

INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL "PEDRO KOURÍ"
INSTITUTO DE SALUD CARLOS III, ESPAÑA

Diferentes patrones de circulación dentro de los subgrupos A y B del virus sincitial respiratorio humano en algunas provincias de Cuba

Lic. Odalys Valdés Ramírez,¹ Lic. Clara Savón,² Dr. Ángel Goyenechea,³ Dr. Ángel Valdivia,⁴ Lic. Grehete González,⁵ Lic. Lídice Palerm⁶ y Lic. José A. Melero⁷

RESUMEN

Se realizó la secuenciación nucleotídica de la región del tercio C-terminal de la proteína G de 37 muestras de exudados nasofaríngeos, de niños menores de 1 año provenientes de algunas provincias de Cuba durante 5 períodos epidémicos (1995-2000), para conocer los patrones de circulación de cepas del virus sincitial respiratorio humano; el cual se clasifica en 2 subgrupos antigénicos A y B, y cada uno contiene múltiples variantes. El subgrupo A circuló durante todos los años, el subgrupo B se detectó solamente durante el año 2000. Dentro del subgrupo A se observó la presencia de cepas con 2 tamaños diferentes de la proteína G (297 aa y 298 aa), mientras que para el subgrupo B fue observado un único tamaño (295 aa). El análisis filogenético permitió identificar 5 y 2 genotipos dentro de los subgrupos A y B, respectivamente. Los virus de Cuba se relacionaron filogenéticamente con cepas de otras partes del mundo. Dentro del subgrupo A se encontraron 2 cepas, las cuales fueron muy similares a la cepa prototipo Long. Casi todas las cepas del año 2000 de ambos subgrupos, se agruparon filogenéticamente con cepas que circularon en Sudáfrica durante ese mismo período.

Palabras clave: Virus sincitial respiratorio humano (VSRH), secuenciación nucleotídica de la región del tercio C-terminal de la proteína G, subgrupos antigénicos A y B.

El virus sincitial respiratorio humano (VSRH) es la causa principal de infección del tracto respiratorio bajo en lactantes y niños pequeños.¹⁻⁴ Este virus también ha sido reconocido como un agente etiológico importante que produce neumonía en pacientes inmunodeprimidos y en ancianos.⁵⁻⁷ Los aislamientos de VSRH se clasifican en 2 subgrupos antigénicos A y B sobre la base de su reactividad frente a un panel de anticuerpos monoclonales. Por análisis de secuencia se

demonstró que constituyen grupos genéticamente diferentes.⁸⁻¹¹ La existencia de distintos linajes dentro de cada subgrupo ha sido demostrada al nivel antigénico y genético.⁹⁻¹¹ La proteína G resultó ser la más divergente entre y dentro de cada subgrupo.¹² La acumulación de cambios aminoacídicos en el tiempo sugiere que la evolución de esta proteína está bajo presión selectiva.⁹ El conocimiento sobre la epidemiología molecular del VSRH se ha basado fundamentalmente en

¹ Máster en Virología. Licenciada en Bioquímica. Investigadora Agregada. Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí" (IPK).

² Doctora en Ciencias. Licenciada en Biología. Investigadora Titular. IPK.

³ Especialista de II Grado en Microbiología. Investigador y Profesor Titular. IPK.

⁴ Doctor en Ciencias. Especialista de II Grado en Microbiología. Investigador Auxiliar. IPK.

⁵ Máster en Virología. Licenciada en Microbiología. Investigadora Agregada. IPK.

⁶ Licenciada en Microbiología. IPK.

⁷ Doctor en Ciencias. Licenciado en Biología. Instituto de Salud Carlos III, España.

estudios realizados en países desarrollados con climas templados.¹³ Muy pocos estudios han sido realizados en países subdesarrollados y tropicales, donde la infección con VSRH podría seguir un patrón diferente.¹⁴ En este reporte se examinaron diferentes patrones de circulación de los subgrupos A y B del VSRH en diferentes provincias de Cuba durante 5 períodos epidémicos.

MÉTODOS

Muestras clínicas: las muestras seleccionadas para el estudio fueron exudados nasofaríngeos de niños menores de 2 años con infección respiratoria aguda baja, provenientes de diferentes hospitales de Cuba desde 1995 hasta el año 2000. Todos los exudados nasofaríngeos fueron colectados en tubos con tapa de rosca que contenían 4 mL de medio de transporte (Hanks-lactoalbumin con penicilina G 200 U/mL, estreptomycin 200 g/mL y anfotericina B 5 µg/mL), transportados a 4 °C y conservados a - 70 °C. Las muestras examinadas se muestran en la tabla 1. La nomenclatura empleada indica: el lugar de procedencia, el número asignado al virus y el año en que fue tomada la muestra.

Extracción de ARN: se realizó la extracción de ARN viral directamente de la muestra clínica. Se tomó un volumen inicial de 500 mL. Las muestras se centrifugaron a 12 000 rpm durante 15 min a 4 °C y el sobrenadante de cada una fue eliminado, el precipitado fue resuspendido en 500 mL de trizol (Gibco); seguido de una incubación durante 5 min a temperatura ambiente (TA). Después se añadieron 100 mL de cloroformo (mezclar por vortex), se incubó 3 min a TA, se centrifugó en igualdad de condiciones y se transfirió la fase superior a otro tubo *ependorf*. Posteriormente se añadieron 400 mL de isopropanol, se mezcló mediante agitación manual y se incubó durante 10 min a TA; la mezcla se centrifugó durante 15 min bajo las mismas condiciones mencionadas anteriormente. El ARN se lavó con 500 mL de etanol 75 % (SIGMA), la centrifugación se realizó durante 15 min en igualdad de condiciones, el sobrenadante fue eliminado, el ARN se secó en el flujo y fue resuspendido en 30 mL de agua estéril libre de RNasa.

