

**INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL “PEDRO KOURÍ”
SUBDIRECCIÓN DE MICROBIOLOGÍA
DEPARTAMENTO DE VIROLOGÍA**

**CARACTERIZACIÓN ANTIGÉNICA Y MOLECULAR
DEL VIRUS SINCITAL RESPIRATORIO HUMANO,
CUBA 1994-2000.**

Tesis presentada en opción al grado científico de
Doctor en Ciencias de la Salud.

Autor: Lic. Odalys Valdés Ramírez, MSc.

Asesores: Prof. Angel Goyenechea Hernández, MD.
Dra. Clara Savón Valdés, PhD.

**Ciudad Habana
2004**

Los que se enamoran de la práctica prescindiendo de la ciencia son como pilotos que toman un navío sin timón ni brújula, de forma que nunca tienen seguridad de la ruta seguida. La práctica debe ser edificada siempre sobre una buena teoría”

Leonardo de Vinci

Agradecer es entregar el corazón satisfecho de saber quien te rodea, sabes que existes y es capaz de ayudarte... a mis amigos.

Agradezco aquellas personas que con su inmenso cariño y su infinita devoción dedicaron parte de su valioso tiempo para supervisar, revisar apoyar este proyecto que hoy presento.

Al Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí" por haber ayudado en mi formación profesional y dentro de el, al departamento de Virología que padeció conmigo cada momento de tensión.

También agradezco a la naturaleza que a través de mis padres me formó y su vez hizo que en mi se formara esas dos pequeñas semillas, mis hijos, y a los cuales agradezco en compañía de mi esposo toda la inmensa paciencia, que nunca superarían para conmigo a lo largo de todo el tiempo que duró la preparación y exposición de esta tesis.

A todos estos y a aquellos que pueda haber olvidado. Gracias.

SÍNTESIS

Se estudió la variabilidad antigénica y genética de la glicoproteína G de 31 cepas de Virus Sincitial Respiratorio Humano aisladas de niños menores de un año, en la Ciudad de la Habana (1994–1998). Las cepas que circularon entre 1994 y 1996 mostraron la misma secuencia nucleotídica, fueron muy similares a la cepa prototipo Long y reaccionaron con los anticuerpos monoclonales específicos de esta. Las secuencias nucleotídicas de las cepas del período 1997-1998 fueron parecidas a la de la cepa Mon3/88 y reaccionaron con los anticuerpos monoclonales específicos de esta. Todas las cepas aisladas pertenecieron al subgrupo antigénico A. Por otro lado, se analizó la variabilidad genética del tercio carboxi-terminal de la glicoproteína G de 33 exudados nasofaríngeos de niños menores de un año provenientes de 6 provincias de Cuba (1995-2000). El subgrupo A circuló durante todos los años, el subgrupo B se detectó solamente durante el año 2000. Dentro del subgrupo A se encontraron nuevamente dos muestras, cuyas secuencias nucleotídicas fueron muy similares a la cepa Long. En los virus analizados (1994-2000) pertenecientes al subgrupo A, se observó la presencia de virus con dos tamaños diferentes de la glicoproteína G (297 aa y 298 aa), mientras que para el subgrupo B, fue observado un único tamaño (295aa). Los virus cubanos se relacionaron filogenéticamente con cepas de otras partes del mundo. El análisis filogenético, permitió identificar 5 y 2 genotipos dentro de los subgrupos A y B, respectivamente.

ABREVIATURAS

Acido desoxirribonucleico	ADN
Acido ribonucleico	ARN
Ácido ribonucleico mensajeros	ARNm
Acido ribonucleico viral	ARNv
Agente de la coriza del chimpancé”	CCA
Aminoácido	aa
Amino-terminal	N-terminal
Anticuerpos	Acs
Anticuerpos Monoclonales	AcMs
Asparagina	Asn
Capping	CAP
Carboxi-terminal	C-terminal
Células asesinas naturales	NK
Complejo mayor de histocompatibilidad	MHC
Copia del ácido desoxirribonucleico	cADN
Efecto citopático	ECP
Factor de necrosis tumoral α	TNF- α
Fosfoproteína	P
Gene end	GE
Gene start	GS
Infección respiratoria aguda	IRA
Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kouri”	IPK
Instituto de Salud Carlos III	ISCIII
Interferon γ	IFN- γ
Interleuquina	IL
Linfocitos T citotóxicos	CTLs
Marco de lectura abierto	ORF
Medio mínimo esencial	MEM
Metapneumovirus humano	hMPV
Nucleoproteína	N
Organización Mundial de la Salud	OMS

Pares de bases	pb
Patrón 1 de citoquinas de células T cooperadoras	Th1
Patrón 2 de citoquinas de células T cooperadoras	Th2
Pneumovirus aviar	APV
Polimerasa	L
Polimorfismo de Longitud de Fragmentos de Restricción	RFLP
Glicoproteína de fusión	F
Glicoproteína de unión al receptor	G
Prolina	P
Proteína matriz	M
Proteína pequeña hidrofóbica	SH
Proteínas no estructurales	NS1 y NS2
Revoluciones por minutos	r.p.m
Reguladores de la activación de las célula T normal expresadas y secretadas	RANTES
Ribonucleasas	RNAsa
Serina	Ser
Suero bovino fetal	SBF
Transcripción Reversa y Reacción en Cadena de la Polimerasa	TR-RCP
Reacción en Cadena de la Polimerasa anidada	RCP anidada
Treonina	Thr
Virus pneumonía del ratón	PVM
Virus sincitial respiratorio bovino	VSRB
Virus sincitial respiratorio humano	VSRH
Virus vaccinia recombinante que expresa la proteína F	rVV-F
Virus vaccinia recombinante que expresa la proteína G	rVV-G

TABLA DE CONTENIDO

I	INTRODUCCIÓN.	1
<i>I. 1</i>	<i>Hipótesis.</i>	4
<i>I. 2</i>	<i>Objetivos.</i>	4
<i>I. 3</i>	<i>Novedad científica.</i>	4
<i>I. 4</i>	<i>Valor Práctico</i>	5
<i>I. 5</i>	<i>Valor Teórico</i>	5
II	REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.	6
<i>II. 1</i>	<i>Clasificación.</i>	6
<i>II. 2</i>	<i>Proteínas virales.</i>	7
<i>II. 3</i>	<i>Genoma.</i>	13
<i>II. 4</i>	<i>Manifestaciones clínicas.</i>	15
<i>II. 5</i>	<i>Patogenia y Patología.</i>	17
<i>II. 6</i>	<i>Respuesta inmune frente a la infección por VSRH.</i>	20
<i>II. 7</i>	<i>Tratamiento, prevención, control y vacunas.</i>	22
<i>II. 8</i>	<i>Epidemiología.</i>	24
<i>II. 9</i>	<i>Variabilidad antigénica y genética.</i>	26
<i>II. 10</i>	<i>Epidemiología molecular.</i>	29
<i>II. 11</i>	<i>Evolución del VSRH.</i>	34
III	MATERIALES Y MÉTODOS.	38
<i>III. 1</i>	<i>Cepas de VSRH.</i>	39
<i>III. 2</i>	<i>Muestras clínicas.</i>	40
<i>III. 3</i>	<i>Cepas controles.</i>	40
<i>III. 4</i>	<i>Línea celular.</i>	40
<i>III. 5</i>	<i>Anticuerpos monoclonales.</i>	41
<i>III. 6</i>	<i>Oligonucleótidos.</i>	41
<i>III. 7</i>	<i>Reactivación de los aislamientos en cultivo celular</i>	42
<i>III. 8</i>	<i>Obtención de extractos proteicos.</i>	42
<i>III. 9</i>	<i>Caracterización antigénica mediante el DOT ELISA.</i>	42
<i>III. 10</i>	<i>Extracción de ARN.</i>	43

III. 11	<i>Transcripción reversa y reacción en cadena de la polimerasa.</i>	43
III. 12	<i>Reacción en cadena de la polimerasa anidada.</i>	44
III. 13	<i>Detección del producto amplificado.</i>	44
III. 14	<i>Purificación del producto amplificado.</i>	45
III. 15	<i>Secuenciación nucleotídica automatizada.</i>	45
III. 16	<i>Purificación del producto de secuencia.</i>	46
III. 17	<i>Métodos empleados para analizar y comparar secuencias.</i>	47
III. 18	<i>Secuencias de cepas VSRH empleadas.</i>	47
IV	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.	49
IV. 1	<i>Variabilidad antigénica y genética de la glicoproteína G De cepas del VSRH aisladas en la Ciudad de la Habana desde 1994 hasta 1998.</i>	49
IV. 1. 1	<i>Caracterización antigénica de la glicoproteína G por reactividad frente a un panel de AcMs.</i>	49
IV. 1. 2	<i>Caracterización genética de la glicoproteína G por secuenciación nucleotídica.</i>	53
IV. 1. 3	<i>Relación entre la variabilidad genética y antigénica de cepas de VSRH del subgrupo A aisladas entre 1994 y 1998.</i>	57
IV. 2	<i>Variabilidad genética del tercio C-terminal de la glicoproteína G del VSRH en muestras clínicas provenientes de 6 provincias de Cuba desde 1995 hasta el 2000.</i>	60
IV. 2. 1	<i>Detección y clasificación del VSRH por PCR y secuenciación nucleotídica del tercio C-terminal de la glicoproteína G</i>	60
IV. 2. 2	<i>Análisis de la variabilidad genética del tercio C-terminal de la glicoproteína G del VSRH.</i>	63
IV. 2. 3	<i>Cambios genéticos en el tercio C-terminal del gen de la glicoproteína G de los virus que circularon en 6 provincias de Cuba entre los años 1995 y 2000</i>	70
IV. 3	<i>Relación filogenética entre los virus de Cuba. Comparación con cepas de otras regiones geográficas.</i>	72
V	DISCUSIÓN GENERAL.	83
VI	CONCLUSIONES.	88
VII	RECOMENDACIONES.	89
VIII	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.	90
	ANEXOS	

I. INTRODUCCIÓN

Las infecciones respiratorias agudas (IRA), son la primera causa de morbilidad y una de las principales causas de mortalidad de niños en todos los países del mundo. La mortalidad en la población infantil menor de 5 años es relevante, tan es así, que según el informe de la Organización Mundial de la Salud (OMS) alrededor de un tercio de las defunciones ocurridas en 1996 se atribuye a estas enfermedades (Wessembasher and Avila, 1997).

Los virus se reconocen como los agentes etiológicos predominantes en las IRA, tanto en la patología infantil como en la de adultos, considerándose que estos son la causa del 95% ó más de las rinofaringitis, laringotraqueobronquitis y bronquiolitis (Shay et al., 1999).

Dentro de las causas virales de enfermedades respiratorias, un lugar preponderante lo ocupa el Virus Sincitial Respiratorio Humano (VSRH). En Estados Unidos, este virus es el responsable de las hospitalizaciones de más de 125 000 niños y de la muerte de 450 niños anualmente (Black, 2003). Mucho menos es conocido, acerca de las epidemias de este virus en países en vías de desarrollo. No obstante, se ha estimado, que un tercio de todos los niños fallecidos menores de cinco años, es debido a las infecciones del tracto respiratorio bajo, siendo el VSRH, el responsable del 96 % de los casos hospitalizados por infecciones virales (Weber et al., 2002).

El VSRH es uno de los patógenos más importantes que causa infección en el tracto respiratorio en niños pequeños (Shay et al., 1999; Zambon et al., 2001; Thompson et al., 2003). Además, se ha visto que este virus produce infecciones respiratorias graves en ancianos y en pacientes inmunocomprometidos (Falsey and Walsh, 2000; Collins and Pollard, 2002). La distribución del mismo es mundial, 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 (Cane, 2001). Sin embargo, se conoce muy poco acerca de la infección con este virus en países subdesarrollados, en los cuales, el patrón epidemiológico del virus pudiera seguir un comportamiento diferente (Weber et al., 1998).

Dos subgrupos antigénicos A y B, han sido identificados en base a su reacción frente a un panel de anticuerpos monoclonales (AcMs) (Anderson et al., 1985a; Mufson et al., 1988). Esta clasificación fue confirmada más tarde por análisis de la secuencia nucleotídica (Cristina et al., 1990; Cane et al., 1991). Se ha visto que durante una epidemia ambos subgrupos pueden co-circular, sin embargo, el subgrupo A, ha sido identificado más frecuentemente que el subgrupo B (Cane, 2001). También se ha observado en cada epidemia, la circulación de múltiples genotipos dentro de cada subgrupo, con un reemplazamiento del genotipo predominante cada año (Peret et al., 1998; Cane, 2001; Choi et al., 2001).

Los estudios de variabilidad genética, se han focalizado en la glicoproteína G, debido a su elevada capacidad para diferenciar cepas que pudieran ser idénticas en otros productos génicos. De este modo, diferentes investigadores han descrito, que cepas muy similares genéticamente, pueden circular en diferentes partes del mundo durante el mismo período (Garcia et al., 1994; Sanz et al., 1994; Cane and Pringle, 1995a). También se ha visto, que virus aislados en lugares geográficamente distantes y en diferentes años pueden estar genéticamente más relacionados que virus aislados en un mismo lugar durante dos días consecutivos (Melero et al., 1997).

Este virus presenta dos características importantes a tener en cuenta para el desarrollo de una vacuna: en primer lugar, éste es capaz de infectar a niños en presencia de anticuerpos (Acs) maternos y en segundo lugar, causa infecciones repetidas a lo largo de la vida (Cane, 2001). La capacidad del virus para causar reinfecciones, pudiera deberse a una respuesta inmune inadecuada o a la variabilidad del virus (Hall et al., 1991).

La glicoproteína G, es el principal componente en la respuesta inmune protectora del virus, presentando un alto número de sustituciones nucleotídicas que conllevan cambios aminoacídicos. Estos cambios producen alteraciones en los epítomos y por tanto permite que el virus escape de la inmunidad pre-existente (Hall et al., 1991; Sullender et al., 1998).

Por todo lo anteriormente planteado, nos hemos centrado en la glicoproteína G del VSRH, para realizar estudios de variabilidad antigénica y genética, en virus que han circulado en 6 provincias de Cuba desde 1994 hasta el 2000. Con estos estudios obtendríamos información, acerca de los genotipos que circulan en nuestro país y su relación filogenética con los que circulan en el mundo. Por otro lado nos permitirá profundizar en el conocimiento de dicha proteína, la cual es uno de los antígenos inductores de la respuesta inmune protectora con el objetivo de contribuir al desarrollo de futuras vacunas.

En el presente estudio, se realizará la caracterización antigénica con AcMs de la glicoproteína G, así como, la caracterización genética del gen de esta misma proteína, utilizando la tecnología de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (RCP) para la detección de VSRH y su posterior utilización en el análisis molecular por secuenciación nucleotídica. Estos datos serán útiles para subtipar, genotipar y realizar estudios de epidemiología molecular por análisis filogenéticos.

1.1. HIPÓTESIS.

Mediante la caracterización antigénica y genética de la glicoproteína G del VSRH, pudiera conocerse la variabilidad de virus circulante en Cuba y su relación filogenética con las cepas que circulan en el mundo.

Para confirmar esta hipótesis nos trazamos los siguientes objetivos.

1.2 OBJETIVOS.

Objetivo general.

- Realizar la caracterización del VSRH en Cuba, mediante la utilización de técnicas de avanzadas, con el objetivo de contribuir al conocimiento de la variabilidad de este virus en nuestro país.

Objetivos específicos.

- Caracterizar antigénicamente y genéticamente la glicoproteína G de cepas del VSRH, aisladas en la Ciudad de La Habana desde 1994 hasta 1998.
- Caracterizar genéticamente el tercio C-terminal del gen de la glicoproteína G del VSRH de muestras clínicas, provenientes de 6 provincias de Cuba desde 1995 hasta el 2000.
- Analizar la relación filogenética entre los virus que circularon en Cuba en el período 1994-2000 y los que circularon en el resto del mundo.

1.3. NOVEDAD CIENTÍFICA.

Dentro de los aspectos novedosos se destacan: La caracterización antigénica del gen de la glicoproteína G, utilizando un amplio panel de AcMs y la caracterización genética del mismo gen por secuenciación nucleotídica del VSRH en Cuba. La introducción de programas computarizados útiles, para realizar análisis de secuencias y para los estudios de filogenética molecular. Este tipo de estudio aplicado al VSRH es la primera vez que se realiza en nuestro país y en el Caribe. Es muy importante mantener estos estudios, con el objetivo de conocer si en epidemias futuras aparecen nuevas variantes o se mantienen las mismas cepas.

Este tipo de análisis, permitirá hacer una valoración de la estrategia a seguir en el diseño de futuras vacunas contra este importante patógeno.

1.4. VALOR PRÁCTICO.

Los resultados obtenidos, permitieron la introducción de nuevas tecnologías de trabajo de última generación y de programas computarizados útiles para la caracterización de cepas de VSRH que circulan en nuestro país. Gracias a estos resultados, el Laboratorio Nacional de Referencia de Virus Respiratorios del Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kouri” (IPK), cuenta con las herramientas necesarias para realizar estudios de Epidemiología y Evolución Molecular de este virus en Cuba.

1.5. VALOR TEÓRICO.

Los resultados obtenidos en este trabajo, tienen gran valor teórico, pues permite conocer las características antigénicas y genéticas de las cepas que están circulando en Cuba y su relación filogenética con las que circulan en otras regiones del mundo.

Los resultados que conforman esta tesis se presentaron en 4 eventos científicos y están publicados en 8 artículos científicos en revistas nacionales (2) y extranjeras (6), parte de estos resultados están publicados en el capítulo 68 del libro Microbiología y Parasitología Médicas (Premio de la Crítica Científico-Técnico 2001, Premio Anual de la Salud 2002 y Ponencia Destacada XIV Forum Nacional de Ciencia y Técnica 2003). Los resultados de este trabajo forman parte de un Resultado Relevante del IPK (1998, 2004) y de un Logro de la Academia de Ciencias de Cuba (1999): Epidemiología Molecular del VSR en Cuba.

II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.

El VSRH es el agente causal más importante de las infecciones del tracto respiratorio inferior en lactantes y en niños de corta edad, produciendo neumonías y bronquiolitis (Dudas and Karron, 1998; Shay et al., 1999; Brandenburg et al., 2001; Zambon et al., 2001). Este virus fue aislado en 1956 del tracto respiratorio de un chimpancé que padecía de coriza durante un brote de enfermedad semejante al resfriado común, por lo que fue originalmente llamado “agente de la coriza del chimpancé” (CCA) (Morris et al., 1956). Posteriormente, Chanock y colaboradores en 1957 aislaron virus indistinguibles serológicamente (neutralización por sueros anti-CCA) y fenotípicamente (efecto citopático) del CCA, en dos niños hospitalizados por bronconeumonía y laringotraqueobronquitis, respectivamente. A partir de entonces, el virus fue denominado “Virus Sincitial Respiratorio”, denotando sus manifestaciones clínicas y su habilidad para formar sincitios en células en cultivos. Además, se ha visto que este virus produce infecciones respiratorias graves en ancianos y pacientes inmunodeprimidos (Murry and Dowell, 1997; Falsey and Walsh, 2000; Collins and Pollard, 2002; Piedra, 2003).

