 se agruparon

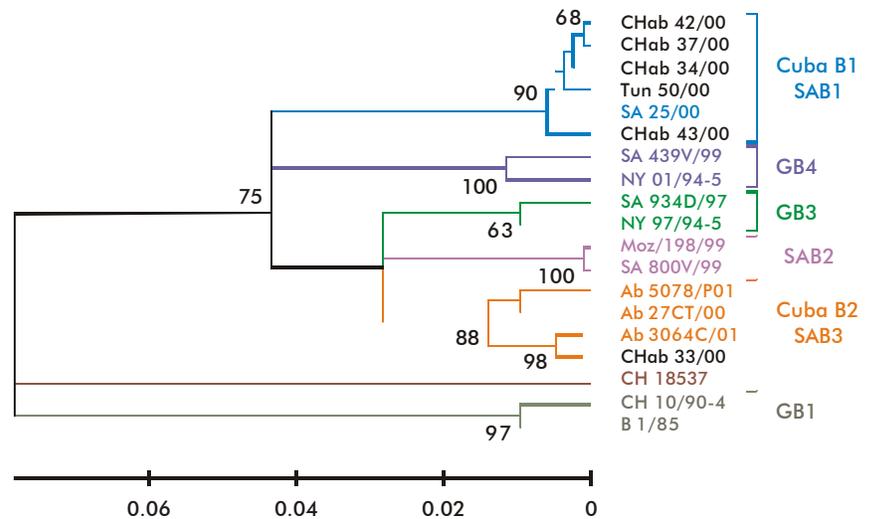


Figura 2. Árbol filogenético del VSRH del subgrupo B que circuló en algunas provincias de Cuba y en otras áreas geográficas. Los virus de Cuba se señalan en color negro.

casi todos los virus identificados en Cuba. De este subgrupo se observaron virus con secuencias idénticas o casi idénticas. En Sudáfrica, entre 1998 y 2000 se detectó este genotipo con una frecuencia baja y no pudo ser agrupado con ninguna de las cepas publicadas en el GenBank. Sin embargo, con el genotipo SAB3 o Cuba B2 se agrupó solamente una cepa detectada en Cuba (CHab33/00). Este genotipo fue dominante en Sudáfrica desde 1997 hasta el año 2000 [27]. Los virus circulantes en Cuba se agruparon filogenéticamente muy distantes de la cepa prototipo CH18537.

En 1991, Sullender y sus colaboradores analizaron la secuencia de la glicoproteína G de un grupo de cepas del subgrupo B, aisladas desde 1960 hasta 1989. En este estudio se identificó la circulación de múltiples genotipos. Se analizaron cepas pertenecientes al subgrupo B aisladas durante tres períodos epidémicos (desde 1993 hasta 1996) en Alabama. Se observaron diferentes genotipos de este subgrupo, las cepas antiguas se agruparon muy distantes de las cepas más recientes [28]. En una comunidad de Estados Unidos se examinó un grupo de cepas, aisladas durante cinco períodos epidémicos, también se identificaron cuatro genotipos (GB1-GB4). Este estudio se extendió a cinco comunidades de Estados Unidos durante un mismo período epidémico y se detectó solamente la circulación de los genotipos GB3 y GB4 [29, 30].

En el año 2001, Venter y sus colaboradores identificaron la circulación de múltiples genotipos del subgrupo B durante tres epidemias consecutivas en Sudáfrica. Se detectaron 5 genotipos, dos de ellos previamente identificados (GB3 y GB4), y tres nuevos (SAB1, SAB2 y SAB3). En Uruguay durante los períodos de 1989 a 1996 y de 1999 a 2001, circularon los genotipos GB1, GB2, GB4 y SAB2 y, además, se identificaron dos genotipos nuevos URU1 y URU2. Estos dos genotipos estaban formados por cepas que circularon en Uruguay en 1990, 1991, 1999 y 2001 [31].

A diferencia del subgrupo A, las cepas del subgrupo B se encontraban muy alejadas de las cepas antiguas. Los virus del mismo período se agruparon filogené-

19. Johansen J, Christensen LS, Hornsleth A, Klug B, Hansen KS, Nir M. Restriction pattern variability of respiratory syncytial virus during three consecutive epidemics in Denmark. *Apmis* 1997;105:303-8.

20. Christensen LS, Larsen LB, Johansen J, Andersen EA, Wejse C, Klug B, Hornsleth A. The fluctuating pattern of various genome types of respiratory syncytial virus in Copenhagen and some other locations in Denmark. *Apmis* 1999;107:843-50.