Transcripción reversa y reacción en cadena de la palemizara (RT-RCP, siglas en inglés): para

TABLA 1. Nomenclatura y procedencia de los aislamientos usados en este estudio

Nombre	Año de aislamiento	Origen
Hol/167/95	1995	Holguín
Hol/168/95	1995	Holguín
CHab/91/97	1997	C. Habana
Tun/135/97	1997	Las Tunas
Tun/141/97	1997	Las Tunas
Tun/145/97	1997	Las Tunas
CHab/102/97	1997	C. Habana
CHab/123/97	1997	C. Habana
CHab/114/98	1998	C. Habana
CHab/125/98	1998	C. Habana
CHab/181/98	1998	C. Habana
CHab/185/98	1998	C. Habana
CHab/197/98	1998	C. Habana
CHab/198/98	1998	C. Habana
CHab/223/98	1998	C. Habana
Cfgos/226/98	1998	Cienfuegos
Cfgos/227/98	1998	Cienfuegos
Cfgos/228/98	1998	Cienfuegos
Cfgos/232/98	1998	Cienfuegos
CHab/236/98	1998	C. Habana
CHab/237/98	1998	C. Habana
CHab/239/98	1998	C. Habana
CHab/240/98	1998	C. Habana
Tun/244/98	1998	Las Tunas
Tun/245/98	1998	Las Tunas
SC/93/99	1999	Santiago de Cuba
SC/94/99	1999	Santiago de Cuba
CHab/33/00	2000	C. Habana
CHab/34/00	2000	C. Habana
CHab/37/00	2000	C. Habana
CHab/42/00	2000	C. Habana
CHab/43/00	2000	C. Habana
Tun/50/00	2000	Las Tunas
Tun/53/00	2000	Las Tunas
Tun/57/00	2000	Las Tunas
SS/64/00	2000	Sancti Spíritus
SS/65/00	2000	Sancti Spíritus

la RT-PCR se utilizó el kit RT-PCR *Access System* (Promega). Para esto se añadieron a la mezcla de reacción 10 mL del ARN extraído. En la mezcla se emplearon 10 mL de AMV/Tfl 5X, 1 mL AMV RT (5 U/mL), 1 mL de Tfl DNA polimerasa (5 U/mL), 6 mL de MgSO₄ (25 mM), 1 mL de dNTP (10 mM), 1 mL de cada oligonucleótido (100 ng) y se completó con agua bidestilada estéril para un volumen final de 50 mL. La mezcla de reacción para la RT-PCR se colocó en un termociclador (MJ Research, PTC 150) utilizando el programa siguiente: 30 min a 42 °C, seguido de 5 min a 94 °C, y 30 ciclos de desnaturalización a 94 °C durante 30 s, de hibridación a 55 °C durante 30 s y de extensión a 72 °C durante 30 s, con una extensión final de 72 °C por 5 min. Para la RT-PCR se utilizaron

los oligonucleótidos G(+) 5'GGGGCAAATGCAAA-CATGTC (posición nucleotídica 1-20), y G(-) 5'TTTGCTAACTGCACTGCATGT (posición nucleotídica 1097-1117).

PCR semi-anidada: para la segunda amplificación se añadieron 2 mL de la primera PCR a la mezcla de reacción constituida por 0,25 mL de AmpliTaq Polimerasa (5 U/mL) (Perkin Elmer), 5 mL de *buffer* PCR (10X) (Perkin Elmer), 6 mL MgCl₂ (2 mM) (Perkin Elmer), 0,8 mL de dNTP (25 mM) (Perkin Elmer), 1 mL de cada oligonucleótido (100 ng) y agua bidestilada estéril para un volumen final de 50 mL. La mezcla de la PCR anidada se colocó en el mismo termociclador mencionado anteriormente y el programa utilizado fue el siguiente: 3 min a 94 °C seguido de 30 ciclos de desnaturalización a 94 °C durante 30 s, de hibridación a 55 °C durante 30 s y de extensión a 72 °C durante 30 s, con una extensión final de 72 °C por 5 min. Para la PCR semianidada se utilizó uno de los oligonucleótidos utilizados en la RT-PCR, el G(-) 5'TTTGCTAACTGCACTGCATGT (posición nucleotídica 1097-1117) y 2 oligonucleótidos internos para el subgrupo A y B, el GA (+) 5'GCAGCATATGCAGCAACA (posición nucleotídica 533-551) y el GB (-) 5'GATGATT-ACCATTTTGAAGTGTTC (posición nucleotídica 496-521). Todos los oligonucleótidos fueron donados gentilmente por el doctor José A. Melero y la doctora Pilar Pérez Breña del Instituto de Salud Carlos III, Madrid, España.