El VSRH es el responsable de la muerte de aproximadamente cinco millones de personas anualmente en todo el mundo, por lo que la OMS lo considera un patógeno de interés para el desarrollo de nuevas vacunas, ya que no existe ningún tratamiento antiviral específico. En los últimos años se ha visto que el uso de AcMs humanizados de origen murino como profilaxis, reduce la hospitalización de niños con alto riesgo, no obstante, la utilización de este tratamiento es excesivamente costoso (Stensballe and Kristensen, 2002; Lacaze-Masmonteil et al., 2003; Paes, 2003).

II.1. Clasificación.

El VSRH está clasificado dentro del Orden *Mononegavirales* y pertenece a la Familia *Paramyxoviridae*, la cual posee las siguientes características: (i) el genoma está formado por una cadena única de ácido ribonucleico (ARN) de polaridad negativa (no segmentado), que se encuentra en el interior de una

nucleocápside helicoidal, que hace al ARN resistente a la digestión con ribonucleasas (RNAsa), y que contiene la polimerasa viral; (ii) el genoma es transcrito por la acción de la polimerasa, que para y reinicia la síntesis de ARN, obedeciendo a señales que actúan en *cis*, dando lugar a la formación de ARN mensajeros (ARNm) subgenómicos; (iii) el ciclo viral replicativo es citoplasmático; (iv) los viriones adquieren una envoltura lipídica que procede de la membrana plasmática y (v) la entrada en la célula huésped está mediada por fusión de las membranas viral y celular (Collins et al., 2001).

La familia *Paramyxoviridae* contiene a su vez dos subfamilias: *Paramyxovirinae*, en donde se incluyen el virus Sendai, del Sarampión, virus de la enfermedad de Newcastle, SV5, virus de Parainfluenza humanos y otros; y *Pneumovirinae*, que posee dos géneros, el *Pneumovirus*, representado por el VSRH, así como los virus Sincitiales Respiratorios Bovino, Ovino y Caprino y el de la Neumonía del Ratón (PVM); y un segundo género, el *Metapneumovirus*, representado por el Pneumovirus Aviar (APV), también denominado virus de la rinotraqueítis del pavo y el Metapneumovirus humano (hMPV) (Collins et al., 2001).

Los pneumovirus se distinguen de los paramixovirus en que su nucleocápside tiene un diámetro menor, codifica entre 8 y 10 ARNm en comparación con los 6-7 de otros paramixovirus, por lo que la organización genómica es más compleja, y por la presencia de la glicoproteína G, que media la unión al receptor y carece de actividad de hemaaglutinación y neuraminidasa (Collins and Mottet, 1991).

II.2. Proteínas virales.

Las partículas virales, están constituidas por una nucleocápside helicoidal cubierta de una envoltura lipoproteica, que el virus adquiere al salir de la célula por gemación. Esta envoltura contiene tres glicoproteínas transmembranales, la proteína de unión al receptor o **glicoproteína G**, la proteína de fusión o **glicoproteína F**, y una proteína pequeña hidrofóbica o **proteína SH**, de función todavía desconocida. La proteína **matriz (M)**, forma una cubierta proteica en la cara interna de la envoltura. Las glicoproteínas están organizadas por separado en espículas virales, que se visualizan como proyecciones cortas (11-20 nm) y poco

separadas entre sí (6-10 nm). La nucleocápsida es una hélice simétrica en la que está el ácido ribonucleico viral (ARNv) asociado con la **nucleoproteína (N)**, la **fosfoproteína (P)**, un factor antiterminador de la transcripción (**M2 ó 22K**), y la **polimerasa (L)** (Collins et al., 2001) (Figura 1).

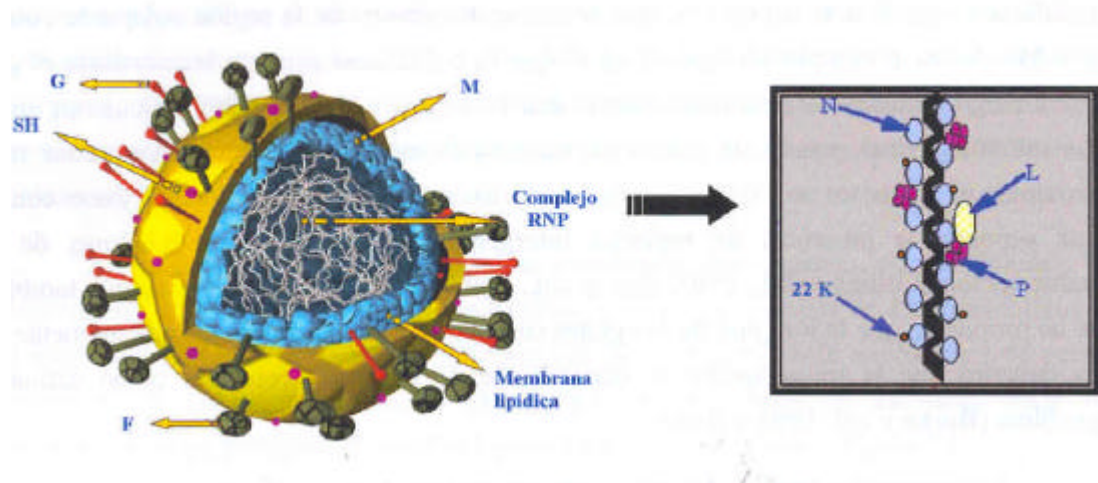


Figura 1. Representación esquemática de la estructura del VSRH. Se señala la localización de las distintas proteínas que componen el virus.

Nucleoproteína (N): Es la proteína principal de la nucleocápsida y es ligeramente básica. Se localiza con las proteínas P y M2 (22K), en inclusiones citoplasmática presentes en células infectadas con el virus o transfectadas con plásmidos que expresan los genes correspondientes. El complejo N-ARN es el molde funcional para la transcriptasa y replicasa viral (Garcia et al., 1993; Garcia-Barreno et al., 1996).

Fosfoproteína (P): Es ácida e hidrofílica, y está fosforilada en residuos de serina (Ser) localizados principalmente en las zonas central y carboxi-terminal (C-terminal) de la molécula (Lopez et al., 1988; Mazumder et al., 1994; Villanueva et al., 1994; Sanchez-Seco et al., 1995; Lopez et al., 1998). El extremo C-terminal de la proteína P es esencial para la interacción con la proteína N. La fosfoproteína es un cofactor esencial de la ARN polimerasa viral (Garcia-Barreno et al., 1996).

Proteína L: Esta proteína se le atribuye la actividad de ARN polimerasa dependiente de ARN del VSRH. Esta es muy similar en longitud a las polimerasas

de otros virus ARN de genoma no segmentado y polaridad negativa, y el alineamiento de aminoácidos, pone de manifiesto una alta homología en las secuencias de las polimerasas de otros paramixovirus y rbdovirus. Es básica y relativamente hidrofóbica, con un alto contenido de leucina e isoleucina (Collins et al., 2001).

Proteína matriz (M): Proteína no glicosilada que se localiza en la cara interna de la envoltura viral. Es relativamente básica y posee un dominio hidrofóbico en el tercio C-terminal de la molécula que media la interacción con la membrana (Collins et al., 2001). Se piensa que tiene dos funciones generales (i) mantener la nucleocápsida transcripcionalmente inactiva antes del empaquetamiento, y (ii) mediar la asociación de la nucleocápsida con la envoltura naciente (Teng and Collins, 1998).

Proteína M2 o 22K: Es muy básica y relativamente hidrofílica. Se localiza con las proteínas N y P en los cuerpos de inclusión citoplasmáticos presentes en las células infectadas por el VSRH (Routledge et al., 1987; Garcia et al., 1993).

El gen M2 contiene dos marcos de lectura abiertos (ORF) que se solapan en 32 nucleótidos. El producto del primer marco de lectura, denominado 22K (ORF-1), da lugar a un polipéptido de **22K** de peso molecular. La segunda fase de lectura, **M2-2** (ORF-2), codifica para una proteína más pequeña que recientemente se ha encontrado en extractos de células infectadas, aunque no se sabe todavía si se incorpora al virión (Ahmadian et al., 2000).

La proteína 22K es un antiterminador de la transcripción, y es esencial para la viabilidad del virus (Collins et al., 1996; Hardy and Wertz, 1998; Collins et al., 1999; Fearn and Collins, 1999b; Hardy et al., 1999), mientras que la M2-2 parece actuar como factor regulador implicado en el equilibrio entre la replicación y la transcripción de ARN (Birmingham and Collins, 1999).

Proteínas no estructurales NS1 y NS2: Se consideran no estructurales, porque no se han encontrado en virus maduros, aunque abundan en células infectadas (Collins et al., 2001). La NS1 precipita con la proteína M (Evans et al., 1996),

mientras que la NS2 se localiza en las células con la proteína N, pero no co-precipita con ninguna proteína viral, aunque ambas parecen formar homooligómeros (Weber et al., 1995; Evans et al., 1996). La NS1 es un inhibidor de la síntesis de ARNv, aunque esa inhibición no es específica sólo del VSRH, por tanto, se desconoce cuál es su verdadera función. Estas dos proteínas han sido recientemente identificadas como antagonistas del interferon α/β (Schlender et al., 2000).

Proteína SH: Es una proteína de membrana ligeramente básica, con una larga región hidrofóbica central y dos sitios potenciales de glicosilación, uno a cada extremo de la proteína. Se acumula en células infectadas en cuatro formas diferentes (SH₀, SH_t, SH_g y SH_p), dos de ellas glicosiladas (SH_g y SH_p). La función de esta proteína es todavía desconocida, aunque algunos trabajos implican a la proteína SH, junto con las glicoproteínas F y G, en la formación de sincitios en las células infectadas (Heminway et al., 1994; Pastey and Samal, 1997), a pesar de que la delección de este gen no afecta a la viabilidad del virus en cultivo (Bukreyev et al., 1997). Experimentos donde se expresaba la proteína SH en bacteria, aumentaban la permeabilidad de la membrana bacteriana a compuestos de bajo peso molecular. Este resultado sugiere, que la proteína SH podría estar implicada en desestabilizar la membrana de la célula infectada (Perez et al., 1997).

Glicoproteína F: Media la penetración del virus en la célula por fusión de sus membranas, permitiendo la entrada de la nucleocápsida en el citoplasma de la célula huésped (Srinivasakumar et al., 1991). Es una glicoproteína tipo I, que se inserta en la membrana por la región hidrofóbica C-terminal. Así mismo, la glicoproteína F, media la fusión de la membrana de la célula infectada con las células adyacentes, dando lugar a la propagación del virus y a la formación de sincitios (Walsh and Hruska, 1983). Esta proteína se sintetiza como un precursor inactivo F₀, el mismo es procesado proteolíticamente por una proteasa celular, dando lugar a dos subunidades F₁ y F₂ que quedan unidas covalentemente por puentes disulfuro, antes de alcanzar la superficie celular (Collins et al., 2001).

Glicoproteína G: Es la responsable de la unión del virus al receptor celular en las primeras etapas del ciclo infeccioso (Sullender et al., 1991). No comparte homologías de secuencia con otros paramixovirus y carece de actividades hemaglutinina y neuraminidasa. La secuencia de nucleótidos del gen de la glicoproteína G, predice un polipéptido de 292-299 aa dependiendo de la cepa. Está altamente glicosilada y tiene una estructura no globular, cuyo ectodominio tiene similitud con las mucinas (Wertz et al., 1989).

Es una glicoproteína transmembrana tipo II, con una región hidrofóbica cerca del extremo amino-terminal (N-terminal), que le sirve tanto de péptido señal como de anclaje a la membrana, dejando en el extremo C-terminal, dos terceras partes de la molécula orientadas hacia el exterior. La glicoproteína G también se sintetiza como forma soluble debido a la iniciación de la traducción en un segundo codón de iniciación, que está en fase con el primero, situado en el aminoácido (aa) 48, el cual se encuentra dentro de la región hidrofóbica (Hendricks et al., 1988; Roberts et al., 1994) (Figura 2).

Aproximadamente, entre el 16 y el 20% del total de las moléculas de glicoproteína G sintetizadas en cultivo son solubles. Las funciones biológicas de la glicoproteína G soluble (Gs) en el ciclo de vida viral es todavía desconocida, aunque se cree que podría actuar “atrapando” a los Acs neutralizantes dirigidos contra la glicoproteína G de la partícula viral y por tanto, impidiendo la neutralización del virus (Johnson et al., 1998).

El análisis de la composición de aminoácidos de la proteína revela un contenido del 30% en Ser, más treonina (Thr) (sitios potenciales de O-glicosilación) y un 10% de prolina (Pro). El ectodominio de la glicoproteína G, contiene de 3 a 8 sitios potenciales de N-glicosilación, dependiendo de la estirpe viral, y más de 70 sitios potenciales de O-glicosilación (Wathen et al., 1991).

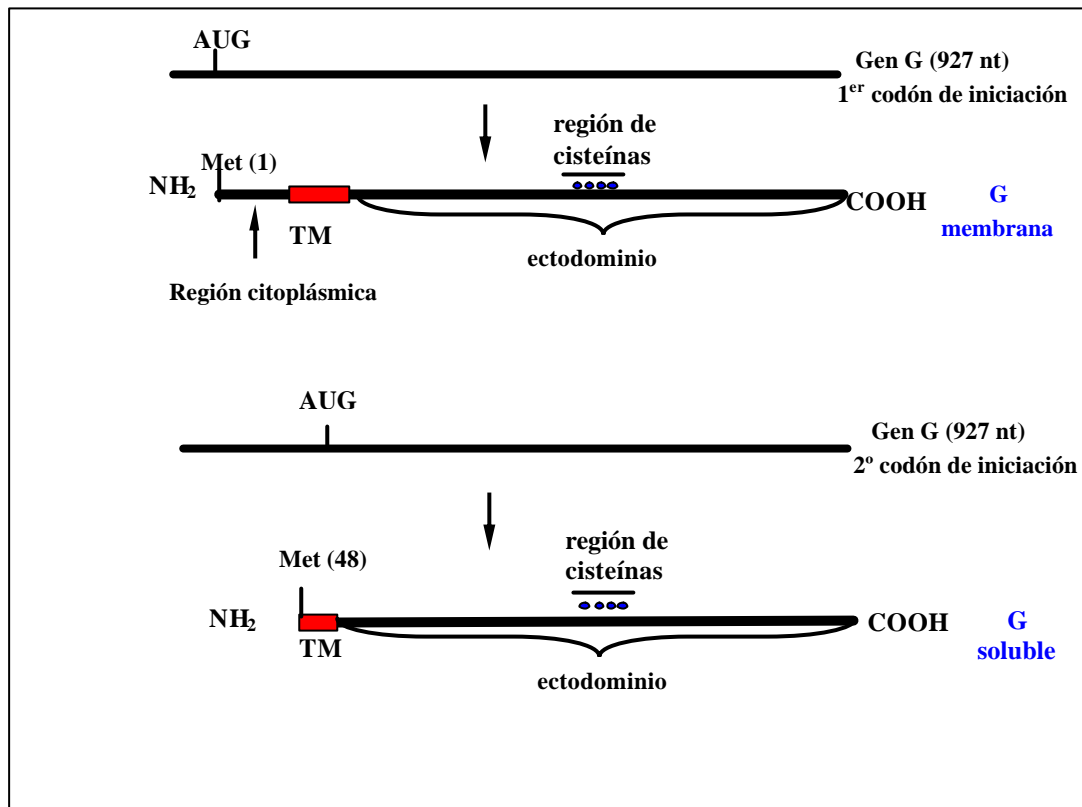


Figura 2. Representación de las dos formas moleculares de la glicoproteína G. Se indican los dos codones de iniciación de la traducción en el ARNm, que dan lugar a las distintas formas de la glicoproteína G. Como se observa en la figura, el segundo codón está dentro de la región hidrofóbica de anclaje a la membrana. En círculos azules se indican las cisteínas. TM: región transmembrana.

El ectodominio de la glicoproteína G, tiene cuatro residuos de cisteína (posiciones 173, 176, 182 y 186) y un corto segmento (residuos 164-176) que está conservado en todas las cepas del VSRH. Esta región presenta el segmento más hidrofóbico del ectodominio de la proteína y ha sido propuesta como sitio de unión al receptor. Si se consideran únicamente virus pertenecientes al subgrupo A, la región conservada se extiende desde el residuo 163 al 169 (Langedijk et al., 1996; Gorman et al., 1997).

A ambos lados de la región central conservada del ectodominio, se encuentran dos segmentos que presentan un alto grado de variabilidad genética y antigénica entre los virus de los dos subgrupos antigénicos y que contienen la mayor parte de los sitios potenciales de O-glicosilación (Johnson et al., 1987; Garcia-Barreno et al., 1989). Dentro de cada subgrupo, estos segmentos son también altamente

variables, dando cuenta de la divergencia de la proteína a nivel de aminoácidos, que puede ser de hasta un 20% entre cepas del subgrupo A (Cane and Pringle, 1991; Sanz et al., 1994) y un 9% entre cepas del subgrupo B (Sullender et al., 1991).

El precursor de la proteína, se sintetiza como un polipéptido de 32 Kd que se modifica durante su síntesis por la adición, mediante enlaces N-glicosídicos a residuos de asparagina (Asn), de cadenas de azúcares con alto contenido de manosa, dando lugar a una forma intermedia de 45 Kd (Wertz et al., 1989). Este paso es seguido por la conversión de esas cadenas de azúcares al tipo complejo y la adición de cadenas de carbohidratos unidos por enlaces O-glicosídicos a residuos de Ser o Thr, alcanzándose así la forma madura de 80-90 Kd. La gran contribución de la O-glicosilación a la masa de la proteína madura, está relacionada probablemente con su alto contenido de sitios potenciales (Ser y Thr) para este tipo de modificación (Wathen et al., 1991).

II.3. Genoma.

El genoma del VSRH está constituido por una molécula de ARN monocatenario, de polaridad negativa y aproximadamente 15 kb, que codifica 10 ARNm. Cada uno de ellos contiene un ORF, a excepción del gen M2 que tiene dos. Los ARNm tienen un capping (CAP) en el extremo 5' y están poliadenilados en el extremo 3'. Cada gen comienza con una secuencia de 10 nucleótidos denominada gene start (GS), que está altamente conservada a excepción del gen L, cuya función es controlar el inicio de la transcripción y la adición de CAP, y acaba con una secuencia semi-conservada de 12-13 nucleótidos denominada gene end (GE), que dirige la terminación de la transcripción y la poliadenilación del ARNm. Los nueve primeros genes, están separados por regiones intergénicas que varían en longitud de 1-56 nucleótidos y carecen de secuencias consenso (Kuo et al., 1996; Kuo et al., 1997). Los dos últimos genes, M2 y L, se solapan en 68 nucleótidos, por lo que la señal GS del gen L se localiza dentro del gen M2. Por este motivo, esta secuencia se transcribe dos veces con cada síntesis de ambos ARNm (Fearn and Collins, 1999a).