21. Cane PA, Weber M, Sanneh M, Dakour R, Pringle CR, Whittle H. Molecular epidemiology of respiratory syncytial virus in The Gambia. *Epidemiol Infect* 1999; 122:155-60.

22. García O, Martín M, Dopazo J, Arbizu J, Frabasile S, Russi J, Hortal M, Perez-Brena P, Martínez I, García-Barreno B, et al. Evolutionary pattern of human respiratory syncytial virus (subgroup A): cocirculating lineages and correlation of genetic and antigenic changes in the G glycoprotein. *J Virol* 1994;68:5448-59.

23. Frabasile S, Delfraro A, Facal L, Videla C, Galiano M, de Sierra MJ, Ruchansky D, Vitoreira N, Berois M, Carballal G, Russi J, Arbizu J. Antigenic and genetic variability of human respiratory syncytial viruses (group A) isolated in Uruguay and Argentina: 1993-2001. *J Med Virol* 2003;71:305-12.

24. Cane PA, Pringle CR. Molecular epidemiology of respiratory syncytial virus: rapid identification of subgroup A lineages. *J Virol Methods* 1992;40:297-306.

25. Lukic-Grlic A, Cane PA, Bace A, Pringle CR, Mlinaric-Galinovic G, Popow-Kraupp T. Antigenic and genomic diversity of central European respiratory syncytial virus strains. *Arch Virol* 1998; 143:1441-7.

26. Sanz MC, Kew OM, Anderson LJ. Genetic heterogeneity of the attachment glycoprotein G among group A respiratory syncytial viruses. *Virus Res* 1994;33: 203-17.

ticamente en dos genotipos, con cepas que circularon durante ese mismo tiempo en Sudáfrica. Esta elevada similitud con las cepas del continente africano, pudiera estar muy relacionada con el incremento del intercambio de viajeros cubanos a África a finales de la década de los 90.

El patrón epidemiológico descrito para el VSRH en Cuba, se ha discutido en anteriores trabajos del laboratorio, en los cuales se ha determinado que este virus circula desde el mes de septiembre hasta febrero. Las condiciones geográficas y socioeconómicas de Cuba pudieran influir en su diseminación y evolución.

## Conclusiones

1. Las sustituciones de aminoácidos y el uso alternativo de codones de terminación, fueron los cambios más frecuentemente encontrados en el extremo C de la glicoproteína G de los virus estudiados en Cuba. Estos son mecanismos antigénicos e inmunogénicos implicados en la generación de la diversidad del VSRH.

2. Las secuencias de las cepas del subgrupo A del VSRH se agruparon filogenéticamente con secuencias de diferentes genotipos reportadas en distintas regiones geográficas de todos los continentes, lo que confirma que las variantes del VSRH están diseminadas mundialmente.

3. La circulación de las cepas del subgrupo A con secuencias nucleotídicas similares a las de la cepa prototipo Long fue un hallazgo particular de las cepas detectadas en Cuba.

4. Las secuencias nucleotídicas del VSRH, halladas en Cuba, pertenecientes al subgrupo B, se relacionaron filogenéticamente con las secuencias de las cepas reportadas en Sudáfrica durante la misma temporada epidémica.

5. La presencia de secuencias nucleotídicas de la glicoproteína G casi idénticas, fue una característica que predominó en las cepas del VSRH detectado en las provincias en las que se hicieron estudios, lo cual sugiere que el virus se diseminó a partir de una fuente común.

27. Venter M, Madhi SA, Tiemessen CT, Schoub BD. Genetic diversity and molecular epidemiology of respiratory syncytial virus over four consecutive seasons in South Africa: identification of new subgroup A and B genotypes. *J Gen Virol* 2001;82:2117-24.

28. Coggins WB, Lefkowitz EJ, Sullender WM. Genetic variability among group A and group B respiratory syncytial viruses in a

children's hospital. *J Clin Microbiol* 1998; 36:3552-7.

29. Peret TC, Hall CB, Schnabel KC, Golub JA, Anderson LJ. Circulation patterns of genetically distinct group A and B strains of human respiratory syncytial virus in a community. *J Gen Virol* 1998;79(9):2221-9.

30. Peret TC, Hall CB, Hammond GW, Piedra PA, Storch GA, Sullender WM, Tsou C, An-

derson LJ. Circulation patterns of group A and B human respiratory syncytial virus genotypes in 5 communities in North America. *J Infect Dis* 2000;181:1891-6.

31. Blanc A, Delfraro A, Frabasile S, Arbiza J. Genotypes of respiratory syncytial virus group B identified in Uruguay [editorial]. *Arch Virol* 2004.