Secuenciación nucleotídica: los productos de la PCR fueron purificados utilizando el kit QIAquick de purificación de PCR (Qiagen). Ambas cadenas fueron secuenciadas automáticamente usando el kit fluorescente *dye-labeled terminators* en ABI 373 a7 *Sequencer models* (Perkin-Elmer Applied Biosystems).

Análisis de los datos: los datos de cada una de las secuencias fueron primeramente analizados con el *software* Chromas (versión 1.3; C. McCarthy, 1996, Griffith University, Brisbane, Queensland, Australia). Los datos de secuencia de la cadena positiva y negativa de cada una de las muestras secuenciadas fueron empalmados usando el programa MegAlign (DNASTAR, *software*, Madison, Wis) para obtener las secuencias consenso finales. Las secuencias nucleotídicas y aminoácidas del subgrupo A y B

del VSRH fueron alineadas separadamente utilizando el Clustal X 1.64b (Thompson y otros, 1997). El análisis filogenético fue realizado con el MEGA (versión 2.1). Un total de 31 secuencias de VSRH fueron obtenidas de la base de datos del GenBank. Los nombres de las cepas se muestran en la tabla 2.

En este análisis fueron incluidas secuencias de 7 cepas aisladas en Ciudad de La Habana, no relacionadas con los 5 períodos epidémicos estudiados.¹⁵ Los nombres de estas cepas se muestran en la tabla 3.

RESULTADOS

Se realizó la secuenciación nucleotídica del tercio C-terminal del gen de la proteína G (394 nucleótidos, que corresponde al codón en la posición 185 hasta la posición 298 para la cepa prototipo Long y 292 para la cepa prototipo CH18537) de

TABLA 2. Nomenclatura, procedencia y clasificación en subgrupos de las cepas utilizadas en el estudio obtenidas de la base de datos del Gen Bank

Cepa	Sub-grupo	Año de aislamiento	País
Long	A	1956	EE. UU.
A2	A	1961	Australia
WV2780	A	1979	EE. UU.
WV19983	A	1987	EE. UU.
Mon/2/88	A	1988	Uruguay
Mon/3/88	A	1988	Uruguay
RSB89-1734	A	1989	Reino Unido
RSB89-642	A	1989	Reino Unido
Mon5/90	A	1990	Uruguay
Mon1/90	A	1990	Uruguay
Mad4/90	A	1990	España
Mon4/90	A	1990	Uruguay
Mon5/91	A	1991	Uruguay
Mon7/91	A	1991	Uruguay
Mad6/93	A	1993	España
CH 57	A	1990-95	EE. UU.
NY103	A	1994-95	EE. UU.
TX68532	A	1994-95	EE. UU.
AL19376	A	1994-95	EE. UU.
MO01	A	1994-95	EE. UU.
Moz169/99	A	1999	Mozambique
AgA48-99	A	1999	Sudáfrica
SA00J81	A	2000	Sudáfrica
SA0003	A	2000	Sudáfrica
AgK23-00	A	2000	Sudáfrica
AgK28-00	A	2000	Sudáfrica
SA97D1289	A	1997	Sudáfrica
Su8/60	B	1960	Suiza
CH18537	B	1962	EE. UU.
Ab3064C01	B	2001	Sudáfrica
SA0025	B	2000	Sudáfrica

TABLA 3. Nomenclatura y procedencia de 7 cepas no relacionadas con el estudio

Nombre	Año de aislamiento	Origen
CHab/52/94	1994	C. Habana
CHab/140/94	1994	C. Habana
CHab/5/95	1995	C. Habana
CHab/11/95	1995	C. Habana
CHab/104/96	1996	C. Habana
CHab/195/96	1996	C. Habana
CHab/220/96	1996	C. Habana

37 muestras clínicas obtenidas durante 5 períodos epidémicos (1995-2000) de algunas provincias del país. De estas muestras clínicas positivas a VSRH por PCR, 31 pertenecieron al subgrupo antigénico A y 6 al subgrupo B, la identificación de cada subgrupo se realizó por secuenciación nucleotídica. El subgrupo antigénico A se detectó durante todos los años, el subgrupo B se detectó solamente en el año 2000.

Las secuencias obtenidas fueron comparadas filogenéticamente con secuencias publicadas en el GenBank. Cuando se analizaron las secuencias de los subgrupos A y B en su conjunto, fueron observados 2 subgrupos muy bien definidos. Para facilitar esta comparación, las secuencias de ambos subgrupos se analizaron en forma separada. Los subgrupos A y B fueron genotipados por comparación filogenética con secuencias que habían sido antes asignadas a un genotipo determinado¹⁶⁻¹⁸ y por comparación con secuencias de otras regiones geográficas (figs. 1 y 2). Los aislamientos cubanos del subgrupo A se agruparon filogenéticamente en 3 líneas evolutivas principales con un nivel de confianza muy significativo (*bootstrap* 94-100 %).

La mayoría de los aislamientos de Cuba se agruparon en la rama superior del árbol, donde aparecen cepas de casi todas las provincias estudiadas que circularon durante los años 1995-1999. Dentro de este grupo se observaron secuencias idénticas o casi idénticas. Los aislamientos de esta rama se agruparon filogenéticamente con virus pertenecientes al genotipo GA 1, en este grupo se encontraron cepas que circularon en Uruguay, EE. UU. y Reino Unido, varios años atrás. La cepa SC94/99 se ubicó fuera del genotipo GA 1.