En cada extremo del ARNv se encuentran dos regiones no codificantes, un ARN leader en el extremo 3' de 44 nucleótidos, y una región trailer de 159 nucleótidos en el extremo 5'. Veintiuno de los últimos 24-26 nucleótidos de ambos extremos, son complementarios, lo que indica un alto grado de identidad entre los promotores de los extremos 3' del ARN genómico y antigenómico (Mink et al., 1991) (Figura 3).

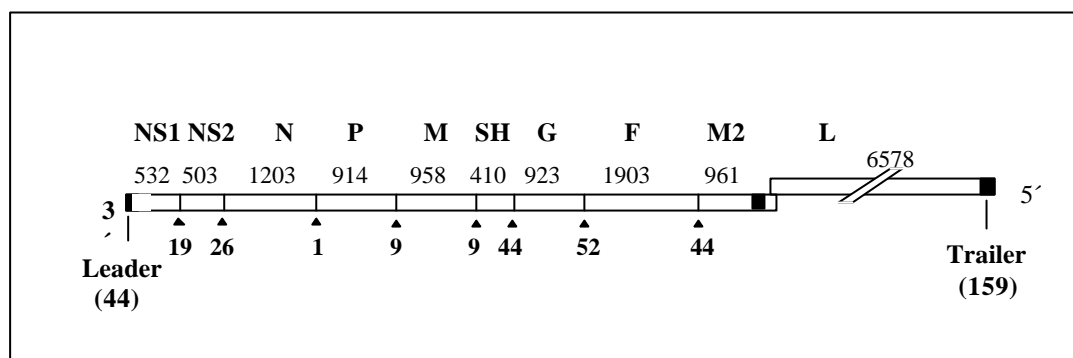


Figura 3. Mapa genético de la cepa Long del VRSH. En la parte superior se indica el nombre y la longitud (nucleótidos) de cada gen, incluyendo la serie de uridinas con las que finalizan. En la parte inferior se señalan las posiciones y longitudes de las secuencias intergénicas, la región de solapamiento entre los genes M2 y L y las secuencias leader y trailer. La segunda fase de lectura del gen M2 (M2-2) se indica con un cuadro negro.

La transcripción se produce de forma secuencial desde el extremo 3', como se pudo comprobar mediante estudios de cinéticas de inactivación de la transcripción por luz ultravioleta y experimentos con minigenomas dicistrónicos. En el modelo propuesto, la polimerasa viral pararía y reiniciaría la síntesis de ARNm en cada secuencia intergénica (Dickens et al., 1984). En el caso concreto del gen L, todavía se desconoce cómo la polimerasa accede a la región GS, que se encuentra dentro de la región solapante con el gen M2. Se ha propuesto un modelo en el que la polimerasa primero transcribiría el gen M2 y luego retrocedería para transcribir el gen L (Fearn and Collins, 1999a). Como en todos los mononegavirus, existe un gradiente transcripcional de manera que los genes más próximos al promotor son transcritos con más frecuencia. Este mecanismo, junto con el que suponen la presencia de regiones intergénicas, actúan como reguladores de la transcripción (Kuo et al., 1997; Hardy et al., 1999), aunque también se ha comprobado que intervienen en la regulación transcripcional, la longitud de los genes.

Recientemente se ha descrito que la transcripción es dependiente de proteínas celulares como actina y profilina (Burke et al., 1998; Burke et al., 2000).

La replicación implica la síntesis de un intermediario replicativo encapsidado de polaridad positiva, el antigenoma, que es copia exacta del genoma completo. Este último se sintetiza empleando como molde el antigenoma. La síntesis de ambos ARN está fuertemente acoplada a su encapsidación y se inhibe cuando la nucleoproteína es limitante (Collins et al., 2001).

II.4. Manifestaciones clínicas.

El cuadro clínico de las infecciones por VSRH varía de acuerdo con la edad del paciente. Este virus afecta fundamentalmente a niños entre 6 semanas y 9 meses de edad, causando síntomas en el tracto respiratorio alto. De estas infecciones, entre el 25 y el 40% afectan el tracto respiratorio bajo, siendo la bronquiolitis y la neumonía las principales manifestaciones clínicas, provocando un incremento de la severidad de la enfermedad. La infección asintomática en este grupo de edad es poco común (Greenough, 2002; Djelantik et al., 2003). La fase inicial de la enfermedad comienza con rinorrea, acompañada en algunos casos con disminución del apetito. La tos puede aparecer simultáneamente o durante los tres primeros días de los síntomas, también puede haber fiebre no muy alta y coriza. Después que la tos se ha desarrollado, los niños pueden comenzar con sibilancia, si la enfermedad es leve, los síntomas no progresan más allá de esta etapa. El examen médico muestra taquipnea moderada, ronquidos difusos y sibilancia. La rinorrea aumenta, la fiebre es intermitente y frecuentemente se produce otitis media. La radiografía generalmente es normal y la recuperación ocurre entre 7 y 12 días después de la enfermedad (Heikkinen et al., 1999; Chonmaitree and Henrickson, 2000; West, 2002; Ishibashi et al., 2003).

En los casos en que la enfermedad es severa, la tos y la sibilancia progresan, los niños comienzan con disnea, se hace evidente la hiperexpansión del pecho y puede ocurrir una retracción intercostal y subcostal. La taquipnea severa es común, incluso en ausencia de una cianosis visible. En etapas avanzadas de la enfermedad donde la hipoxia es extrema, ocurre fallo respiratorio. La radiografía

muestra una combinación de atrapamiento de aire (hiperexpansión) y condensación peribronquial o neumonía intersticial. Se ha visto ocasionalmente consolidación segmental o lobulal la cual involucra usualmente el lóbulo derecho superior, en estos casos la efusión pleural es rara (Collins et al., 2001).

Se han realizado algunos estudios que relacionan severidad clínica de las infecciones con los diferentes subgrupos o genotipos del VSRH. Algunos estudios no han mostrado diferencias en la severidad de las infecciones entre los subgrupos A y B, mientras que otros han reportado que el subgrupo A esta asociado con una mayor severidad de la enfermedad (Walsh et al., 1997; Cane, 2001; Martinello et al., 2002; Venter et al., 2002; Papadopoulos et al., 2004).

Las infecciones por el VSRH son particularmente peligrosas en niños con displacia broncopulmonar, enfermedades cardiacas congénitas y en niños prematuros e inmunodeprimidos. En estos casos las infecciones son severas y pueden poner en peligro la vida del paciente (Falsey and Walsh, 2000; Collins and Pollard, 2002; Greenberg, 2002).

En niños recién nacidos la mayoría de las infecciones por VSRH producen sólo síntomas respiratorio superiores, reflejando el efecto protector de los AcMs maternos contra la infección del tracto respiratorio bajo. La bronquiolitis es rara y la infección severa se caracteriza por letargo, irritabilidad, fiebre inestable y no por signos respiratorios específicos (Suara et al., 1996; Kang and Kim, 1997).

El VSRH ha sido detectado en el pulmón de niños que han muerto repentinamente, a esto se le ha llamado síndrome de muerte súbita en el niño. Sin embargo, no existe una asociación estadística significativa entre el VSRH y este síndrome. La detección del virus en algunos casos de síndrome de muerte súbita refleja su prevalencia, coincidiendo el pico de incidencia de ambos en los meses de invierno (Cubie et al., 1997).

En niños mayores y adultos (en su mayor parte corresponden a reinfecciones), los cuadros suelen ser leves y en algunos casos, asintomáticos. En ocasiones, en especial las personas mayores, se producen neumonías y bronquitis, siendo

también la infección por este virus, causa de exacerbación de la bronquiolitis crónica. En los últimos años ha sido reconocido que este virus es responsable de la morbilidad y mortalidad en la población de anciano (Falsey and Walsh, 2000; Collins and Pollard, 2002; Greenberg, 2002; Piedra, 2003; Thompson et al., 2003).

Existen ahora evidencias convincentes que niños, los cuales desarrollan síntomas del tracto respiratorio bajo durante la infección con VSRH en el primer año de vida incrementan el riesgo a desarrollar síntomas parecidos a los de asma durante la edad escolar (Martinez, 2003; Peebles, 2004).

II.5. Patogenia y patología.

El VSRH es altamente contagioso y se transmite por contacto con secreciones respiratorias, principalmente por contaminación de las manos y la subsiguiente inoculación de la mucosa nasal y conjuntiva. El período de incubación entre la exposición y el inicio de la enfermedad, es de cuatro o cinco días. La excreción viral puede persistir de una a tres semanas. La infección se inicia por multiplicación del virus en las células epiteliales del tracto respiratorio superior. Este virus también infecta células como macrófagos y monocitos, interfiriendo en algunas de sus funciones. El virus progresa hacia el tracto respiratorio inferior después de 1-3 días, probablemente a través de la aspiración de secreciones infectadas, aunque también puede extenderse de célula a célula mediante la fusión de sus membranas (Collins et al., 2001).

Aunque el VSRH es neumotrópico, este no está estrictamente limitado en un sitio. En los niños o adultos inmunocomprometidos donde, la infección con este virus es fatal en algunos casos, el virus puede diseminarse a otros órganos como son riñón, hígado y miocardio (Milner et al., 1985). A pesar de que la viremia no ha sido descrita durante la infección en lactantes y niños normales, han sido detectados antígenos del virus en leucocitos mononucleares circulantes en los pacientes inmunodeprimidos (Wang et al., 2001), y ARN genómico y ARNm en células de sangre arterial, pero no en fluido cerebro espinal (O'Donnell et al., 1998).

Durante la bronquiolitis, hay necrosis y proliferación del epitelio bronquiolar y destrucción de las células epiteliales ciliadas. Aparece un infiltrado peribronquiolar de linfocitos, células plasmáticas y macrófagos con edema de la submucosa y los tejidos circundantes, lo que unido a una secreción masiva de moco en combinación con los restos celulares, provoca la obstrucción de los bronquiolos y alvéolos, causando un colapso o enfisema de las zonas dístales del tracto respiratorio. En aquellos casos donde se produce neumonía, existe un engrosamiento de las paredes interalveolares como resultado de la infiltración de células mononucleares que se llenan de fluido (La Via et al., 1992).

La respuesta inflamatoria que se inicia a causa de la infección con este virus, contribuye a algunas manifestaciones patológicas de la enfermedad provocada por el mismo. Por ejemplo, los granulocitos que son reclutados por citoquinas pro-inflamatorias en las vías respiratorias, pueden mediar directamente la destrucción de la célula infectada, lo que ayuda a resolver la infección, pero también daña el tejido. La degranulación del granulocito, libera enzimas y, en el caso de eosinófilos y basófilos, efectores solubles tales como leucotrienos (Wang et al., 1998).

La respuesta de linfocitos T también puede contribuir significativamente a la patología asociada a la infección por VSRH. Así, ratones BALB/c inmunizados con VSRH inactivado con formalina, o virus vaccinia recombinante que expresa la glicoproteína G (rVV-G), desarrollaron respuestas basadas en la proliferación de linfocitos T CD4⁺ de la subclase 2 y escasos linfocitos T citotóxicos (CTLs) (Openshaw et al., 1992; Alwan et al., 1994). Aunque estos ratones estaban protegidos frente a la infección por VSRH, existía sin embargo, un incremento en la patología pulmonar caracterizada por infiltraciones de linfocitos y eosinófilos (Openshaw et al., 1992). Este efecto se podía abolir bien por la depleción de las células T CD4⁺ o del patrón 2 de citoquinas de células T cooperadoras (Th2) antes de la infección (Connors et al., 1992; Connors et al., 1994). La respuesta Th2 se correlaciona con la presencia de Acs de isotipo IgG1 en el suero y un aumento de secreción de citoquinas interleuquina 4 (IL-4) e IL-5 entre otras (Graham et al., 1993; Alwan et al., 1994). La IL-4 media el cambio de isotipo de los Acs a IgE,

que a su vez está asociado a fenómenos de alergia. La IL-5 media la activación de eosinófilos, aumentando la producción de mocos en las vías respiratorias (Schwarze et al., 1999). Esta respuesta patológica no se observó en ratones que fueron inmunizados con virus vaccinia recombinante que expresaba la proteína F (rVV-F), en este caso la respuesta inmune era principalmente del patrón 1 de citoquinas de células T cooperadoras (Th1) (Alwan and Openshaw, 1993; Alwan et al., 1993). La respuesta Th1, se asocia a la presencia de Acs séricos de isotipo IgG2a y está caracterizada por una alta producción de interferon γ (IFN- γ) (Hussell et al., 1996). Por tanto, el tipo de respuesta inmune celular que se induce tras una inmunización y el antígeno utilizado, determinan en gran medida la respuesta patológica asociada a la infección por VSRH.

El patrón genético del huésped es también un factor muy importante en la patogénesis. Se ha visto que existen diferencias en la replicación del VSRH y en el grado de patología pulmonar dependiendo de las diferentes cepas en ratones (Hussell et al., 1998; Srikiatkachorn et al., 1999).

II.6. Respuesta inmune frente a la infección por VSRH.

El sistema inmune juega un papel primordial en la protección y en la recuperación de la infección por VSRH (Crowe, 1999). En el caso de los niños inmunodeficientes, ocurre un fallo en la eliminación del virus, por lo que la excreción viral puede extenderse durante varios meses (Stensballe and Kristensen, 2002). En adultos inmunocomprometidos (pacientes con trasplante de médula ósea o con leucemia) el VSRH constituye una causa seria de infección respiratoria, la cuál generalmente progresa hacia una neumonía fatal (Ghosh et al., 2000).

La inmunidad a este virus está mediada por la respuesta inmune humoral y celular. La vía humoral involucra los Acs secretores y Acs en sueros que aparecen para proteger contra las infecciones en el trato respiratorio alto y bajo respectivamente, mientras que la respuesta celular está dirigida contra proteínas internas que aparecen para terminar la infección. La inmunidad natural a VSRH es incompleta

y las reinfecciones ocurren a lo largo de la vida. Así, existe una relación inversa entre niveles elevados de Acs maternos específicos en niños y la frecuencia y gravedad de las infecciones causadas por el VSRH (Holberg et al., 1991).

En ratones BALB/c se ha visto que las células asesinas naturales (NK) en el pulmón aparecen en los primeros días después de la infección, seguida por los CTL CD8+ a nivel de pulmón y Acs secretores y sistémicos. Las células NK y las células T CD8+ además de ser efectores directos contra las células infectadas por virus, modulan la respuesta inmune a través de la secreción de linfoquinas, especialmente IFN- γ . Se ha visto que la administración pasiva de sueros con altos títulos de Acs neutralizantes a animales infectados, reduce la replicación del virus después de un desafío con VSRH (Prince et al., 1987). Estudios realizados en ratones inmunizados con virus vaccinias recombinantes que expresan las proteínas individuales del VSRH, manifestaron que las únicas capaces de inducir Acs neutralizantes fueron las glicoproteínas F y G (Connors et al., 1991), y que estos ratones estaban protegidos frente una infección experimental por el virus. En vista a estos hechos, la inmunización con antígenos que inducen la producción de Acs neutralizantes en animales confiere protección frente a la infección por VSRH.

Estudios en ratones BALB/c donde se deplecionaron individual o conjuntamente tanto los linfocitos T CD4⁺ como los T CD8⁺, demostraron que ambas subpoblaciones son importantes en la eliminación del virus en infecciones primarias (Graham et al., 1991) y que si estos se volvían a reconstituir, se generaba de nuevo una respuesta inmune eficaz. En apoyo a estos datos, por ejemplo, los niños inmunodeficientes tardan más tiempo en eliminar el virus que los niños inmunocompetentes (Chandwani et al., 1990). La respuesta citotóxica, está implicada en el control de la infección por VSRH, aunque también media la enfermedad, lo que sugiere que debe existir un equilibrio entre protección y enfermedad producida por los CTLs (Ottolini et al., 1999).

El VSRH tiene una capacidad inusual para infectar a niños muy pequeños, los cuales posiblemente se caractericen por dar lugar a respuestas inmunes inmaduras que favorezcan respuestas celulares anormales contra el virus. Por ejemplo, la

respuesta CD4⁺ en neonatos y niños de corta edad es principalmente Th2 y tienen reducida la respuesta citotóxica (Chiba et al., 1989), mientras que los niños mayores y adultos secretan predominantemente citoquinas Th1 (Anderson et al., 1994).

La infección por VSRH de las células epiteliales y macrófagos, inducen o incrementan la producción de linfoquinas proinflamatorias, tales como, IL-6, IL-8, reguladores de la activación de las células T normal expresadas y secretadas (RANTES), factor de necrosis tumoral α (TNF- α) (Panuska et al., 1995; Tsutsumi et al., 1996; Olszewska-Pazdrak et al., 1998a; Tristram et al., 1998). Otras moléculas que se incrementan en respuesta a la infección, son moléculas de adhesión a la célula que pueden mediar la adherencia de infiltrados leucocitarios a las células epiteliales infectadas, las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) que pueden aumentar la respuesta inmune adaptativa y Fas (CD95), propiciar la apoptosis de las células infectadas mediada por células T citotóxicas (Garofalo et al., 1996; O'Donnell D et al., 1999).

Las linfoquinas pueden tener actividad antiviral directa. Se ha observado que el pretratamiento de células in vitro con TNF- α inhibió la replicación del VSRH y que ratones a los cuales se le deplecionaron el TNF- α y posteriormente fueron infectados con este virus, exhibieron un incremento en la magnitud y duración de la enfermedad (Neuzil et al., 1996). Las linfoquinas también son importantes en la atracción y activación de leucocitos específicos, macrófagos, neutrófilos, eosinófilos, linfocitos T y células NK. Estas células pueden ayudar a eliminar la infección, pero en algunos casos pueden dañar el tejido, atacando directamente a las células infectadas o a través de la liberación de linfoquinas adicionales y enzimas degradativas (Wang et al., 1998; Jaovisidha et al., 1999). En particular, la degranulación eosinofílica libera compuestos vasoactivos tales como histamina y leucotrieno C4, los cuales son mediadores potentes del broncoespasmo. Algunos mediadores solubles pueden también aumentar la respuesta inflamatoria y pueden tener otros efectos tales como la estimulación de la secreción de moco (Olszewska-Pazdrak et al., 1998b).

II.7. Tratamiento, prevención, control y vacunas.

El tratamiento sintomático de las enfermedades respiratorias del tracto inferior causadas por el VSRH, requiere eliminación de secreciones, administración de oxígeno húmedo o asistencia respiratoria. También puede hacerse uso de broncodilatadores y corticoides como antiinflamatorios. La ribavirina, un análogo de guanosina que se ha utilizado como antiviral desde 1985, tiene una eficacia terapéutica dudosa, aunque in vitro inhibe la replicación del virus (Randolph and Wang, 2000). A pesar de ello, algunos estudios muestran la disminución de la producción de virus en el tracto respiratorio de los niños infectados y tratados con ribavirina (Diseases., 1996; Mills, 1999).

La administración por vía parental de IgG policlonales humanas (RespiGam), o de un AcM humanizado dirigido contra la proteína F (Synagis), representan un método nuevo y eficaz de inmunoprolaxis pasiva para niños de alto riesgo que desarrollan la enfermedad (Scholz, 2000; Oh et al., 2002; Vogel et al., 2002; Paes, 2003; Romero, 2003). Numerosos agentes terapéuticos han sido evaluados, entre ellos se incluye la administración intratraqueal de surfactante (Vos et al., 1996) o la modificación de la producción de citoquinas inflamatorias o quimioquinas (Bitko et al., 1997). La administración de IFN- γ o de vitamina A, no parecen reducir la carga viral en niños infectados (Higgins et al., 1990; Bresee et al., 1996).

Hasta la fecha no se ha logrado obtener una vacuna contra el VSRH. Los primeros ensayos de inmunización se realizaron con virus inactivado con formalina, el cual no sólo, no confirió protección contra la infección por VSRH, sino que potenció la gravedad de la enfermedad en los niños que sufrieron una infección natural posterior (Dudas and Karron, 1998; Openshaw et al., 2001). Las causas posiblemente fueron debidas a una respuesta inmune desequilibrada con bajos niveles de Acs IgA y Acs no neutralizantes contra las glicoproteínas F y G. Una posible explicación es que la formalina desnaturalice los epítomos implicados en neutralización de las glicoproteínas F y G. Por lo general, las vacunas basadas en virus inactivados, inducen la producción de linfocitos T CD4⁺ específicos, con una

proporción de células Th2 elevada, pero no de T CD8⁺, responsables de la eliminación del virus y reguladores de la respuesta inmune celular al VSRH (Srikiatkachorn and Braciale, 1997).

Estos obstáculos, unidos a otros como son la inmadurez del sistema inmune en los lactantes y el efecto inmunosupresor de los Acs maternos (Crowe, 2001), han impedido el desarrollo de una vacuna contra el VSRH. Por ello, se han investigado numerosas estrategias vacunales a nivel experimental: péptidos sintéticos (Bastien et al., 1997; Steward, 2001), antígenos virales recombinantes (Oien et al., 1994; Plotnicky-Gilquin et al., 1999), vectores basados en virus vaccinia recombinantes defectivos en la replicación (Wyatt et al., 1999) o virus recombinantes de la estomatitis vesicular (Kahn et al., 1999), vacunas quiméricas recombinantes de las glicoproteínas G y F (Prince et al., 2000), vacunas de subunidades que incluyen las glicoproteínas F y G purificadas a partir de células infectadas con VSRH (Tebbey et al., 1999; Power et al., 2001) y vacunas de ADN (Li et al., 1998; Bembridge et al., 2000b; Bembridge et al., 2000a). También ha sido demostrado que una vacuna con el virus vivo atenuado, en combinación con una vacuna de subunidades proteicas, es capaz de proteger a niños y ancianos de la infección (Gonzalez et al., 2000). Por otro lado, la inmunización por vía oral utilizando tomates transgénicos indujo Acs específicos a la proteína F del VSRH de suero y de mucosa (Sandhu et al., 2000).

Las vacunas de subunidades comparten algunas desventajas con las vacunas de virus inactivado, siendo la más común la ausencia de presentación de antígeno MHC-I y por lo tanto la no activación de los linfocitos T CD8⁺ o CTLs (Murphy et al., 1990; Hancock et al., 1996; Neuzil et al., 1997). Gracias a la obtención de virus infectivos a partir de clones de cADN, se está permitiendo el diseño de nuevos virus atenuados como posibles vacunas, con mutaciones específicas o deleciones individuales en genes tales como NS1, NS2, SH o M2-2, o NS1 y NS2 juntos (Bermingham and Collins, 1999; Whitehead et al., 1999; Jin et al., 2000).

Recientemente ha sido utilizada una nueva estrategia de vacuna en ratones con resultados alentadores. En este estudio se describe la transferencia de genes

intranasal, utilizando una mezcla de ADN plasmídico que expresan antígenos contra el VSRH (Mohapatra, 2003).

II.8. Epidemiología.

El VSRH infecta principalmente a niños que se encuentran en edades comprendidas entre las seis semanas y los nueve meses, causando bronquiolitis agudas y neumonía (Holberg et al., 1991). La infección primaria ocurre aún en presencia de Acs maternos, las reinfecciones pueden ocurrir a lo largo de la vida, aunque con la edad disminuyen la incidencia y la gravedad de los síntomas, no obstante se han descrito infecciones serias en ancianos y pacientes inmunodeprimidos, principalmente pacientes con trasplante de médula (Englund et al., 1991; Dowell et al., 1996; Cox et al., 1998; Falsey and Walsh, 2000). Infecciones severas con este virus constituyen un riesgo importante en niños prematuros y en niños con enfermedad crónica del pulmón o congénita del corazón (Welliver, 2003).

La distribución del VSRH es mundial y tiene un claro efecto estacional en las zonas templadas. Las epidemias ocurren anualmente y tienen lugar durante los meses de invierno y comienzos de la primavera, pero nunca en verano. En las zonas tropicales o subtropicales las epidemias se producen durante los meses de lluvia (Sung et al., 1992; Weber et al., 1998; Cane, 2001). La mitad de los niños son infectado por este virus en el primer año de vida, a los dos años de edad casi todos los niños se han infectado con el virus y aproximadamente un 50% se ha infectado dos veces (Cane, 2001).

En Cuba en el año 1964 se detectó por primera vez el VSRH como agente etiológico durante un brote de bronquiolitis (Mas et al., 1967). Desde esa fecha se implantó la vigilancia activa (aislamientos), más tarde, la detección rápida del antígeno viral por Inmunofluorescencia y la detección del genoma viral por RCP. La vigilancia pasiva a nivel nacional se realiza paralelamente mediante la detección de Acs en sueros pareados y monoseros de niños menores de 15 años. Esta vigilancia ha permitido conocer el comportamiento de este virus en nuestro país. De esta manera, se demostró que Cuba a pesar de ser un país tropical, los

brotos epidémicos ocurren desde septiembre hasta febrero-marzo, como ocurre en los países con clima templado, con períodos cortos de 7 a 12 meses, o largos ínter epidémicos de 12 a 16 meses (Bello et al., 1983; Bello et al., 1990; Chacon et al., 1996; Goyenechea et al., 1996; Savon et al., 1996; Sarmiento et al., 1997).

En un estudio longitudinal de monosueros realizado en nuestro país durante un período de 10 años (1980-1990), se confirmó todo lo anteriormente señalado (Goyenechea et al., 1994). En estudios posteriores se realizó la detección de los principales virus respiratorios presentes en las IRA en niños menores de un año. En el mismo se encontró que el VSRH fue el agente etiológico más frecuente, desde el mes de septiembre hasta febrero (Cancio et al., 2000).

Los aislamientos del VSRH se dividieron en dos subgrupos antigénicos A y B, en base a la reactividad que presentan frente a un panel de AcMs (Mufson et al., 1985; Garcia-Barreno et al., 1989). Por análisis de secuencia, se demostró que constituyen grupos genéticamente diferentes (Cane and Pringle, 1991; Sullender et al., 1991; Cane and Pringle, 1995a; Sullender, 2000). La variabilidad de los aislamientos dentro de los subgrupos A y B del VSRH, fue también demostrado por su reactividad frente a AcMs (Anderson et al., 1991; Nagai et al., 1993), por el uso de digestión con RNasa A (Cristina et al., 1991; Storch et al., 1991), por secuenciación nucleotídica del gen G y SH y por análisis de restricción del gen N (Cane and Pringle, 1991; Sullender et al., 1991).

II.9. Variación antigénica y genética del VSRH.

La variación antigénica del VSRH, ha sido demostrada mediante la utilización de AcMs preparados contra las diferentes proteínas del virus. Ward y colaboradores en 1984 encontraron variación antigénica en la proteína N, en base a su reactividad con AcMs específicos a esta proteína. Otros autores utilizando AcMs preparados contra las proteínas P y M encontraron también diferencias antigénicas entre los aislamientos (Leonov et al., 1994). En otros estudios realizados, se observó que la reactividad entre aislamientos dentro de cada subgrupo, fue diferente frente a un panel de AcMs específicos de la glicoproteína G (Storch and Park, 1987). Por otro lado, han sido observadas diferencias en la movilidad

electroforética de la glicoproteína G del subgrupo A y B, la glicoproteína G del subgrupo B migró más rápidamente que la del subgrupo A (Orvell et al., 1987).

Durante un período de 30, años se estudió la variabilidad antigénica de 12 cepas aisladas en la naturaleza, para ello se empleó un panel de 49 AcMs frente a las proteínas G, F, N, P y M; observándose que la mayoría de los epítomos presentes en las proteínas F, N, P y M estaban conservados en todas las cepas, mientras que casi todos los AcMs anti-G eran específicos de la cepa empleada en la inmunización (Garcia-Barreno et al., 1989). Todos los estudios citados anteriormente, han demostrado que existe una variación antigénica entre los dos subgrupos y dentro de cada subgrupo. Esta variabilidad fue demostrada por reactividad con AcMs, lo cuál reveló que la glicoproteína G fue la más variable.

Mediante ensayos de reactividad con AcMs anti-G se han identificado tres tipos de epítomos en la molécula G del VSRH (Garcia-Barreno et al., 1994; Martinez et al., 1997):

- **Epítomos específicos de cepas**, presentes únicamente en el virus que se empleó para obtener el AcM o epítomos variables, presentes solamente en algunos virus del mismo subgrupo.
- **Epítomos específicos de subgrupos**, presentes en todas las cepas del mismo subgrupo antigénico.
- **Epítomos conservados**, presente en todos los aislamientos de VSRH.

Los epítomos específicos de cepa han sido mapeados dentro del tercio C-terminal del ectodominio de la glicoproteína G (Garcia-Barreno et al., 1990; Rueda et al., 1991; Martinez et al., 1997). Epítomos de las otras dos clases, han sido localizados cerca de la zona conservada del ectodominio donde están las cuatro cisteínas (Akerlind-Stopner et al., 1990; Rueda et al., 1994).

Para los estudios de variación genética entre cepas del subgrupo A y B, primeramente fueron usados ensayos de protección con RNAsa y sondas correspondientes a los genes P, M2, N, F y G. Estos ensayos pudieron ser usados

para diferenciar ambos subgrupos virales, así la variabilidad genética dentro de cada subgrupo fue evidente (Cristina et al., 1990; Cristina et al., 1991).

Ha sido reportado, que el porcentaje de homología aminoacídica entre cepas de distintos subgrupos en la glicoproteína G, es de un 53 %, mientras que en las otras proteínas es mucho mayor (SH 76 %, F 89 %, N 96 %) (Sullender, 2000; Cane, 2001). Cuando se comparan cepas del mismo subgrupo la variación que se observa es menor, 80 % de identidad de aminoácidos para la glicoproteína G (Cane, 2001; Lim et al., 2003), 97 a 98 % para la glicoproteína F, 96 a 98 % para la proteína SH (Lim et al., 2003) y 98-99 % para la fosfoproteína (Lopez et al., 1988). Así, la glicoproteína G, es la que presenta un mayor grado de variabilidad antigénica y una menor homología a nivel aminoacídico entre las distintas cepas (Cane, 2001).

La secuenciación nucleotídica del gen de la glicoproteína G, mostró que la variabilidad aminoacídica fue de un 20% dentro del subgrupo A y un 9% dentro del subgrupo B (Cane and Pringle, 1991; Sullender et al., 1991). El uso de la Transcripción Reversa y Reacción en Cadena de la Polimerasa (TR-RCP) en combinación con el Polimorfismo de Longitud de Fragmentos de Restricción (RFLP), constituyen técnicas rápidas que permiten conocer la variabilidad genética dentro de una epidemia en un gran número de muestras. Las regiones del genoma seleccionadas para este análisis, han sido una parte del gen N, el extremo 5' del gen SH y una parte de la glicoproteína G. El análisis de restricción de una parte del gen N, permitió identificar varios genotipos dentro de un mismo subgrupo, así se identificaron 3 genotipos para el subgrupo A (NP2, 4 y 5) y 3 para el subgrupo B (NP1, 3 y 6). La secuenciación nucleotídica de una parte del gen SH arrojó 6 genotipos para el subgrupo antigénico A, designados SHL1-SHL6 (Cane et al., 1992; Sullender et al., 1993; Cane and Pringle, 1995a).

Como fue descrito anteriormente la variabilidad en la glicoproteína G no está igualmente distribuida en la molécula (Cane et al., 1991; Sullender et al., 1991; Sullender, 2000). Los dominios transmembrana y citoplasmático están más conservados que el dominio extracelular. Dentro de éste, existen dos regiones

hipervariables, una se localiza entre los residuos 101-133 y la segunda es más extensa y abarca el tercio C-terminal de la proteína. Estas regiones están separadas por un dominio muy conservado que engloba el único segmento idéntico entre los dos subgrupos (residuos 164-176), que como se mencionó anteriormente, se ha propuesto como posible sitio de unión al receptor (Johnson et al., 1987).

Aproximadamente un 50 % de los cambios de nucleótidos, dan lugar a cambios de aminoácidos entre los distintos virus, además, la mayoría de estas diferencias se encuentran en el ectodominio de la proteína, lo que sugiere un efecto selectivo de la respuesta inmune del huésped. La variabilidad de la glicoproteína G pudiera ser una adaptación evolutiva para el virus, que de alguna forma, facilite las frecuentes infecciones (Cane, 2001).

II.10. Epidemiología molecular.

Como ha sido descrito anteriormente, la variabilidad de los aislamientos del VSRH ha sido examinada a nivel antigénico y genético. Anderson y colaboradores en 1985b, mostraron que, los subgrupos A y B han existidos por mas de 20 años, tienen una distribución mundial y pueden co-circular durante una misma epidemia. Estudios realizados con AcMs, mostraron que aislamientos de ambos subgrupos están presentes durante la mayoría de las epidemias, variando sus proporciones relativas de año en año (Salomon et al., 1991; Carballal et al., 2000). En general, virus del subgrupo A, han sido identificados más frecuentemente que virus del subgrupo B (Lopez et al., 1988). Mufson y colaboradores en 1985 sugirieron que los dos subgrupos han evolucionado separadamente en un período considerable (Mufson et al., 1985). Aislamientos colectados en Boston durante dos períodos consecutivos (1981-1984) fueron analizados. Dos subgrupos antigénicos circularon al mismo tiempo. Los dos subgrupos fueron aislados con frecuencias similares en un período y el subgrupo A predominó en el otro período (Mufson et al., 1985). En estudios posteriores, la prevalencia de los dos subgrupos antigénicos en 6 epidemias del VSRH en Boston desde 1981 hasta 1987 fue valorada. En dos de los 6 períodos, ambos subgrupos fueron encontrados en iguales proporciones, en tres períodos los virus del subgrupo A fueron dominantes

y en un período predominaron los virus del subgrupo B. La heterogeneidad entre los virus del subgrupo A, fue notada (Hendry et al., 1989).

La distribución de los virus pertenecientes a los subgrupos A y B durante 5 períodos epidémicos, desde 1981 hasta 1986 en el oeste de Virginia fue analizada. Ambos subgrupos fueron aislados cada año, pero los virus del subgrupo A fueron dominantes en todos los períodos epidémicos (Mufson et al., 1988). Estos estudios fueron extendidos desde 1978 hasta 1988, durante el mismo se detectó que los virus del subgrupo B fueron dominantes en una sola epidemia (Mufson et al., 1991).

El análisis de los aislamientos de VSRH colectados entre 1965 y 1986 en Newcastle, Reino Unido, mostró que los dos subgrupos antigénicos co-circularon; los virus del subgrupo B fueron aislados con menor frecuencia (Morgan et al., 1987). Los virus aislados durante cinco períodos epidémicos en Japón fueron analizados (Tsutsumi et al., 1988). El subgrupo A predominó durante los períodos primero y último, mientras que el subgrupo B fue aislado más frecuentemente durante tres períodos seguidos. Aislamientos colectados durante tres epidemias en Uruguay, desde 1985 hasta 1987 fueron analizados: el subgrupo A dominó durante dos períodos y el subgrupo B dominó en uno (Russi et al., 1989).

Los aislamientos de VSRH colectados durante 15 períodos epidémicos en Rochester, New York, fueron analizados. El subgrupo A predominó durante 9 años, ambos subgrupos predominaron en igual proporción durante 4 años y el subgrupo B predominó durante 2 años. Dentro de cada subgrupo fueron identificados varios genotipos. Dos y tres variantes fueron encontradas dentro de los subgrupos A y B respectivamente (Hall et al., 1990). En 14 laboratorios de E.U y Canadá durante dos períodos consecutivos, fue analizado un grupo de aislamientos. Dentro de los subgrupos A y B fueron identificados 6 y 3 variantes respectivamente (Anderson et al., 1991). En Río de Janeiro, Brasil, entre 1982 y 1988, se analizó un grupo de aislamientos; ambos subgrupos fueron identificados en cada período epidémico, 4 variantes antigénicas dentro del subgrupo A y 3 variantes dentro del grupo B fueron reconocidas (Siqueira et al., 1991). En

Vancouver, Canadá, se detectó que ambos subgrupos circularon desde 1987 hasta 1992. Virus del subgrupo B predominaron solamente durante una estación (Thomas et al., 1994).

La variabilidad genética del VSRH, fue primeramente examinada usando digestión con RNasa A, de esta forma una serie de patrones diferentes fueron encontrados para el subgrupo A (Cristina et al., 1991). En Montevideo, Uruguay, la variabilidad antigénica y genética de la glicoproteína G de aislamientos obtenidos durante 6 períodos epidémicos, fue analizada por digestión con RNasa A, reacción con AcMs y secuenciación nucleotídica del gen de la glicoproteína G. Este análisis, mostró nuevamente, que múltiples variantes circularon durante las epidemias y que la división de las cepas por análisis filogenético del gen G y por su reacción con AcMs específicos del gen G fue igual (Garcia et al., 1994).

Se analizaron los aislamientos obtenidos durante 11 períodos epidémicos en Birmingham, Reino Unido. Los genotipos fueron determinados usando TR-RCP y RFLP, combinado con la secuenciación nucleotídica de las muestras seleccionadas. El subgrupo A predominó en 8 epidemias y el subgrupo B en 3. En cada epidemia circularon diferentes genotipos dentro de cada subgrupo. La prevalencia relativa de los genotipos varió cada año, aquel que predominó un año declinó al año siguiente. Algunos de los genotipos no se detectaron en algunos años y después reaparecieron, mientras que otros desaparecieron completamente (Cane et al., 1994). Un estudio similar fue realizado en Seoul, Korea, durante 9 epidemias consecutivas. En el mismo, también se encontró que diferentes genotipos predominaron en cada epidemia, que el genotipo predominante fue reemplazado en la subsiguiente epidemia (Choi and Lee, 2000). Un estudio de 5 años en Rochester, E.U (1990-1995), mostró de igual forma, la circulación de 5 (GA1-GA5) y 4 (GB1-GB4) genotipos dentro de los subgrupos A y B, respectivamente, en cada epidemia, con variación en el genotipo predominante cada año (Peret et al., 1998). Similares resultados fueron obtenidos en Gambia donde el genotipo predominante fue reemplazado cada año (Cane et al., 1999).