Se agruparon 2 aislamientos (CHab181/98 y Tun57/00) en la misma rama de la cepa prototipo

Long. Dentro de este grupo se incluyeron 3 cepas representativas de brotes epidémicos ocurridos en Ciudad de La Habana durante los años 1994-1996 y una cepa de Uruguay. En la región secuenciada de la cepa CH181/98 se encontraron solamente 3 nucleótidos diferentes (posición 677, 741 y 818); de estos, solo se observó un cambio aminoacídico, L252V (cambios en las posiciones 677 y 818 fueron silentes). En la cepa Tun57/00 se encontraron 6 nucleótidos diferentes (posiciones 567, 597, 621, 624, 637, 802), con un solo cambio al nivel de aminoácido (267 S-L), los cambios en las posiciones restantes también fueron silentes.

La rama inferior se dividió a su vez en 3 ramas secundarias también con un nivel estadístico altamente significativo (*bootstrap* 67-92 %), los aislamientos cubanos de cada una de las ramas secundarias se agruparon filogenéticamente con cepas pertenecientes a los genotipos GA 2, GA 3 y GA 5. El genotipo GA 2 estaba compuesto por cepas que circularon en diferentes períodos de tiempo en Sudáfrica, Montevideo y Norteamérica. Dentro de este se agruparon 2 cepas de Ciudad de La Habana que circularon durante 1997 y una cepa de Las Tunas del año 2000. Las cepas cubanas de 1997 estaban más estrechamente relacionadas con los aislamientos de Norteamérica y Montevideo que circularon en años diferentes. La cepa del año 2000 se agrupó muy cercanamente con cepas que circularon en Sudáfrica durante el mismo período de tiempo. La cepa CHab198/98 se agrupó dentro del genotipo GA 3 con cepas de Montevideo, Madrid y EE. UU. que circularon en tiempos diferentes.

Dentro del genotipo GA 5 se agruparon 2 cepas de Ciudad de La Habana que circularon durante 1997 y 1998, y 2 cepas de Sancti Spíritus del año 2000. En esta rama se agruparon virus que circularon durante un mismo período de tiempo en áreas geográficas distantes y cepas que circularon en períodos de tiempo y áreas geográficas diferentes. Las cepas de Sancti Spíritus presentaron la misma secuencia nucleotídica y estaban muy relacionadas con cepas de Sudáfrica y de Mozambique que circularon durante el mismo período epidémico.

Los aislamientos cubanos del subgrupo B se agruparon filogenéticamente en 2 ramas diferentes con un valor de *bootstrap* de 82-100 %. Casi todos

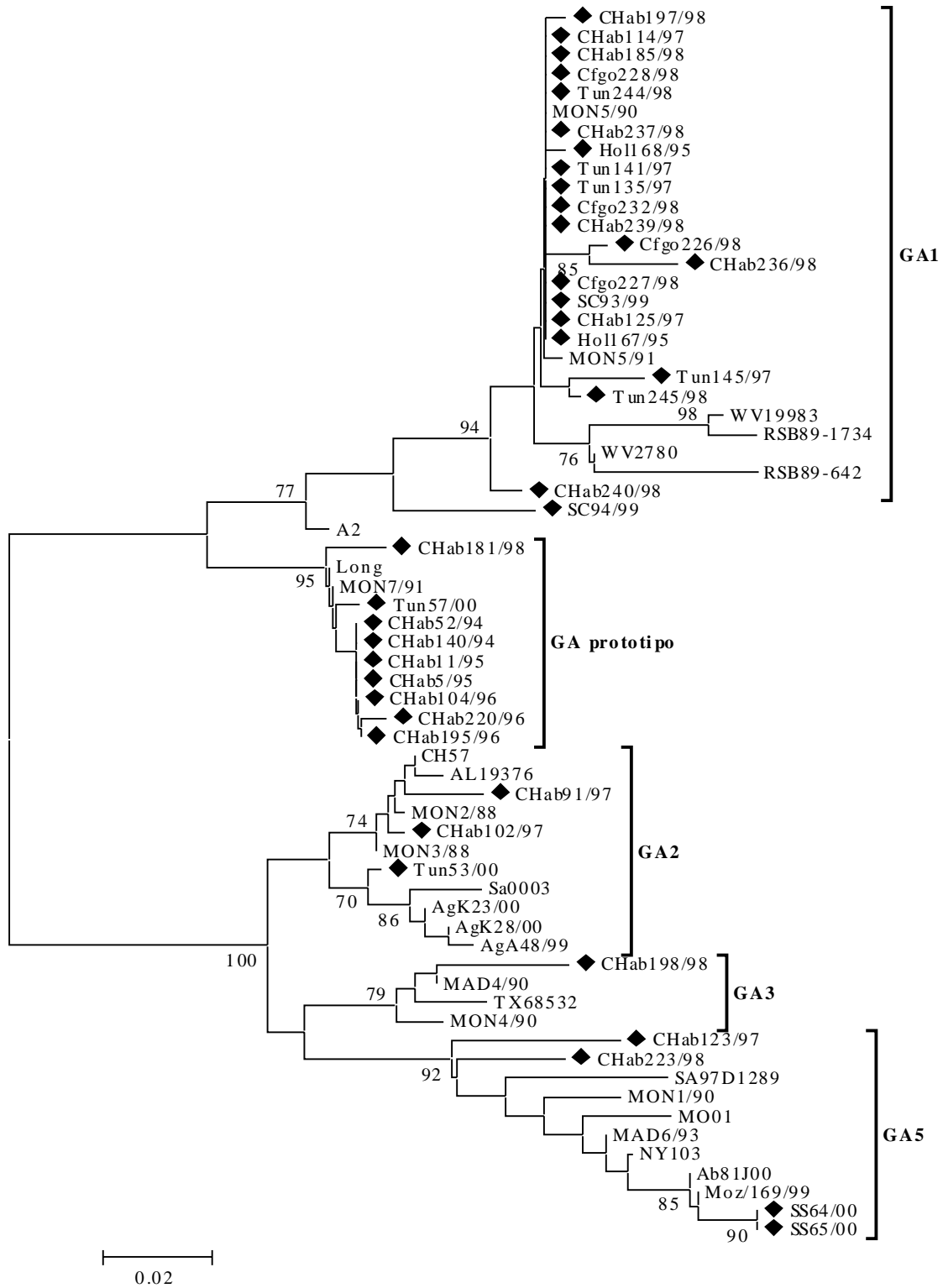
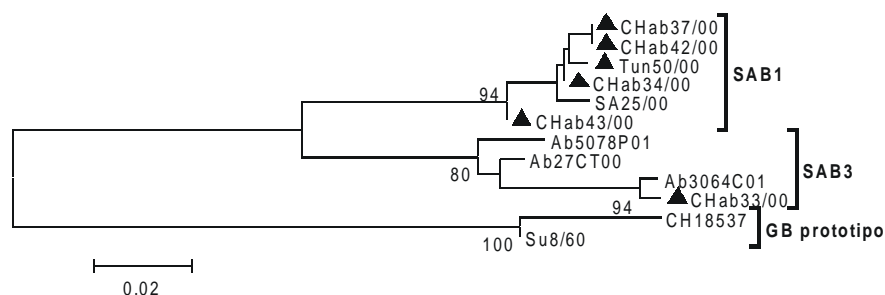