Posteriormente Peret y colaboradores en el año 2000 analizaron la variabilidad del VSRH, durante una epidemia (1994-1995) en varias comunidades del Norte de América (Rochester, Houston, Birmingham, St Louis y Winnipeg). Cada comunidad mostró un número de genotipos diferentes (GA1-7 y GB1-4). Las cepas predominantes y el conjunto de patrones de los genotipos circulantes fueron distintos para tres de las cinco comunidades estudiadas. El análisis de la variabilidad genética de la glicoproteína G, de cepas aisladas entre 1998 y 1999 en el Sur de Mozambique, mostró la circulación de ambos subgrupos y dentro de cada subgrupo se identificaron dos genotipos (Roca et al., 2001).

Venter y colaboradores en el año 2001 realizaron un estudio de epidemiología molecular, en cepas aisladas en Soweto (Sudáfrica) durante 4 epidemias consecutivas (1997-2000) En cada epidemia, se detectó la circulación de diferentes genotipos, cambiando el genotipo predominante cada año. Así, dentro del subgrupo A, se observó que durante 1997 predominó el genotipo GA5, el mismo fue reemplazado durante 1998 por el genotipo SAA1 y este a su vez fue reemplazado por GA2 al siguiente año, este último genotipo predominó durante dos períodos consecutivos (1999-2000). Con relación a los genotipos pertenecientes al subgrupo B, se observó que los genotipos GB3 y SAB3 fueron co-dominantes durante los 4 años analizados. También, el análisis de cepas aisladas en otra región de Sudáfrica (Agincourt) durante la temporada 1998-2000 mostró la circulación de dos genotipos dentro del subgrupo A (GA2 y SAA1) y un genotipo dentro del subgrupo B (GB3) (Venter et al., 2002).

Durante dos períodos consecutivos en cuatro provincias de Sudáfrica con diferentes condiciones climáticas también fue analizada la circulación de diferentes genotipos del VSRH en niños con alto riesgo. El subgrupo A fue encontrado con mayor frecuencia. La mayor parte de las cepas aisladas en el año 2000 se agruparon con el genotipo GA2, durante este período se detectó además la circulación de los genotipos SAA1, GA5, SAB1 y SAB3. Los aislamientos pertenecientes al 2001 se agruparon en su mayoría con los genotipos GA5 y SAB3, durante ese año circularon también los genotipos GA2 y GB3 (Madhi et al., 2003).

Se estudio de la variabilidad genética de la glicoproteína G de cepas pertenecientes al subgrupo A del VSRH, aisladas en Uruguay durante 9 epidemias consecutivas (1993-2001). Durante este período se detectó la circulación de los genotipos GA2, GA3 y GA5. En este estudio también fueron analizadas 7 cepas que circularon en Argentina durante el período 1996-1998, 2 de ellas pertenecieron al genotipo GA1 y el resto a GA5 (Frabasile et al., 2003). Otro estudio realizado en Uruguay incluyó el análisis de cepas del subgrupo B que circularon desde 1986 hasta 1996 y durante el período 1999-2001. La mayoría de las cepas analizadas se agruparon en cinco genotipos previamente identificados (GB1, GB2, GB4, SAB2, SAB3). Se detectó además la circulación de dos genotipos denominados URU1 y URU2, los cuales no habían sido descritos hasta el presente. Estos dos nuevos genotipos contenían virus aislados en Uruguay en 1990, 1991, 1999 y 2001 (Blanc et al., 2004).

El análisis de la epidemiología molecular de cepas del subgrupo A aisladas en Bélgica durante 19 años (1983-2001) mostró la circulación de diferentes genotipos (GA1, GA2, GA4, GA5 y BE/A1). Los genotipos GA2 y GA5 circularon en Bélgica en 10 de los 19 años analizados. Cepas con el genotipo GA5 no fueron encontradas en 6 de los 19 años y cepas con el genotipo GA2 no fueron detectadas en 3 de los 19 años. Los genotipos GA1, GA4 y BEA1 fueron encontrados con muy baja frecuencia. El genotipo GA1 fue detectado durante el período 1989-1990, el genotipo GA4 circuló entre 1992 y 1993 y el genotipo BE/A1 se detectó en la temporada 1986-1987 (Zlateva et al., 2004).

Se examinó la variabilidad genética de cepas de VSRH aisladas en Brasil durante 1999. Todas las cepas fueron agrupadas con genotipos previamente identificados, durante este período se detectó la circulación de los genotipos GA2, GA5, GA7, GB3 y SAB3 (Moura et al., 2004). En Kenya durante el período 1999-2003 se analizó la circulación del VSRH. Durante 1999 ambos subgrupos co-circularon en iguales proporciones, el subgrupo A predominó durante los años 2001 y 2002, mientras que el subgrupo B circuló en mayor proporción. Dentro de ambos subgrupos se detectó la circulación de los genotipos GA2, GA5, GB3 y SAB1 (Scott et al., 2004).

La mayoría de los estudios mencionados anteriormente, utilizaron el gen G para dividir los aislamientos en genotipos. El análisis de los aislamientos obtenidos alrededor del mundo, ha mostrado que virus muy similares han circulado al mismo tiempo (Cameron et al., 1992). Por otro lado se ha visto que los aislamientos de un mismo lugar pueden ser muy diversos, mientras que otros se agrupan juntos a pesar del origen geográfico (Sullender, 2000).

II.11. Evolución del VSRH.

Como ha sido detallado anteriormente, los aislamientos de VSRH pudieron ser clasificados en dos subgrupos y dentro de cada subgrupo en diferentes genotipos, siendo la glicoproteína G la proteína más variable. Se ha visto que la mayoría de los cambios nucleotídicos observados en el gen G producen cambios aminoacídicos, indicando que existe una presión selectiva positiva sobre esta proteína (Sullender, 2000; Cane, 2001). En general, los diferentes genotipos del VSRH tienen una distribución mundial y los virus aislados en lugares distantes y en años ligeramente diferentes pueden estar más relacionados que los virus aislados en el mismo lugar durante la misma epidemia (Melero et al., 1997).

El análisis de la secuencia aminoacídica de la glicoproteína G de 48 aislamientos del subgrupo A obtenidos desde 1956 hasta 1993, demostró que los cambios aminoacídicos fueron acumulándose con el tiempo. De este modo, la designación de los aislamientos en genotipos no puede permanecer estática, ya que nuevos genotipos están emergiendo constantemente y algunos genotipos pueden desaparecer totalmente. Por ejemplo, un genotipo común a finales de la década del 1960 fue detectado en el Reino Unido, Suecia y EU, este mismo genotipo no ha sido detectado nuevamente entre los virus circulantes (Cane and Pringle, 1995b; Cane, 2001). En Uruguay se estudió la variabilidad de un grupo de cepas pertenecientes a los subgrupos A y B, en el mismo se demostró nuevamente que sobre la glicoproteína G se ejerce una presión selectiva, que conlleva a la acumulación de cambios aminoacídicos en el tiempo (García et al., 1994; Martínez et al., 1999).

Estudios realizados por diferentes autores han reafirmado que determinadas regiones de la glicoproteína G pudieran estar bajo una presión selectiva. Por ejemplo, ha sido propuesto que la modulación de los sitios de glicosilación del VSRH pueden contribuir a la evasión de la respuesta inmune por la eliminación en la glicoproteína G del reconocimiento de Acs específicos a carbohidratos o por enmascaramiento de sitios antigénicos (Melero et al., 1997; Palomo et al., 2000). Las mutaciones puntuales, los eventos de hipermutaciones y frameshifts también pueden producir cambios en los epítomos eliminando en la glicoproteína G el reconocimiento de Acs específicos (García-Barreno et al., 1990; García et al., 1994; Rueda et al., 1994; Martínez et al., 1997).

El virus Influenza tipo B presenta un modelo de evolución muy similar al descrito para el VSRH (García et al., 1994; Cane and Pringle, 1995a). Este virus causa también epidemias que provocan infecciones respiratorias en el hombre, las cuales son más leves que las causadas por los virus de Influenza A. Presentan múltiples líneas evolutivas co-circulantes dentro de la población humana. Estas líneas pueden coexistir durante largos períodos de tiempo, aunque paralelamente, después de sucesivas epidemias, pueden emerger nuevos virus dentro de cada línea, los cuáles reemplazan a cepas más antiguas (Rota et al., 1992). Entre las proteínas estructurales de los virus ARN, se ha visto que la glicoproteína G del VSRH, es la que presenta mayor grado de tolerancia a los cambios aminoacídicos (García et al., 1994; Martínez et al., 1999).

Por otro lado, existen algunos ejemplos donde el gen G del VSRH ha cambiado poco en el tiempo. Johansen y colaboradores en 1997, utilizando las técnicas de RCP y RFLP examinaron 3 epidemias en Dinamarca. Ellos encontraron que algunos aislamientos eran similares a cepas aisladas hace más de 20 años. Estudios posteriores fueron realizados en diferentes regiones de este mismo país y encontraron nuevamente aislamientos cuyo patrón de restricción era muy similar a cepas antiguas y que no circulan en la actualidad. Estos autores han sugerido, que las fluctuaciones de algunos genotipos causada por la presión selectiva ejercida por la inmunidad del hospedero, favorece a algunas cepas que se encuentran

dentro de la población circulante y que son relativamente estables genéticamente (Johansen et al., 1997; Christensen et al., 1999).

En Gambia durante 1993, predominaron cepas que circularon en Europa durante 1984 y desde ese entonces no habían sido detectadas. Los virus de Gambia parecen ser una mezcla de los virus que están circulando en el mundo desarrollado y que entran al país por medio de la costa, virus de la zona urbana y virus de las regiones más internas de Africa (Cane et al., 1999). Zheng y colaboradores en 1999 examinaron la variabilidad de los genes M, SH, G, F y M2 en cepas aisladas durante 5 años consecutivos. Estos autores no encontraron cambios genético durante este período.

Además de los cambios nucleotídicos que dan lugar a sustituciones de aminoácidos, también se ha observado entre los aislamientos del VSRH cambios de nucleótidos que generan codones de terminación alternativos, produciendo proteínas de diferentes longitudes. En el subgrupo A, la longitud de la glicoproteína G oscila entre 295 y 298 aa (Garcia et al., 1994; Cane and Pringle, 1995b). En el subgrupo B, la posición de los codones de terminación da lugar a mayores variaciones, fluctuando entre 292 y 299 aa (Sullender et al., 1991; Martinez et al., 1999). Otro ejemplo lo encontramos en la glicoproteína G del virus Sincitial Respiratorio Bovino (VSRB), donde la longitud de la proteína varía entre 257 y 263 aa (Mallipeddi and Samal, 1993). Cambios en las posiciones de codones de terminación se han asociado con la emergencia de nuevas líneas evolutivas del VSRH (Garcia et al., 1994). El uso de codones de terminación alternativos podría, por tanto, estar jugando un papel en la evolución a largo plazo de la glicoproteína G del VSRH.

Woelk y Holmes en el 2001 analizaron como actúa la presión selectiva en la glicoproteína G. Ellos identificaron 6 sitios selectivos positivos en ambos subgrupos del VSRH. Todos estos sitios se encontraron en la región del ectodominio, los mismos mostraron asociación con epítomos previamente identificados y con sitios de O-glicosilación, indicando que los anticuerpos que

dirigen la selección natural pueden ser un determinante importante en la evolución del VSRH.

En la evolución de los virus influyen dos características principales: las variaciones genéticas y la selección natural. Las variaciones genéticas se producen como resultado de las mutaciones, recombinaciones y reordenamientos. En el caso de los virus ARN, las mutaciones se producen como consecuencia de incorporaciones erróneas de nucleótidos por la ARN polimerasa durante la replicación del genoma viral, debido a que la misma carece de actividad editora 3'—5' (DeFilippis and Villarreal, 2001). Recientemente ha sido estimado que la frecuencia de mutación de la ARN polimerasa para el subgrupo A del VSRH es de $1,83 \times 10^{-3}$ sustituciones nucleotídicas/sitio/año (Zlateva et al., 2004).

Las variaciones genéticas no son suficientes para dirigir o predecir la trayectoria evolutiva de un organismo. Sin embargo, tal variación es un prerrequisito para un cambio evolutivo. Se ha observado que las poblaciones virales cambian a través del tiempo y estos cambios ocurren porque existen diferencias genéticas entre los individuos que se reproducen satisfactoriamente en una población ancestral y porque sus genes son pasados a los descendientes desproporcionalmente. Cuando estas disparidades ocurren, en respuesta a fuerzas impuestas por el medio ambiente reproductivo (no al azar), se dice que la evolución es impulsada por la selección. La selección natural constituye una fuerza evolutiva que es fuente no solo de variación en las poblaciones, sino que también se ha visto es la causa de la homogeneidad genética en algunas poblaciones (DeFilippis and Villarreal, 2001).

III. MATERIALES Y MÉTODOS.

Se trabajaron un total de 31 cepas de VSRH y 33 muestras clínicas positivas por RCP anidada a VSRH, obtenidas en el laboratorio durante siete temporadas epidémicas (1994-2000). Las mismas se muestran en la Tabla 1 y 2 respectivamente. La nomenclatura empleada indica: el lugar de procedencia, el número asignado del laboratorio y el año en que fue tomada la muestra. Ejemplo: CHab52/94, es una cepa aislada en la Ciudad de La Habana, la número 52 del año 1994.

Tabla 1. Nomenclatura, fecha de aislamiento y procedencia de las cepas usadas en este estudio.

Nombre de las cepas	Año de Aislamiento	Origen	Nombre de las cepas	Año de Aislamiento	Origen
CHab52/94	1994	C. Habana	CHab140/94	1994	C. Habana
CHab54/94	1994	C. Habana	CHab141/94	1994	C. Habana
CHab60/94	1994	C. Habana	CHab151/94	1994	C. Habana
CHab67/94	1994	C. Habana	CHab5/95	1995	C. Habana
CHab69/94	1994	C. Habana	CHab8/95	1995	C. Habana
CHab81/94	1994	C. Habana	CHab10/95	1995	C. Habana
CHab82/94	1994	C. Habana	CHab11/95	1995	C. Habana
CHab83/94	1994	C. Habana	CHab104/96	1996	C. Habana
CHab97/94	1994	C. Habana	CHab195/96	1996	C. Habana
CHab105/94	1994	C. Habana	CHab201/96	1996	C. Habana
CHab106/94	1994	C. Habana	CHab220/96	1996	C. Habana
CHab107/94	1994	C. Habana	CHab91/97	1997	C. Habana
CHab111/94	1994	C. Habana	CHab102/97	1997	C. Habana
CHab115/94	1994	C. Habana	CHab123/97	1997	C. Habana
CHab128/94	1994	C. Habana	CHab223/98	1998	C. Habana
CHab134/94	1994	C. Habana			

Tabla 2. Nomenclatura, fecha de aislamiento y procedencia de las muestras clínicas usadas en este estudio.

Nombre de las muestras	Año de Aislamiento	Origen	Nombre de las muestras	Año de Aislamiento	Origen
CHab52/94	1994	C. Habana	CHab237/98	1998	C. Habana
CHab11/95	1995	C. Habana	CHab239/98	1998	C. Habana
Hol167/95	1995	Holguín	CHab240/98	1998	C. Habana
Hol168/95	1995	Holguín	Tun244/98	1998	Las Tunas
CHab114/97	1997	C. Habana	Tun245/98	1998	Las Tunas
CHab125/97	1997	C. Habana	SC93/99	1999	S. de Cuba
Tun135/97	1997	Las Tunas	SC94/99	1999	S. de Cuba
Tun141/97	1997	Las Tunas	CHab33/00	2000	C. Habana
Tun145/97	1997	Las Tunas	CHab34/00	2000	C. Habana
CHab181/98	1998	C. Habana	CHab37/00	2000	C. Habana
CHab185/98	1998	C. Habana	CHab42/00	2000	C. Habana
CHab197/98	1998	C. Habana	CHab43/00	2000	C. Habana
CHab198/98	1998	C. Habana	Tun50/00	2000	Las Tunas
Cfgo226/98	1998	Cienfuegos	Tun53/00	2000	Las Tunas
Cfgo227/98	1998	Cienfuegos	Tun57/00	2000	Las Tunas
Cfgo228/98	1998	Cienfuegos	SS64/00	2000	S. Spiritus
Cfgo232/98	1998	Cienfuegos	SS65/00	2000	S. Spiritus
CHab236/98	1998	C. Habana			

III.1 Cepas de VSRH.

Las cepas utilizadas en este estudio fueron obtenidas en el Laboratorio Nacional de Referencia de Virus Respiratorios del Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kouri” desde 1994 hasta 1998; estas procedían de niños menores de un año ingresados en las salas de respiratorio con diagnóstico clínico de IRA baja de posible etiología viral, los cuáles fueron atendidos en hospitales pediátricos de la Ciudad de La Habana (Centro Habana, William Soler y Cerro).

III.2 Muestras clínicas.

Se estudiaron muestras clínicas positivas por RCP anidada a VSRH obtenidas en el laboratorio desde 1995 hasta el año 2000, de niños menores de un año ingresados en las salas de respiratorio con los mismos síntomas clínicos descritos anteriormente, provenientes de los hospitales de la Ciudad de La Habana ya descritos, y de hospitales pediátricos provinciales (Sancti Spiritus, Cienfuegos,

Holguín, Las Tunas y Santiago de Cuba). Todos los niños incluidos en el estudio contaron con el consentimiento informado de sus padres/tutores (anexo 1).

Las muestras clínicas tomadas fueron exudados nasofaríngeos obtenidos dentro de las primeras 24 horas de ingreso y con menos de 72 horas desde el inicio de los síntomas. Todos los exudados nasofaríngeos fueron colectados en tubos con tapa de rosca, que contenían 4 mL de medio de transporte virológico (solución de Hanks-lactoalbumin con penicilina G 200 U/mL, estreptomocina 200 µg/mL y anfotericina B 5µg/mL) y transportados a 4° C. Una vez en el laboratorio cada una fue dispensada en 4 viales para diferentes estudios (inmunofluorescencia, RCP, cultivo de tejido y reserva). Las muestras para inmunofluorescencia se trabajaron inmediatamente, el resto fue almacenado a – 70° C hasta su uso.

III.3 Cepas controles.

Se emplearon las cepas prototipos Long y CH18537 del VRSH, pertenecientes a los subgrupos antigénicos A y B, aisladas en Baltimore en 1956, y en Washington en 1962, respectivamente. Se utilizó también la cepa Mon3/88 perteneciente al subgrupo antigénico A, aislada en Montevideo en 1988. Estas cepas fueron donadas gentilmente por el Dr. José A. Melero, Instituto de Salud Carlos III (ISCIII), España.

III.4 Línea celular.

Línea celular Hep-2 (carcinoma laríngeo humano, American Type Culture Collection, ATCC:L-23), mantenida en mínimo esencial (MEM), con 10% de suero bovino fetal (SBF) como medio de crecimiento y al 2 % como medio de mantenimiento, y una solución de penicilina-estreptomocina (0.1 U/mL, 0.1 mg/mL respectivamente). Se prepararon tubos de cultivos con monocapa semiconfluyente de células Hep-2 en medio MEN de crecimiento descrito anteriormente.

III.5 Anticuerpos monoclonales.

Se emplearon AcMs obtenidos contra la glicoproteína G de la cepa Long (25G,

63G, 68G y 78G) (García-Barreno et al., 1989) y de la cepa Mon3/88 (021/5G, 021/7G, 021/9G, 021/2G, 021/19G, 021/1G y 021/21G) (Martínez et al., 1997). Estos AcMs fueron donados gentilmente por el Dr. José A. Melero, ISCIII, España.

III.6 Oligonucleótidos.

Los oligonucleótidos empleados en la RCP anidada y secuenciación nucleotídica de los diferentes genes utilizados en este estudio fueron diseñados y donados gentilmente por el Dr. José A. Melero y por la Dra. Pilar Pérez Breña del ISCIII, España, y se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3. Secuencia de los oligonucleótidos empleados. El signo + indica que el oligonucleótido tiene la misma secuencia que el ARNm del gen correspondiente, y el signo - la cadena complementaria.

Nucleótidos	Posición (nucleótidos)	Secuencia 5'—3'
SH 331 ⁺	331 - 351	GTGAAAATTTACGTTCCAAT
I ₂ G ⁺	1 - 20	GGGGCAAATGCAAACATGTC
OG 295 ⁺	295 - 315	GATCCTCAGCTTGGAATCAGC
OG 316 ⁻	299 - 316	AGCTGATTCCAAGCTGAG
OG 448 ⁺	448 - 468	AAGCCCACTACAAAACAACGC
OG 555 ⁻	533 - 555	TGGATTGTTGCTGCATATGCTGC
OG 695 ⁻	675 - 695	ATTTGGTTTCCTTCATGGGTG
G/F 20 ⁻	1 - 20	GTATAATAGTGTTTTCCGGA
OF 139 ⁻	119 - 139	TTTGCTAACTGCACTGCATGT

III.7 Reactivación de las cepas en cultivo celular.

La reactivación de las cepas se realizó según el protocolo descrito por Cane y Pringle en 1991. Para esto se utilizaron tubos con cultivo semiconfluentes de células Hep2, los cuales fueron inoculados con 200 µL de cada uno de las cepas obtenidas en el laboratorio, así como, de cada una de las cepas controles. Después de 1 hora de adsorción viral a temperatura ambiente se añadió a cada tubo 1mL de MEN (medio de mantenimiento) y se incubó a 37 °C. Se observó diariamente el cultivo, hasta la aparición de efecto citopático (ECP) y se hicieron cambios de medio según las condiciones observadas en el cultivo celular (acidez).

III.8 Obtención de extractos proteicos.

Las monocapas de células infectadas con virus y con un ECP del 80%, se desprendieron de los tubos y se recogieron por centrifugación durante 20 minutos a 2000 revoluciones por minutos (r.p.m.) a 4 °C. El precipitado se lavó dos veces con tampón fosfato (PBS: 137 mM, NaCl, 2.7 mM KCL, 8.1 mM Na₂HPO₄ 1.47 mM KH₂PO₄), después de cada lavado se centrifugó en igualdad de condiciones. El precipitado se resuspendió en 400 µL de tampón de lisis (10 mM Tris-HCl pH 7.6, 140mM NaCl, 5mM EDTA, 1% Tritón X-100, 1% deoxicolato sódico, 0.1% SDS). El material no solubilizado se eliminó por centrifugación a 12.000 r.p.m. durante 5 minutos a 4 °C (Garcia et al., 1994). La concertación de proteínas de los diferentes extractos virales fue determinada mediante el método de Lowry (Lowry et al., 1951).

III.9 Caracterización antigénica mediante el Dot ELISA.

El antígeno (0.5 µg de extracto celular), diluido en 100 µl PBS, se aplicó en forma de gotas sobre tiras de papel Inmobilon/P. Una vez seco, se bloquearon los sitios de unión inespecífica de proteínas con leche descremada al 10 % en PBS durante 1 hora a temperatura ambiente, incubándose posteriormente con los AcMs (diluidos 1:20 en seroalbúmina al 1 % en PBS) 1 hora a temperatura ambiente. Los complejos antígenos-anticuerpos se detectaron mediante el sistema biotina/peroxidasa-estreptavidina/4-cloro-1-naftol. Después de cada una de las etapas descritas, el papel se lavó tres veces con Tween-20 al 0.05 % (v/v) en PBS (Garcia et al., 1994).

III.10 Extracción de ARN.

La extracción de ARNv de las cepas Long y CH18537 y de las cepas obtenidas a partir de cultivo y directamente de las muestras clínicas se realizó por el método del TRIZOL (Invitrogen) siguiendo las instrucciones del fabricante. En todos los casos se tomó un volumen inicial de 500 µL. Se centrifugó a 12 000 r.p.m. durante 15 minutos a 4 °C, se eliminó el sobrenadante y el precipitado se resuspendió en

500 μL de Trizol; posteriormente se incubó 5 minutos a temperatura ambiente. Seguidamente se añadieron 100 μL de cloroformo, se mezcló por vortex, se incubó 3 minutos a temperatura ambiente, se centrifugó en igualdad de condiciones y se transfirió la fase superior a otro tubo eppendof. Posteriormente 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 bajo las mismas condiciones mencionadas anteriormente. El ARN se lavó con 500 μL de Etanol 75 %, se centrifugó 15 minutos en iguales condiciones, se eliminó el sobrenadante, se secó el ARN en el gabinete de seguridad y el mismo fue resuspendido en 30 μL de agua estéril, libre de RNAsa.

III.11 Transcripción reversa y reacción en cadena de la polimerasa.

Para la Transcripción Reversa y el primer paso de amplificación se realizó según el protocolo descrito por Coiras y colaboradores en el 2003 (Coiras et al., 2003). Para esto se añadieron a la mezcla de reacción 10 μL del ARN extraído. En la mezcla se emplearon 10 μL de AMV/Tfl 5X, 1 μL AMV RT (5 U/ μL), 1 μL de Tfl ADN polimerasa (5 U/ μL), 6 μL de MgSO_4 (25 mM), 1 μL de dNTP (10 mM), 1 μL de cada oligonucleótido (100 ng) y se completó con agua bidestilada estéril libre de RNAsa para un volumen final de 50 μL . La mezcla de reacción para la TR-RCP se colocó en un Termociclador (MJ Research, PTC 150) con el siguiente programa: para efectuar la RT primeramente se incubó la mezcla de reacción a 65 °C durante 15 minutos y luego a 42 °C durante 45 minutos. La inactivación de dicha 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 por 5 minutos. Se estudió el gen completo de la glicoproteína G de las cepas correspondientes al período 1994-1996 utilizando los oligonucleótidos I₂ G- OF 139, en el caso de las muestras clínicas se utilizaron los oligonucleótidos SH 331-OF 139.

III.12 Reacción en cadena de la polimerasa anidada.

La RCP anidada se realizó según el protocolo descrito por Coiras y colaboradores en el 2003 (Coiras et al., 2003). Para esto se añadieron 2 μL de la primera RCP a la mezcla de reacción constituida por 0.25 μL de AmpliTaq Polimerasa (5 U/ μL), 5 μL de Buffer RCP (10X), 6 μL MgCl_2 (2mM), 0.8 μL de dNTP (25 mM), 1 μL de cada oligonucleótidos interno (100 ng) y agua bidestilada estéril libre de RNAsa para un volumen final de 50 μL . La mezcla de la RCP anidada se colocó en el mismo Termociclador mencionado anteriormente. Previo a 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 55 °C por 1 minuto, polimerización 72 °C por 1 minuto), con una extensión final de 72 °C por 5 minutos. La segunda reacción de amplificación del gen G, se le realizó solamente a las muestras clínicas, los oligonucleótidos utilizados fueron I2G-OG316, OG295-OG695, OG448-G/F20.

III.13 Detección del producto amplificado.

Una vez concluida la RCP se tomaron 8 μL de cada uno de los productos de la reacción de amplificación y se mezclaron con 2 μL de tampón estabilizador de muestra 6X (EDTA 500 mM, Glicerol 10%, azul de bromofenol 0.01%). Estos productos fueron detectados en geles de agarosa al 1% y 2% en TBE 1X (Tris 0.089M, ácido bórico 0.089M, EDTA 0.002M) mediante tinción de bromuro de etidio (10mg/mL). La corrida se realizó a 90V durante 1 hora, empleando como marcador de peso molecular el Marker VIII (Promega), con un rango entre 100 y 1500 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 489 pb y para el gen G completo fue 1104 pb.

III.14 Purificación del producto amplificado.

El ADN amplificado por la RCP anidada del gen G se purificó para realizar la secuenciación nucleotídica, siguiendo el protocolo descrito en el estuche comercial de secuenciación. Para la purificación, se mezclaron 40 μL del producto amplificado de la RCP anidada con 40 μL de Isopropanol y 8 μL de Acetato de Amonio 5 M. Esta mezcla fue centrifugada a 14 000 r.p.m. durante 10 minutos a 4°C, se eliminó el sobrenadante cuidadosamente y el precipitado fue lavado con 200 μL de Etanol al 70 %. Se centrifugó nuevamente en igualdad de condiciones. El precipitado se secó y fue resuspendido en 10 μL de agua destilada estéril libre de RNAsa.

III.15 Secuenciación nucleotídica automatizada.

La secuenciación nucleotídica, se realizó con el estuche comercial (Thermo Sequenase Cy5 Dye Terminator Cycle Sequencing Kit, Promega). Para esto se prepararon primeramente 4 viales marcados con A, C, G, T, a cada vial se le adicionó la mezcla #1 compuesta por: 2 μL de Cy5-ddNTP (ddATP, ddCTP, ddGTP, ddTTP en correspondencia con los viales marcados), 4 μL de dNTP (1.1mM) y agua bidestilada estéril libre de RNAsa para un volumen final de 22 μL , se mezcló por vortex, se le dio un golpe de centrifuga y se almacenó en hielo hasta su posterior uso. Para cada reacción de secuencia se preparó un vial con la mezcla de reacción #2 (3.5 μL del producto del RCP purificado, 2 μL de primer 4 pmol, 3.5 μL del buffer de reacción, 1 μL de la Termo Secuenasa I ADN Polimerasa 10 U/ μL y agua bidestilada estéril libre de RNAsa para un volumen final de 27 μL), la misma fue mezclada gentilmente por vortex. Se prepararon nuevos viales marcados con A, C, G, T, los mismos fueron colocados en hielo, a cada uno se le añadió 2 μL de la mezcla #1 según el tubo marcado, seguidamente fueron añadidos 6 μL de la mezcla #2, los viales fueron agitados por vortex, seguido de un golpe de centrífuga. La mezcla de reacción fue colocada en el termociclador descrito anteriormente. Se efectuaron 30 ciclos de amplificación (desnaturalización 95 °C por 30 segundos, hibridación 60 °C por 30 segundos y

extensión a 72 °C por 1 minuto y 20 segundos). Para la secuenciación se utilizaron los mismos oligonucleótidos empleados en la RCP anidada para el gen F y para el gen G fueron utilizados los oligonucleótidos L₂G, OG 448, OG 555, G/F20 y OF 139.

III.16 Purificación del producto de secuencia.

El producto secuenciado se purificó según las instrucciones del estuche de secuenciación. Al mismo se le añadió 2 µL de Acetato de Amonio 7.5 M, 2 µL de glicógeno y 30 µL de Etanol frío al 100%, se mezcló por vortex y se incubó toda la noche a -20 °C para precipitar el ADN, seguidamente se centrifugó a 13 000 r.p.m. durante 30 minutos a 4 °C. El sobrenadante fue eliminado cuidadosamente utilizando pipetas, el precipitado fue lavado con 200 µL de Etanol frío al 70% y centrifugado bajo las mismas condiciones descritas anteriormente. El sobrenadante fue eliminado cuidadosamente, el precipitado se secó al vacío durante 2-3 minutos, al mismo se le añadió 6 µL de formamida y fue resuspendido vigorosamente por vortex. Justamente antes de aplicar en el gel, las muestras fueron calentadas en un bloque térmico a 70 °C durante 3 minutos y colocadas inmediatamente en hielo. Los productos de la secuenciación fueron separados en gel desnaturizante de poliacrilamida 6 % y Urea 7 M, la polimerización del gel se realizó con luz U.V durante 10 minutos, el buffer de corrida utilizado fue el TBE 0.5 X. La corrida se realizó a 1500 V durante 8 horas. La lectura de la secuencia se realizó a través de una computadora.

III.17. Métodos empleados para analizar y comparar secuencias.

Los datos de cada una de las secuencias fueron primeramente analizadas con el software Chromas (versión 1.3; C. McCarthy, 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 consensos finales.

Las secuencias nucleotídicas y aminoacídicas del subgrupo A y B del VSRH fueron alineadas separadamente utilizando el Clustal X 1.64b (Thomps et al., 1997). El análisis filogenético se realizó usando 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 fue evaluado estadísticamente calculando el bootstrap con 1000 réplicas (paquetes de software contenidos en el programa MEGA versión 2.3) (Kumar et al., 2001).

III.18 Secuencias de cepas VSRH empleadas.

Un total de 32 secuencias de VSRH fueron obtenidas de la base de dato del GenBank. Las mismas se muestran en la tabla 4.

Tabla 4: Nomenclatura, fecha de aislamiento, clasificación en subgrupos y procedencia de las cepas utilizadas en este estudio obtenidas de la base de datos del Gen Bank.

Cepas	Año 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
Mad/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	1994-5	A	Estados Unidos
NY103/94-5	1994-5	A	Estados Unidos
MO01/94-5	1994-5	A	Estados Unidos
Tx68532	1994-5	A	Estados Unidos
AgA48/99	1999	A	Sudáfrica

Cepas	Año de Aislamiento	Grupo	Origen
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	1990-4	B	Estados Unidos
NY01/94-5	1994-5	B	Estados Unidos
NY97/94-5	1994-5	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

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

IV.1 Variabilidad antigénica y genética de la glicoproteína G de cepas del VSRH aisladas en la Ciudad de La Habana desde 1994 hasta 1998.

En este trabajo nos hemos centrado en la glicoproteína G del VSRH, que como ya fue descrito en la revisión bibliográfica, es el componente estructural del virus que presenta el mayor grado de heterogeneidad antigénica y genética inter e intra subgrupos. Esto la señala como mejor candidato para realizar estudios de variabilidad entre los diferentes aislamientos de este virus, que pueden diferenciarse en su glicoproteína G aunque tengan idénticos otros productos génicos.

IV.1.1 Caracterización antigénica de la glicoproteína G por reactividad frente a un panel de AcMs.

Como ya fue descrito anteriormente se han identificado en la glicoproteína G tres tipos de epítomos que reconocen AcMs murinos. Aquellos que reconocen epítomos variables han sido utilizados en estudios de caracterización antigénica. Estos estudios han permitido establecer una correlación entre los cambios antigénicos y genéticos observados en la glicoproteína G de las cepas pertenecientes al subgrupo A. Los anticuerpos que reconocen epítomos conservados han sido útiles para el diagnóstico de infecciones causadas por el VSRH y los específicos de subgrupo en estudios de tipado (García et al., 1994).

Para estudiar la variabilidad antigénica de la glicoproteína G, se trabajaron 31 cepas de VSRH, aisladas en el Laboratorio Nacional de Referencia de Virus Respiratorios de IPK, procedentes de los brotes ocurridos en la Ciudad de La Habana desde 1994 hasta 1998. Los extractos proteicos obtenidos de las células Hep-2 infectadas con estas cepas, se analizaron por ensayos de Dot ELISA utilizando un panel de AcMs preparados contra la glicoproteína G de las cepas Long y Mon3/88. En este análisis fueron incluidos los extractos proteicos de dos cepas del subgrupo A; la cepa de referencia Long y la cepa Mon3/88, un extracto

proteico de la cepa de referencia del subgrupo B (CH18537) y un extracto proteico de células Hep-2 sin infectar como control negativo. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 5.

Todas las cepas aisladas en Cuba correspondientes al período 1994-1998 pertenecieron al subgrupo antigénico A. En la glicoproteína G de estas cepas se identificaron tres tipos de epítomos:

Epítomos conservados: presentes en todas las cepas analizadas (reconocidos por los AcMs 021/1G y 021/21G).

Epítomos específicos del subgrupo A: presentes también en todas las cepas analizadas del subgrupo A (reconocidos por los AcMs 021/2G y 021/19G).

Epítomos variables: dentro de este grupo se observaron dos patrones de reactividad: las cepas que reaccionaron con los AcMs específicos de la cepa Long y no lo hicieron con los AcMs obtenidos frente a la cepa Mon3/88, y las cepas que no reaccionaron con los AcMs específicos de Long, pero sí lo hicieron con los AcMs específicos de Mon3/88. Todas las cepas que circularon desde 1994 hasta 1996 reaccionaron con los AcMs preparados contra la cepa Long (25G, 68G, 78G), ninguna de estas cepas fueron reconocidas por el AcM 63G. Las cepas correspondientes al año 1997 reaccionaron con los AcMs 021/5G, 021/8G y 021/9G, las cepas CHab102/97 y CHab91/97 también reaccionaron con el AcM 021/7G y la cepa CHab223/98 reaccionó con los AcMs 021/8G y 021/9G. Las cepas pertenecientes al período 1997-1998 fueron reconocidas además por el AcM 63G específico de Long.

Las cepas Long y Mon3/88 reaccionaron con los AcMs que reconocen epítomos conservados, epítomos específicos del subgrupo A y epítomos específicos de cepa, la Mon3/88 reaccionó además con el AcM 63G. La cepa CH18537 solamente reaccionó con los AcMs que reconocen epítomos conservados, las células Hep-2 sin infectar no fueron reconocidas por ningún AcM.

Las propiedades antigénicas de las cepas aisladas durante los brotes epidémicos ocurridos en la Ciudad de La Habana desde 1994 hasta 1996 fueron sorprendentes, ya que cepas más recientes aisladas en otras partes del mundo pertenecientes al subgrupo antigénico A no reconocieron los AcMs específicos de Long (25G, 68G y 78G). Otra característica única encontrada en las cepas cubanas, aisladas entre 1994 y 1996, fue la pérdida de reactividad frente al AcM 63G. Este epítipo ha sido conservado en la mayoría de las cepas del subgrupo A estudiadas en diferentes partes del mundo, incluyendo las cepas Long y Mon3/88. Otra particularidad encontrada en estas cepas fue que las mismas presentaron igual respuesta antigénica frente a AcMs que reconocen epítipos variables.