Fig. 1. Análisis filogenético de cepas de VSRH del subgrupo A aisladas en Cuba y en diferentes localidades geográficas. Los virus de Cuba son señalizados con un triángulo negro.

Fig. 2. Análisis filogenético de cepas de VSRH del subgrupo B aisladas en Cuba y en diferentes localidades geográficas. Los virus de Cuba son señalizados con un triángulo negro.



los aislamientos cubanos se agruparon dentro del genotipo cluster SAB 1. Dentro de este genotipo 2 aislamientos presentaron la misma secuencia nucleotídica (CHab37/00 y CHab42/00). Las cepas CHab34/00, Tun50/00 y CHab43/00 se diferenciaron de las anteriores en 1 ó 2 nucleótidos. Todas las cepas del subgrupo B se agruparon filogenéticamente con cepas de Sudáfrica que circularon durante ese mismo período de tiempo.

El análisis de la secuencia aminoacídica de los aislamientos cubanos del grupo A mostró la presencia de cepas con 2 tamaños diferentes de la proteína G (297 aa y 298 aa). En todos los casos el codón de parada fue UAG (fig. 3). Para el subgrupo B se observó en todas las cepas un único tamaño para la proteína G (295aa) con 2 codones diferentes de parada UAG y UAA (fig. 4).

DISCUSIÓN

El análisis filogenético basado en las secuencias nucleotídicas o aminoacídicas mostró que el subgrupo A evolucionó con múltiples linajes. Los aislamientos cubanos pertenecientes al genotipo GA 1 se agruparon filogenéticamente con virus de Uruguay, EE. UU. y Reino Unido aislados varios años atrás. Resultados similares fueron encontrados en otras partes del mundo. Virus aislados en Gambia durante 1993 fueron muy similares a virus aislados en Madrid 10 años antes.¹⁹ Estudios realizados en Dinamarca durante varias epidemias consecutivas encontraron virus cuyos patrones de restricción fueron similares a virus aislados hace más de 20 años en Australia y EE. UU.^{20,21} Estos autores han sugerido, que las fluctuaciones temporales de un genotipo predominante podrían estar dadas más por el estado inmunológico del hospedero que favorece a determinadas cepas dentro de la población

circulante, que por la evolución molecular inducida por la presión inmune selectiva. Ellos además plantean que determinados genotipos los cuales no han sido reconocidos durante varios inviernos, podrían mantenerse endémicos en una población durante años y manifestarse ocasionalmente.

El genotipo GA 1 circuló en casi todas las provincias estudiadas y se mantuvo circulando durante 4 años (1995-1999). Cepas con idénticas secuencias fueron vistas en varias comunidades durante un mismo período epidémico y en una misma comunidad durante 3 períodos epidémicos en EE. UU.^{16,17}

Un alto grado de identidad fue observado entre 2 aislamientos cubanos y la cepa prototipo Long. Resultados similares fueron encontrados en años anteriores durante 3 epidemias consecutivas ocurridas en Ciudad de La Habana.¹⁵ En Dinamarca durante 2 períodos epidémicos el genotipo predominante mostró un patrón de restricción idéntico a la cepa A2 aislada en 1961.²⁰

Las cepas pertenecientes a la rama inferior se agruparon a su vez en múltiples genotipos GA 2, GA 3 y GA 5. En esta rama se agruparon virus que circularon durante un mismo período de tiempo en áreas geográficas distantes. Por ejemplo 2 cepas de Sancti Spíritus y una de Las Tunas del año 2000 estaban muy estrechamente relacionadas con cepas que circularon durante ese mismo período en Sudáfrica y Mozambique. Diferentes autores han identificado que virus muy similares están presentes simultáneamente en áreas geográficas muy distantes.²² Dentro de esta rama también se agruparon cepas que circularon en tiempos diferentes en otras áreas geográficas. Los diferentes genotipos de VSRH tienen una distribución mundial y se ha visto que virus aislados en lugares distantes y en tiempos diferentes pueden estar más relacionados que virus aislados en un mismo lugar durante una misma epidemia.¹³

Long	ICRIRIMNED	IRKIKTAPKA	KPIPTIKNER	LEPOTIKNE	VECIPEEER	VIMINIV	VILLINMTO	NPKLIGOMI	INRISKOKL	SPSOVSTIE	HPQWSEPM	TTAQ*	298
CHab220/96E.....E.....E.....E.....E.....E.....E.....E.....E.....E.....E.....E.....	298
CHAb140/94E.....E.....E.....E.....E.....E.....E.....E.....E.....E.....E.....E.....	298
CHAb5/95E.....E.....E.....E.....E.....E.....E.....E.....E.....E.....E.....E.....	298
CHAb11/95E.....E.....E.....E.....E.....E.....E.....E.....E.....E.....E.....E.....	298
CHAb104/94E.....E.....E.....E.....E.....E.....E.....E.....E.....E.....E.....E.....	298
CHAb195/94E.....E.....E.....E.....E.....E.....E.....E.....E.....E.....E.....E.....	298
CHAb52/94E.....E.....E.....E.....E.....E.....E.....E.....E.....E.....E.....E.....	298
CHAb181/98E.....E.....E.....E.....E.....E.....E.....E.....E.....E.....E.....E.....	298
Tun57/00E.....E.....E.....E.....E.....E.....E.....E.....E.....E.....E.....E.....	298
CHAb237/98E.....E.....E.....E.....E.....E.....E.....E.....E.....E.....E.....E.....	298
Tun133/97E.....E.....E.....E.....E.....E.....E.....E.....E.....E.....E.....E.....	297
SCB3/99E.....E.....E.....E.....E.....E.....E.....E.....E.....E.....E.....E.....	297
CHAb14/97E.....E.....E.....E.....E.....E.....E.....E.....E.....E.....E.....E.....	297
CHAb125/97E.....E.....E.....E.....E.....E.....E.....E.....E.....E.....E.....E.....	297
Tun141/97E.....E.....E.....E.....E.....E.....E.....E.....E.....E.....E.....E.....	297
Cfgo227/98E.....E.....E.....E.....E.....E.....E.....E.....E.....E.....E.....E.....	297
Cfgo228/98E.....E.....E.....E.....E.....E.....E.....E.....E.....E.....E.....E.....	297
CHAb239/98E.....E.....E.....E.....E.....E.....E.....E.....E.....E.....E.....E.....	297
Tun244/98E.....E.....E.....E.....E.....E.....E.....E.....E.....E.....E.....E.....	297
Hol1168/95E.....E.....E.....E.....E.....E.....E.....E.....E.....E.....E.....E.....	297
Tun245/00E.....E.....E.....E.....E.....E.....E.....E.....E.....E.....E.....E.....	297
CHAb185/98E.....E.....E.....E.....E.....E.....E.....E.....E.....E.....E.....E.....	297
CHAb197/98E.....E.....E.....E.....E.....E.....E.....E.....E.....E.....E.....E.....	297
Hol1167/95E.....E.....E.....E.....E.....E.....E.....E.....E.....E.....E.....E.....	297
Cfgo232/98E.....E.....E.....E.....E.....E.....E.....E.....E.....E.....E.....E.....	297
CHAb236/98E.....E.....E.....E.....E.....E.....E.....E.....E.....E.....E.....E.....	297
Cfgo226/98E.....E.....E.....E.....E.....E.....E.....E.....E.....E.....E.....E.....	297
CHAb240/98E.....E.....E.....E.....E.....E.....E.....E.....E.....E.....E.....E.....	297
SC94/99E.....E.....E.....E.....E.....E.....E.....E.....E.....E.....E.....E.....	297
8264/00E.....E.....E.....E.....E.....E.....E.....E.....E.....E.....E.....E.....	297
8865/00E.....E.....E.....E.....E.....E.....E.....E.....E.....E.....E.....E.....	298
CHAb123/97E.....E.....E.....E.....E.....E.....E.....E.....E.....E.....E.....E.....	298
CHAb233/98E.....E.....E.....E.....E.....E.....E.....E.....E.....E.....E.....E.....	298
CHAb102/97E.....E.....E.....E.....E.....E.....E.....E.....E.....E.....E.....E.....	298
CH91-97E.....E.....E.....E.....E.....E.....E.....E.....E.....E.....E.....E.....	297
Tun53/00E.....E.....E.....E.....E.....E.....E.....E.....E.....E.....E.....E.....	298
CHAb198/98E.....E.....E.....E.....E.....E.....E.....E.....E.....E.....E.....E.....	298

Fig. 3. Alineamiento múltiple de las secuencias de aminoácidos de cepas de VSRH del subgrupo A que circularon en Cuba durante 1994-2000. Se indican los cambios de aminoácidos respecto a la secuencia Long.