Se estudió la caracterización antigénica de un grupo de cepas aisladas en Madrid y en Montevideo desde 1987 hasta 1993 con el mismo panel de AcMs utilizados en nuestro trabajo. En este estudio se encontró que, la mayoría de las cepas perdían su reactividad frente a los AcMs preparados contra la cepa Long y no así frente a los AcMs específicos de la cepa Mon3/88, por otro lado se observó que el reconocimiento del AcM 63G estaba conservado entre todas las cepas (Garcia et al., 1994). Cane y Pringle (1995a) realizaron estudios de evolución de un grupo de cepas aisladas en diferentes partes del mundo desde 1956 hasta 1993, para el análisis antigénico utilizaron también los mismos AcMs que se usaron en nuestro estudio. Ellos encontraron que los AcMs específicos de Long eran reconocidos solamente por cepas antiguas y que las cepas más recientes reaccionaron con los AcMs específicos de la cepa Mon3/88. El reconocimiento del AcM 63 G se conservó en todas las cepas analizadas.

En Viena se estudió la diversidad antigénica de cepas de VSRH que circularon durante los meses de invierno desde 1987 hasta 1994, utilizando un panel de AcMs. En este estudio se demostró que AcMs preparados contra la glicoproteína G de la cepa Long que reconocen epítipos específicos, no reaccionaron con las cepas que circularon durante el período analizado (Lukic-Grlic et al., 1998).

IV.1.2 Caracterización genética de la glicoproteína G por secuenciación nucleotídica.

Con el objetivo de comprender las bases genéticas del comportamiento inusual, de las cepas que circularon entre 1994 y 1996 en la Ciudad de La Habana, así como, localizar los cambios genéticos responsable de la variación antigénica, de las diferentes cepas estudiadas desde 1994 hasta 1998, se realizó la secuenciación nucleotídica del producto amplificado, del gen de la glicoproteína G, obtenido a partir de ARN extraído de células Hep-2 infectadas con cada una de estas cepas. Para secuenciar el gen completo de la glicoproteína G, primeramente se realizó la síntesis del cADN y a continuación la amplificación de éste por RCP, utilizando los oligonucleótidos 1G/OF139, el fragmento amplificado fue de 1104 pb. La secuenciación nucleotídica se realizó con los mismos oligonucleótidos utilizados en la amplificación y con el OG448 y el OG 555.

Al analizar los resultados obtenidos de la secuenciación del gen G, se observó un alto grado de identidad entre las cepas del período 1994-1996 y la cepa Long de referencia. Todas las cepas fueron iguales entre sí y muy parecidas a Long, con sólo 6 cambios a nivel nucleotídico en todo el gen (posiciones 58, 260, 640, 659, 746 y 888), la cepa de CHab220/96 presentó además un cambio en la posición 824, de estos, 6 resultaron ser cambios aminoacídicos (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. Los resultados se muestran en la tabla 6 A) y B).

Estudios previos con virus mutantes a AcMs anti-G preparados en las cepas Long y Mon3/88, han permitido identificar aa esenciales para la integridad de los epítomos variables o específicos de cepa correspondiente, localizándose, excepto para el 021/5G, en el tercio C-terminal de la glicoproteína G (García-Barreno et al., 1990; Rueda et al., 1991; Martínez et al., 1997).

Datos de secuencia de virus mutantes que no son reconocidos por el AcM 63G (García-Barreno et al., 1990) y el mapeo con péptidos sintéticos (García-Barreno et al., 1992) indicaron que los aa esenciales para la integridad del epítomo 63G, se ubican entre las posiciones 205-211 (KPTFKTT) de la secuencia de la

glicoproteína G. La pérdida de reactividad de este epítipo en las cepas cubanas aisladas entre 1994 y 1996, se asoció a un cambio en la posición 209. Este aa (209K-E) está incluido dentro de la secuencia del péptido sintético que reproduce el epítipo 63G. Esto explica la pérdida de reactividad de estas cepas frente al AcM 63G. Este cambio es único en las cepas cubanas que circularon durante ese período y no ha sido encontrado en cepas analizadas del subgrupo A de otras partes del mundo (Garcia et al., 1994; Cane and Pringle, 1995a).

Tabla 6. A) Cambios nucleotídicos y B) aminoacídicos de la glicoproteína G observados en las cepas aisladas en la Ciudad de La Habana (1994-1996) comparados con la secuencia de la cepa Long del INS: Instituto Nacional de Salud. ND: no fueron determinado, *aislamientos vírales, ** muestras clínicas.

A)

Virus	Posición nucleotídica						
	58	260	640	659	746	824	888
Long (INS)	A	A	A	A	U	C	U
CHab52/94*	C	U	G	U	C	C	A
CHab52/94**	C	U	G	U	ND	ND	ND
CHab11/95*	C	U	G	U	C	C	A
CHab11/95**	C	U	G	U	ND	ND	ND
CHab195/96*	C	U	G	U	C	C	A
CHab220/96*	C	U	G	U	C	U	A

B)

Virus	Posición Aminoacídica					
	15	82	209	215	244	270
Long (INS)	K	Q	K	H	I	S
CHab52/94*	Q	L	E	L	T	S
CHab52/94**	Q	L	E	L	ND	ND
CHab11/95*	Q	L	E	L	T	S
CHab11/95**	Q	L	E	L	ND	ND
CHab195/96*	Q	L	E	L	T	S
CHab220/96*	Q	L	E	L	T	F

Las secuencias nucleotídicas de las cepas aisladas entre 1997 y 1998 fueron diferentes entre sí y diferentes de las cepas que circularon durante el período 1994-1996 y por tanto de la cepa Long, por esta razón no reaccionaron con los AcMs preparados contra esta cepa (excepto con el 63 G). En el análisis de las secuencias de la glicoproteína G de estos virus, se pudo comprobar que la pérdida

del reconocimiento del AcM 021/7G por las cepas CHab123/97 y CHab223/98 se debió a la sustitución de los aa en las posiciones 289 (S-P) y 290 (L-P). La pérdida del epítipo 021/5G en la cepa CHab223/98 se pudo relacionar con un cambio en el residuo 142 (Q-T). Estos cambios coinciden con los seleccionados en los virus mutantes obtenidos frente a estos AcMs y con cambios encontrados en cepas aisladas en Madrid y Montevideo. De este modo, se identificaron cepas aisladas en estas regiones geográficas, las cuales tenían cambiadas las posiciones 289 (S-P) y 290 (L-P/S) y por lo tanto no reaccionaron con el AcM 021/7G. Se encontraron también, dos cepas mutantes que no fueron reconocidas por el AcM 021/5G, las mismas tenían alteradas las posiciones 142 (Q-K) y 145 (K-R). Por otro lado, se encontró un grupo de cepas que habían perdido su reactividad frente a este último AcM, pero en estos casos, la pérdida de este epítipo se asoció con un cambio próximo a estas posiciones (Garcia et al., 1994; Martinez et al., 1997).

Como las cepas correspondientes a la etapa 1994-1996 eran iguales y muy similares a la cepa Long, decidimos secuenciar la misma región donde se observaron los cambios en las cepas cubanas, en dos de las muestras clínicas a partir de las cuales se realizaron los aislamientos. Para esto se amplificó el ARN extraído de las muestras clínicas CHab52/94 y CHab11/95, los oligonucleótidos utilizados fueron los mismos que se usaron en la amplificación de los aislamientos. Además, se realizó una segunda reacción de amplificación para incrementar la cantidad de ADN, en este caso se utilizaron los oligonucleótidos I₂G/OG316 y OG295/OG695, estos juegos de oligonucleótidos amplificaron dos fragmentos de 316 pb y 400 pb, respectivamente. La secuenciación de las mismas, se realizó con los mismos oligonucleótidos usados en la segunda amplificación.

Secuenciando directamente a partir de la muestra clínica, pudimos comprobar que los cambios nucleotídicos encontrados en las cepas en las posiciones 58, 79, 260 y 640 fueron similares a los encontrados en las muestras clínicas originales. Estos resultados anularon la posibilidad de que esos cambios fueran seleccionados durante la adaptación de esas cepas al cultivo celular.

En este estudio resultó ser también un hallazgo inusual que las cepas que circularon desde 1994 hasta 1996 en un mismo lugar mostraran una secuencia idéntica en el gen de la glicoproteína G. Muchos han sido los estudios de variabilidad genética en los genes G, N y SH del VSRH y se ha visto que el gen de la glicoproteína G es el que presenta mayor grado de variabilidad, el gen N es el menos variable y el SH muestra una variabilidad intermedia (Johnson and Collins, 1988; Johnson and Collins, 1989; Collins et al., 1990).

Durante una misma epidemia múltiples genotipos han sido identificados, así, el análisis de los genes N y SH de 40, aislamientos obtenidos durante el período 1989-1990 en Birmingham, permitió identificar 4 genotipos dentro del subgrupo A (SHL1-4) y dos genotipos dentro del subgrupo B (NP1 y NP3) (Cane and Pringle, 1991). En estudios posteriores en el Sur de Birmingham se determinó la prevalencia de diferentes genotipos (SHL1-6 y NP1, 3) durante 5 períodos epidémicos (1988-1993). Una mezcla de genotipos circuló en cada epidemia, el genotipo que predominó un año declinó al año siguiente (Cane et al., 1994). Otras evidencias de co-circulación de cepas genéticamente diferentes en una misma epidemia fueron descritas en Estados Unidos y en Montevideo; mediante la digestión con RNasa A se pudieron detectar diferentes patrones de fingerprints en el gen de la glicoproteína G (Storch et al., 1989; Cristina et al., 1991; Garcia et al., 1994). Coggins y colaboradores (1998) observaron similares hallazgos, por RFLP del gen G y por secuenciación nucleotídica de la región más variable de dicho gen en cepas del subgrupo A del VSRH aisladas durante tres epidemias consecutivas en Alabama (1993-1996).

En Montevideo y en Madrid fueron estudiados diferentes aislamientos de varios períodos epidémicos por secuenciación nucleotídica del gen de la glicoproteína G; en cada temporada epidémica se observaron también diferentes genotipos (Garcia et al., 1994). Un estudio realizado durante 1990-1995 en Rochester mostró la circulación de múltiples genotipos en cada epidemia, variando el genotipo predominante cada año (Peret et al., 1998). Resultados similares fueron encontrados en Corea del Sur, Mozambique, Japón y Sudáfrica (Choi and Lee,

2000; Kamasaki et al., 2001; Roca et al., 2001; Venter et al., 2001; Venter et al., 2002; Venter et al., 2003).

La homogeneidad de las cepas de VSRH que circularon en la Ciudad de La Habana entre 1994 y 1996 y su parecido con una cepa antigua (cepa Long), constituye una característica única cuando son comparadas con las cepas de países con clima templado y con diferentes estatus socioeconómico. La estacionalidad de las infecciones por este virus difiere entre las zonas de clima tropical y templado. Mientras que las epidemias en los países con clima templado ocurren en invierno, en Cuba a pesar de ser país tropical las infecciones con este virus se distribuyen desde septiembre hasta febrero. La influencia de la estacionalidad en la evolución del virus se desconoce pero las características climáticas, geográficas e insulares de nuestro país pudieran estar influyendo en este comportamiento inusual del virus.

IV.1.3 Relación entre la variabilidad genética y antigénica de cepas de VSRH del subgrupo A aisladas entre 1994 y 1998.

Con el fin de relacionar la variabilidad genética de cada cepa con su reactividad antigénica se alinearon las secuencias nucleotídicas con el programa Clustal X y se construyó un árbol filogenético por el método de neighbor-joining (programa MEGA). Para esto se utilizaron los datos correspondientes a las secuencias de nucleótidos del gen G completo de las cepas aisladas en el Laboratorio Nacional de Referencia de Virus Respiratorios del IPK que circularon durante 1994-1998. En el caso de las cepas que circularon durante el período 94-96 se utilizaron solamente 7 secuencias por ser todas iguales. En este análisis se incluyeron secuencias de virus que circularon en otras partes del mundo publicadas en el GenBank. Los resultados se muestran en la figura 4.

En la caracterización antigénica con AcMs que reconocen epítomos variables de las cepas aisladas durante este período, discutida anteriormente, se observaron dos patrones de reactividad, los mismos se relacionaron con las posiciones de los aislamientos en el árbol filogenético. Así, por ejemplo, las cepas de la rama inferior del árbol, donde se localizan todas las cepas del período 94-96 y la cepa

Long reaccionaron con los AcMs 68 G, 78 G y 25 G (excepto con el 63G) y no con los AcMs específicos de la cepa Mon3/88. En cambio, las cepas del período 97-98 localizados en la rama superior no reaccionaron con los AcMs específicos de Long (excepto con el 63 G) y sí con los AcMs preparados contra la cepa Mon3/88. Además, se pudieron relacionar otros cambios con la diversificación genética. De este modo, la rama superior se dividió en dos sub-ramas, la de arriba estaba integrada por las cepas CHab91/97 y CHab102/97. Estas cepas se encontraban muy estrechamente relacionadas con la cepa Mon3/88 y por tanto fueron reconocidas por todos los AcMs preparados contra la esta cepa. Sin embargo, las cepas CHab223/98 y CHab123/97 (agrupadas en la otra sub-rama) estaban muy relacionadas con otras cepas de Madrid y Montevideo. Todas estas cepas tenían cambios en los epítomos reconocidos por los AcMs 021/7G y 021/5G específicos de Mon3/88.

García y colaboradores en 1994 realizaron estudios sobre la caracterizaron antigénica y genética de cepas aisladas en Madrid y Montevideo desde 1987 hasta 1993 (García et al., 1994). Estos autores también encontraron, que el reconocimiento de epítomos específicos de las cepas por AcMs anti-G en virus del subgrupo A, estaba muy relacionado con la posición de las cepas en el árbol filogenético. Otros autores estudiaron la proteína G de 48 virus aislados en diferentes regiones del mundo durante 38 años (desde 1956 hasta 1993). Ellos encontraron que los cambios antigénicos detectados con un panel de AcM anti-G se relacionaron con las posiciones de los aislamientos en el árbol generado por el análisis de la relación de las secuencias nucleotídicas y aminoacídicas (Cane and Pringle, 1995a).

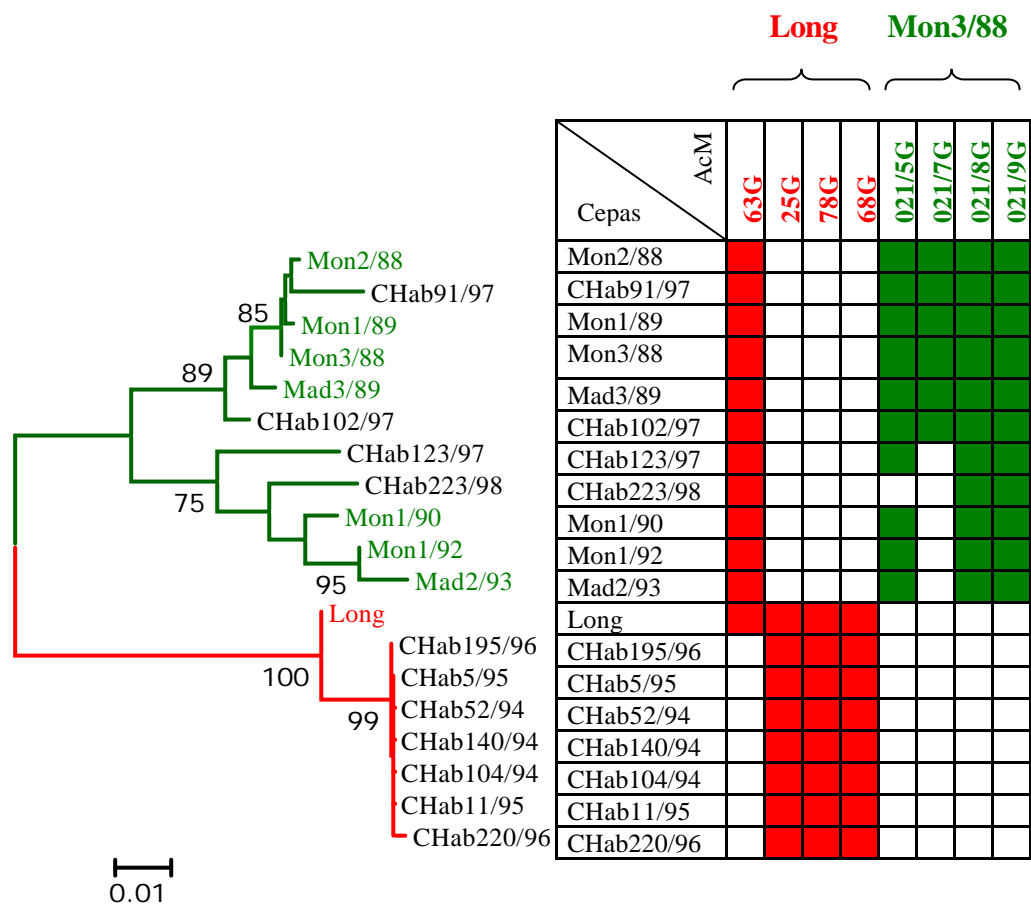


Figura 4. Análisis filogenético y antigénico de las cepas de VSRH del subgrupo A aisladas en la Ciudad de La Habana entre 1994 y 1998. A la izquierda se encuentra el árbol filogenético, este fue construido por el método de neighbor-joining con los datos de las secuencias del gen G completo de cada cepa. A la derecha de la figura se muestra la reactividad por dot ELISA de las cepas con los AcMs específicos de Long y Mon3/88 indicados en la parte superior del cuadro.

Estudios más reciente analizaron la variabilidad de la glicoproteína G, de 25 cepas aisladas en Uruguay y 7 en Argentina, pertenecientes al subgrupo A durante 9 epidemias consecutivas (1993-2000), observándose que existe relación entre los cambios encontrados a nivel antigénico con el análisis filogenético (Frabasile et al., 2003).

IV.3 Variabilidad genética del tercio C-terminal de la glicoproteína G del VSRH en muestras clínicas provenientes de 6 provincias de Cuba desde 1995 hasta el 2000.

La variabilidad de la glicoproteína G se encuentra concentrada en la región del ectodominio, la cuál consiste de dos regiones hipervariables separadas por una región conservada de 13 aa. La segunda región variable, correspondiente a la región del tercio C-terminal de la glicoproteína G, ha sido utilizada para realizar los estudios de variabilidad del gen G completo y posteriormente ha sido usada para el análisis filogenético en los estudios de evolución molecular.

IV.3.1 Detección y clasificación del VSRH en muestras clínicas mediante RCP y secuenciación nucleotídica del tercio C-terminal de la glicoproteína G.

Con el objetivo de detectar y conocer la circulación de ambos subgrupos del VSRH en 6 provincias del país, se secuenció el producto amplificado de la región variable del gen de la glicoproteína G (correspondiente al tercio C-terminal), obtenido a partir del ARN extraído de 33 muestras clínicas colectadas durante 5 epidemias consecutivas (1995-2000). Para la secuenciación primeramente se realizó la síntesis del cADN y a continuación la amplificación de éste por RCP, utilizando los oligonucleótidos SH331-OF139. Se realizó una segunda amplificación a partir del producto amplificado, los oligonucleótidos utilizados fueron OG 448 y G/F20, el fragmento amplificado fue de 528 pb. Este fragmento fue secuenciado con los mismos oligonucleótidos usados en la segunda reacción de amplificación.