CH18537	ICRITPOMEP	KMPTIKPPI	KPIPTIKNER	DPTIPAKME	KKIIITPTEK	PIIKTIERUT	SIGQSTVLD	IPRVIIOGO	ILIKSTIKEM	PSTQIIFAS	EPSTIKPN*	292
CHAb37/00T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....	295
CHAb42/00T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....	295
Tun50/00T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....	295
CHAb34/00T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....	295
CHAb43/00T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....	295
CHAb33/00T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....	295

Fig. 4. Alineamiento múltiple de las secuencias de aminoácidos de cepas de VSRH del subgrupo B que circularon en Cuba durante el año 2000. Se indican los cambios de aminoácidos respecto a la secuencia CH18537.

En general, se ha visto que los aislamientos del subgrupo A son más frecuentes que los del subgrupo B. En este estudio se detectó durante el año 2000 la circulación de virus perteneciente al subgrupo B. Las cepas de este subgrupo se agruparon filogenéticamente en 2 genotipos diferentes. A diferencia de lo ocurrido en el subgrupo A, los aislamientos de este grupo se agruparon muy distantes de las cepas prototipos (CH18537 y Su8/60) y del resto de las cepas antiguas. Los aislamientos cubanos pertenecientes a ambos genotipos se agruparon con virus que circularon durante ese mismo período de 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 este continente a finales de la década de los años 90. No obstante, durante ese año se detectó una cepa cuya secuencia nucleotídica fue similar a la de la cepa Long, es decir, a pesar de que nuevas variantes se han introducido en Cuba, genotipos antiguos continúan circulando a bajos niveles.

Han sido descritas diferentes longitudes para la proteína G de ambos subgrupos.^{23,24} En este estudio todas las secuencias cubanas pertenecientes al subgrupo B presentaron una proteína de 295 aa con 2 codones diferentes de parada (UAG y UAA). Sin embargo, dentro de las cepas del grupo A se observaron 2 tamaños de proteína (297 aa y 298 aa) con un solo codón de parada (UAG). Los cambios en el codón de parada han sido asociados con importantes variaciones antigénicas encontradas en mutantes de escape en VSRH, los cuales fueron seleccionados con anticuerpos monoclonales que reconocen epítopes específicos de cepas.¹³ El análisis filogenético mostró que existe una correlación entre la posición del virus en el árbol y el tamaño de su proteína G. Resultados similares fueron encontrados por otros autores.²³⁻²⁵

Haciendo un análisis del patrón epidemiológico descrito para el VSRH y comparándolo con los resultados en este trabajo, se puede apreciar que los aislamientos cubanos poseen características singulares: Hasta el año 1999 solo se detectó la circulación de cepas pertenecientes al subgrupo A. La mayoría de los aislamientos analizados se agruparon con cepas que circularon varios años

atrás, 2 de estos aislamientos fueron muy similares a Long. Cepas con secuencias muy similares circularon durante 4 años en casi todas las provincias. Por tanto, para los aislamientos cubanos pertenecientes al subgrupo A se observó poca variabilidad genética del tercio C-terminal del gen de la proteína G. Durante el año 2000 se detectó la circulación de ambos subgrupos. Casi todas las cepas que circularon durante el año 2000 se agruparon filogenéticamente con cepas de Sudáfrica del mismo período de tiempo. Todas las cepas analizadas del subgrupo B se agruparon muy distantes de las cepas antiguas.

De forma general, las epidemias de VSRH ocurren durante los meses de invierno en las regiones con clima templado¹³ y durante las estaciones de lluvias en las regiones con clima tropical.²⁶ Hasta la fecha pocos han sido los estudios para conocer la epidemiología de este virus en países en vías de desarrollo y de clima tropical. En Cuba, a pesar de ser un país tropical, se ha visto que la circulación del VSRH ocurre durante los meses de invierno y puede extenderse hasta la primavera, con períodos cortos o largos interepidémicos.²⁷ En este sentido se puede decir, que Cuba tiene condiciones climáticas, geográficas y socioeconómicas únicas, las cuales pudieran estar influyendo en la circulación y evolución del VSRH.

SUMMARY

The nucleotide sequencing of the protein G C-terminal region of 37 samples taken from nasopharyngeal washings of under one-year old children from some Cuban provinces was made for 5 epidemic periods (1995-2000) to find out the circulation patterns of strains of human respiratory syncytial virus that is classified in two antigenic subgroups known as A and B; each of them contains multiple variants. Subgroup A has circulated during all these years but subgroup B was detected only in the year 2000. The presence of strains with two different sizes of protein G (297 aa and 298 aa) was observed whereas subgroup B showed only one size (295 aa). Phylogenetic analysis allowed identifying 5 and 2 genotypes within subgroups A and B respectively. Viruses present in Cuba were phylogenetically related to the strains of other parts of the world. Subgroup A comprised two strains very similar to Long prototype strain. Almost all the strains of both subgroups in the year 2000 phylogenetically related with strains that circulated in South Africa during the same period.

Key words: Human respiratory syncytial virus, nucleotide sequencing of the protein G C-terminal, antigenic subgroups A and B.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Brandenburg AH, Neijens HJ, Osterhaus AD. Pathogenesis of RSV lower respiratory tract infection: implications for vaccine development. *Vaccine* 2001;19:2769-82.
2. Dudas RA, Karron RA. Respiratory syncytial virus vaccines. *Clin Microbiol Rev* 1998;11:430-9.
3. Shay DK, Holman RC, Newman RD, Liu LL, Stout JW, Anderson LJ. Bronchiolitis-associated hospitalizations among US children, 1980-1996. *Jama* 1999;282:1440-6.
4. Zambon MC, Stockton JD, Clewley JP, Fleming DM. Contribution of influenza and respiratory syncytial virus to community cases of influenza-like illness: an observational study. *Lancet* 2001;358:1410-6.
5. Englund JA, Anderson LJ, Rhame FS. Nosocomial transmission of respiratory syncytial virus in immunocompromised adults. *J Clin Microbiol* 1991;29:115-9.
6. Falsey AR, McCann RM, Hall WJ, Tanner MA, Criddle MM, Formica MA, et al. Acute respiratory tract infection in daycare centers for older persons. *J Am Geriatr Soc* 1995;43:30-6.
7. Collins CL, Pollard AJ. Respiratory syncytial virus infections in children and adults. *J Infect* 2002;45:10-7.
8. Cane PA, Pringle CR. Respiratory syncytial virus heterogeneity during an epidemic: analysis by limited nucleotide sequencing (SH gene) and restriction mapping (N gene). *J Gen Virol* 1991;72(Pt 2):349-57.
9. Cane PA, Pringle CR. Evolution of subgroup A respiratory syncytial virus: evidence for progressive accumulation of amino acid changes in the attachment protein. *J Virol* 1995;69:2918-25.
10. Sullender WM, Mufson MA, Anderson LJ, Wertz GW. Genetic diversity of the attachment protein of subgroup B respiratory syncytial viruses. *J Virol* 1991;65:5425-34.
11. Sullender WM. Respiratory syncytial virus genetic and antigenic diversity. *Clin Microbiol Rev* 2000;13:1-15.
12. Johnson PR, Spriggs MK, Olmsted RA, Collins PL. The G glycoprotein of human respiratory syncytial viruses of subgroups A and B: extensive sequence divergence between antigenically related proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1987;84:5625-9.
13. 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(Pt 10): 2411-8.
14. Hierholzer JC, Tannock GA, Hierholzer CM, Coombs RA, Kennett ML, Phillips PA, et al. Subgrouping of respiratory syncytial virus strains from Australia and Papua New Guinea by biological and antigenic characteristics. *Arch Virol* 1994;136:133-47.
15. Valdes O, Martinez I, Valdivia A, Cancio R, Savon C, Goyenechea A et al. Unusual antigenic and genetic characteristics of human respiratory syncytial viruses isolated in Cuba. *J Virol* 1998;72:7589-92.
16. 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(Pt 9):2221-9.
17. Peret TC, Hall CB, Hammond GW, Piedra PA, Storch GA, Sullender WM, et al. 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.
18. Madhi SA, Venter M, Alexandra R, Lewis H, Kara Y, Karshagen WF, et al. Respiratory syncytial virus associated illness in high-risk children and national characterisation of the circulating virus genotype in South Africa. *J Clin Virol* 2003;27:180-9.
19. Cane PA, Weber M, Sanneh M, Dackour R, Pringle CR, Whittle H. Molecular epidemiology of respiratory syncytial virus in The Gambia. *Epidemiol Infect* 1999;122:155-60.
20. 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.
21. Christensen LS, Larsen LB, Johansen J, Andersen EA, Wejse C, Klug B, et al. The fluctuating pattern of various genome types of respiratory syncytial virus in Copenhagen and some other locations in Denmark. *Apmis* 1999;107: 843-50.
22. 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.
23. García O, Martín M, Dopazo J, Arbiza 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.
24. Martínez I, Dopazo J, Melero JA. Antigenic structure of the human respiratory syncytial virus G glycoprotein and relevance of hypermutation events for the generation of antigenic variants. *J Gen Virol* 1997;78 (Pt 10):2419-29.
25. Martínez I, Valdes O, Delfraro A, Arbiza J, Russi J, Melero JA. Evolutionary pattern of the G glycoprotein of human respiratory syncytial viruses from antigenic group B: the use of alternative termination codons and lineage diversification. *J Gen Virol* 1999;80(Pt 1):125-30.
26. Weber MW, Mulholland EK, Greenwood BM. Respiratory syncytial virus infection in tropical and developing countries. *Trop Med Int Health* 1998;3:268-80.
27. Goyenechea A, Bello M, Clua A, Savon C, Valdivia A, Oropesa S et al. [Determination of complement-fixing antibodies to respiratory syncytial virus. Longitudinal study in a population of less than 1 year of age in the City of Havana]. *Rev Cubana Med Trop* 1994;46:79-85.

Recibido: 2 de octubre de 2003. Aprobado: 16 de enero de 2004.
 Lic. *Odalys Valdés Ramírez*. Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí". Apartado 601, Marianao 13, Ciudad de La Habana, Cuba. Teléf: 2020426. Correo electrónico: odalys@ipk.sld.cu