De un total de 33 muestras clínicas (1995-2000) positivas a VSRH por RCP, 27 pertenecieron al subgrupo antigénico A y 6 al subgrupo B. La clasificación de cada subgrupo se realizó por secuenciación nucleotídica. Los resultados de dicha clasificación se muestran en la tabla 8.

Tabla 8. Clasificación en subgrupos del VSRH de las muestras clínicas analizadas en el período 1995-2000

Muestras Clínicas	Subgrupo	Muestras Clínicas	Subgrupo	Muestras Clínicas	Subgrupo
Hol167/95	A	Cfgo226/98	A	SC94/99	A
Hol168/95	A	Cfgo227/98	A	CHab33/00	B
CHab114/97	A	Cfgo228/98	A	CHab34/00	B
CHab125/97	A	Cfgo232/98	A	CHab37/00	B
Tun135/97	A	CHab236/98	A	CHab42/00	B
Tun141/97	A	CHab237/98	A	CHab43/00	B
Tun145/97	A	CHab239/98	A	Tun50/00	B
CHab181/98	A	CHab240/98	A	Tun53/00	A
CHab185/98	A	Tun244/98	A	Tun57/00	A
CHab197/98	A	Tun245/98	A	SS64/00	A
CHab198/98	A	SC93/99	A	SS65/00	A

El subgrupo antigénico A, se detectó durante todos los años, el subgrupo B se detectó durante el año 2000. La secuencia nucleotídica fue determinada para ambos subgrupos desde el nucleótido 566 hasta el 912 para el subgrupo A y 915 para el subgrupo B, esta región, como ya fue descrita anteriormente, representa la segunda región variable del gen de la glicoproteína G, esta región también fue usada posteriormente para el análisis filogenético. La distribución de las muestras por provincias, años y subgrupos se observa en la tabla 9.

El hecho de que el subgrupo B no fuera detectado hasta el año 2000, pudiera deberse en primer lugar; antes de esa fecha no contábamos con los oligonucleótidos necesarios para amplificar fragmentos de cepas pertenecientes al subgrupo B y en segundo lugar, el número de muestras analizadas en cada año por provincia no fue suficiente. No obstante, la cifra de muestras positivas a VSRH detectadas durante el año 2000 no fue la mayor, de 10 muestras positivas, 6 pertenecieron al subgrupo B y 4 al subgrupo A. Las mismas se distribuyeron de la siguiente forma: 5 (B) provenían de Ciudad de la Habana, 3 (2A/1B) de Las Tunas y 2 (A) de Sancti Spíritus. Es decir, que aunque el número de muestras detectadas en las tres provincias fue bajo, se detectó la circulación del subgrupo B.

Tabla 9. Distribución de las muestras por provincias, años y subgrupos. Al final de la tabla se especifica el total de muestras por año y la derecha el total de las muestras por provincias.

Provincias	1995	1997	1998	1999	2000	Total por provincias
Ciudad Habana	–	2A	8A	–	5B	10A/5B
Cienfuegos	–	–	4A	–	–	4A
Sancti Spíritus	–	–	–	–	2A	2A
Holguín	2A	–	–	–	–	2A
Santiago de Cuba	–	–	–	2A	–	2A
Las Tunas	–	3A	2A	–	2A/1B	7A/1B
Total por años	2A	5A	14A	2A	4A/6B	27A/6B

Hasta la fecha muchos han sido los estudios realizados sobre el comportamiento de los subgrupos A y B del VSRH durante una epidemia. En los mismos ha sido mostrado que existen tres tipos de epidemias; aquellas en las cuales virus de un solo subgrupo son detectados (menos frecuentes), aquellas en las cuales uno de los subgrupos es dominante (mayor frecuencia el subgrupo A) y aquellas en las cuales ambos subgrupos circulan simultáneamente en iguales proporciones. En general, se ha visto que el subgrupo A predomina en más epidemias que el subgrupo B (Sullender, 2000; Cane, 2001).

La co-circulación de los subgrupos A y B fue detectada durante tres epidemias consecutivas (1992-1995) en Dinamarca, el subgrupo B predominó durante la primera y la última epidemia, y el subgrupo A dominó durante el período 1993-1994 (Johansen et al., 1997). El análisis de cepas que circularon durante 5 epidemias consecutivas en una comunidad de Estados Unidos, demostró la co-circulación de ambos subgrupos, el subgrupo B predominó durante el primer y tercer año, el subgrupo A dominó durante el segundo y cuarto año, y cepas de ambos subgrupos estuvieron presentes en iguales proporciones durante el último año (Peret et al., 1998).

Coggins y colaboradores (1998) investigaron virus aislados en Alabama en tres epidemias consecutivas. Estos autores detectaron la circulación de ambos

subgrupos, el subgrupo A predominó en las dos primeras epidemias, mientras que el B fue dominante en la última (Coggins et al., 1998). En el sur de Mozambique se estudió la prevalencia de los subgrupos A y B en cepas aisladas durante 1998-1999. La co-circulación de ambos subgrupos fue observada, el subgrupo B circuló en mayor proporción que el A (Roca et al., 2001). Estudios realizados en una región de Sudáfrica durante el período 1997-2000 mostraron la circulación de ambos subgrupos. Durante 1997 y 1998 ambos subgrupos co-circularon aproximadamente en iguales proporciones, mientras que, el subgrupo A predominó durante los dos siguientes años (Venter et al., 2001).

Se estudió en Kenya la epidemiología molecular del VSRH en cepas aisladas durante la temporada 1999-2003. En todos los años se detectó la circulación de ambos subgrupos. El subgrupo A predominó durante los años 2001 y 2002. Entre los años 1999 y el 2000 ambos subgrupos co-circularon en iguales proporciones y durante el 2003 el subgrupo B fue detectado en mayor proporción (Scott et al., 2004).

IV.3.2 Análisis de la variabilidad genética tercio C-terminal de la glicoproteína G del VSRH.

Todas las secuencias nucleotídicas y aminoacídicas fueron alineadas con el programa Clustal X, los alineamientos se muestran en las figuras 6, 7, 8 y 9. En este alineamiento también fueron incluidas 7 de las cepas aisladas en la Ciudad de la Habana durante los años 1994-1996, las cuales fueron representativas de estos años por presentar todas secuencias nucleotídicas idénticas y cepas de los años 1997 y 1998. Cuando se analizaron las secuencias de los subgrupos A y B en su conjunto, dos subgrupos muy bien definidos fueron observados. Para facilitar dicha comparación las secuencias de ambos subgrupos fueron analizadas separadamente. En cada alineamiento fueron incluidas las secuencias de las cepas prototipo del subgrupo A (Long) y del subgrupo B (CH18537), las mismas fueron obtenidas del GenBank.

Long	ICKRIPNKKP	GKKTTHKPTK	KPTFKTTKDD	LKPQTTKPE	VPTTKPTEEP	TINTTKTNT	TLLTNNTG	NPKLTSQMET	FHSTSSEGNL	SPSQVSTSE	HPSQPSSPPN	TTRQ*	298											
CHab220/96			E						F				298											
CHab140/94			E										298											
CHab5/95			E										298											
CHab11/95			E										298											
CHab104/96			E										298											
CHab195/96			E										298											
Chab52/94			E										298											
CHab181/98	E					V							298											
Tun57/00									L				298											
CHab237/98	R	E		P	S		I	S	R		P	I	Y	S*	297									
Tun135/97	M	C	R		P	S		I	S	R	E		P	I	Y	S*	297							
SC93/99		MR		P	S		I	S	R	E		P	I	Y	S*	297								
CHab114/97		MR		P	S		I	S	R	E		P	I	Y	S*	297								
CHab125/97		R		P	S		I	S	R	E		P	I	Y	S*	297								
Tun141/97		R		P	S		I	S	R	E		P	I	Y	S*	297								
Cfgo227/98		R		P	S		I	S	R	E		P	I	Y	S*	297								
Cfgo228/98		R		P	S		I	S	R	E		P	I	Y	S*	297								
CHab239/98		R		P	S		I	S	R	E		P	I	Y	S*	297								
Tun244/98		R		P	S		I	S	R	E		P	I	Y	S*	297								
Hol168/95		R		P	S		I	S	R	E		P	I	Y	IS*	297								
Tun245/00		R		P	S		I	H	R	E		P	I	Y	S*	297								
Tun145/97		R		P	S		I		R	E	G		P	I	Y	S*	297							
CHab185/98		R		P	S		I	S	R	E		P	I	Y	S*	297								
CHab197/98		R		P	S		I	S	R	E		P	I	Y	S*	297								
Hol167/95		R	R		P	S		I	S	R	E		P	I	Y	S*	297							
Cfgo232/98		R		P	S		I	S	R	E		P	I	Y	S*	297								
CHab236/98		R		P	S		I	S	R	E		IP	G	I	Y	H	I	S*	297					
Cfgo226/98		R		P	S		I	Q	S	R	E		P	I	Y	H	S*	297						
CHab240/98		R		P	S		I	S		E	V		P	I	Y	S*	297							
SC94/99	N	R						S		N			P	I	Y	S*	297							
SS64/00	S				A	DK	I	L	R	S	LEH	E	L	T	IY	YL	P	S	ID	298				
SS65/00	S				A	DK	I	L	R	S	LEH	E	L	T	IY	YL	P	S	ID	298				
CHab123/97	S		R		A	DK	I	A	R	TS	LEH	E	L	T	IY	YL	P	S		298				
CHab223/98	S				AL	K	I	R			LEH	E	L	T	IY	YL	P	S	I	S	298			
CHab102/97					L	K	D	R		S	EH	K	L	T	P	Y	YL	SL	S	N*	297			
CH91-97			R		L	K	R	AA	S		EH	N	E	L	T	P	Y	YL	SL	S	N*	297		
Tun53/00					P		L	K		K	S		EH	K	L	T	P	Y	YL	SL	S	KW	298	
CHab198/98					P	Q	L	K		R	T	K	EH	K	L	T	P	IY	F	L	SP	S	NL	298

Figura 7. Alineamiento múltiple de las secuencias de aminoácidos de cepas de VSRH del subgrupo A que circularon en Cuba durante 1994-2000. En la figura se indican los cambios de aminoácidos respecto a la secuencia Long.

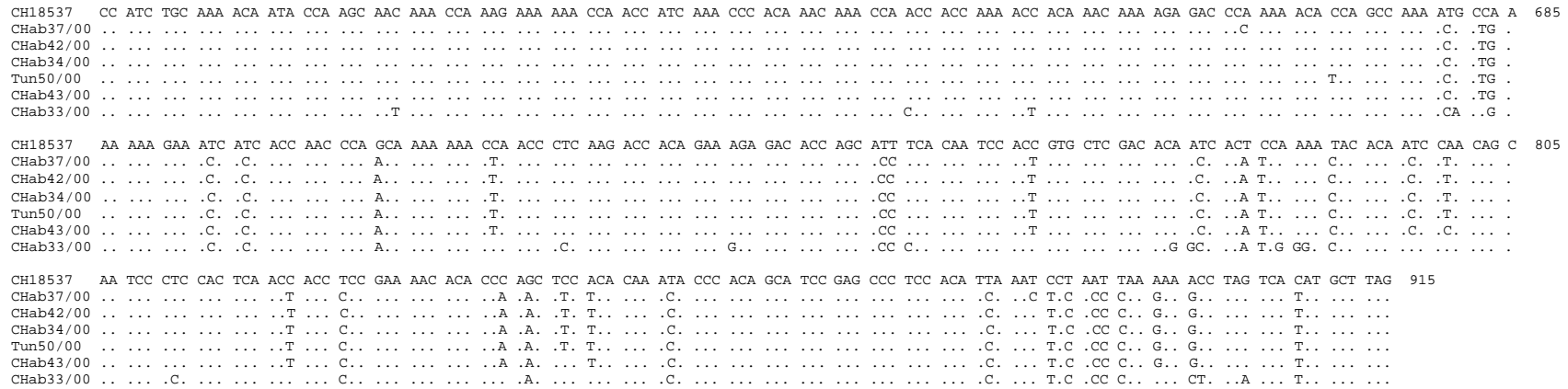


Figura 8. Alineamiento múltiple de las secuencias de nucleótidos del tercio C-terminal gen G de cepas de VSRH del subgrupo B que circularon en Cuba durante el año 2000. En la figura se muestran las diferencias en las secuencias de nucleótidos respecto a la cepa CH18537, así como los posibles codones de parada

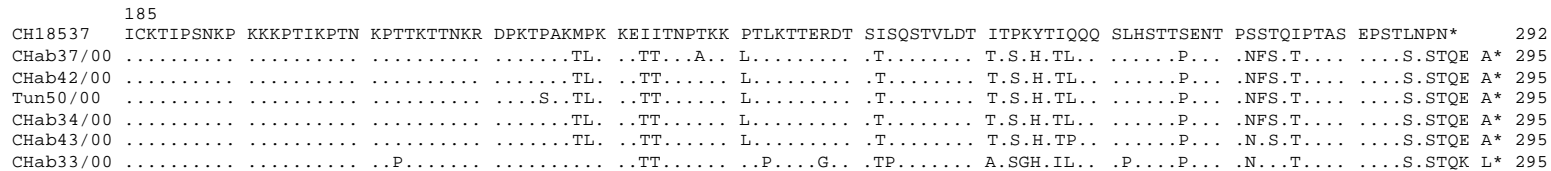


Figura 9. Alineamiento múltiple de las secuencias de aminoácidos de cepas de VSRH del subgrupo B que circularon en Cuba durante el año 2000. En la figura se indican los cambios de aminoácidos respecto a la secuencia CH18537.

Al analizar la región secuenciada de las muestras clínicas, provenientes de las 6 provincias estudiadas, pertenecientes al subgrupo antigénico A del VSRH, encontramos también dos virus cuyas secuencias nucleotídicas fueron muy parecida a la cepa Long. De este modo, se encontraron solamente 4 nucleótidos diferentes en la muestra CH181/98 (posiciones 574, 690, 754 y 831), con dos cambios a nivel aminoacídico (187 K-E y 247 L-V), los cambios en las posiciones 690 y 831 fueron silentes. En la secuencia nucleotídica de la muestra clínica Tun57/00 se encontraron 6 nucleótidos diferentes (posiciones 567, 597, 621, 624, 637 802), con un sólo cambio a nivel de aminoácido (267S-L), los cambios en las posiciones restantes también fueron silentes.

Las secuencias nucleotídicas del resto de las muestras clínicas analizadas de este subgrupo fueron muy diferentes de la cepa prototipo Long. No obstante, también se observaron varias muestras con secuencias idénticas o casi idénticas. Así, vimos que la región secuenciada de las muestras CHab125/97, Tun141/97, Cfgo227/98, Cfgo228/98, CHab239/98 y Tun244/98 presentaron la misma secuencia nucleotídica. Las secuencias de las muestras CHab237/98, Hol168/95, CHab185/98, CHab114/97, SC93/99 Tun245/98, Hol167/95, Cfgo232/98, Tun145/97 y Cfgo226/98 se diferenciaron de las anteriores entre 1 y 3 nucleótidos. Las secuencias de las muestras CHab114/97 y SC93/99 fueron iguales entre sí. Las dos muestras provenientes de Sancti Spíritus del año 2000 fueron muy diferentes de las muestras analizadas en el período 1995-1999, las mismas presentaron también secuencias nucleotídicas iguales.

En el caso de las muestras clínicas pertenecientes al subgrupo B, también se observaron muestras con secuencias idénticas o casi idénticas. De esta manera, pudimos ver que las secuencias de las muestras CHab34/00 y CHab42/00 fueron iguales. Las muestras CHab37/00, Tun50/00 y CHab43/00 se diferenciaron de las anteriores entre 1 y 2 nucleótidos.

En general, al analizar las muestras clínicas pertenecientes al subgrupo A del período 1995-1999 en las 6 provincias estudiadas, se detectaron muestras clínicas con secuencias nucleotídicas muy similares. Las secuencias nucleotídicas de las muestras de Sancti Spíritus y Las Tunas analizadas durante el año 2000 fueron muy diferentes de las que circularon entre 1995 y 1999. Las muestras del subgrupo B analizadas durante el año

2000 en la Ciudad de la Habana y en Las Tunas también presentaron secuencias nucleotídicas muy parecidas. En este estudio la presencia de muestras con secuencias casi idénticas, en la región más variable del gen de la glicoproteína G del VSRH, sugiere que un mismo virus se diseminó en diferentes provincias durante varias temporadas epidémicas.

Estudios previos realizados en diferentes comunidades y en varios períodos han mostrado la circulación de múltiples genotipos y dentro de cada genotipo se han encontrado un número elevado de cepas con secuencias idénticas. En una misma comunidad de los Estados Unidos, durante múltiples epidemias, se observaron cepas con secuencias idénticas. Por ejemplo, dentro del subgrupo A se vio que durante 1993/94 se identificaron 10 aislamientos con iguales secuencias nucleotídicas. Durante los períodos 1990/91 y 1991/92 se detectaron 6 y 15 aislamientos con las mismas secuencias nucleotídicas, respectivamente. Dentro del subgrupo B durante 1993/94 se encontraron también 37 cepas con secuencias nucleotídicas idénticas (Peret et al., 1998). Este estudio fue extendido a diversas comunidades de Estados Unidos durante un mismo período epidémico, durante el mismo se identificaron cepas con secuencias nucleotídicas iguales. De esta manera se encontraron 25, 10 y 28 aislamientos con secuencias nucleotídicas similares en Birmingham, Rochester y St Louis, respectivamente. La presencia de un alto número de secuencias nucleotídicas idénticas en varias comunidades, apoya el concepto, de que algunas cepas son transmitidas a otras regiones geográficas durante una misma temporada epidémica. No obstante, la presencia de cepas con secuencias idénticas no necesariamente demuestra que la transmisión de cepas de VSRH ocurre entre comunidades (Peret et al., 2000). García y colaboradores en 1994 detectaron cepas con secuencias casi idénticas durante 6 años en Madrid y Montevideo (García et al., 1994).

IV.3.3 Cambios genéticos en el tercio C-terminal de la glicoproteína G del VSRH en los virus analizados en 6 provincias de Cuba entre los años 1995 y 2000.

Los cambios encontrados en las secuencias de los virus que han circulado en Cuba, en el período 1995-2000 para ambos subgrupos fueron sustituciones nucleotídicas, observándose que las transiciones fueron más frecuentes que las transversiones.

Resultados similares han sido encontrados en los virus del subgrupo A analizando tanto el gen G completo como el tercio C-terminal de esta proteína. Aunque los estudios de variabilidad genética en las cepas del subgrupo B son más escasos, también ha sido observado que las transiciones son más frecuentes que las transversiones (Martinez et al., 1997).

Nosotros encontramos que las sustituciones nucleotídicas fueron de tres tipo: 1) sustituciones de nucleótidos que no daban lugar a cambios de aa (sustituciones sinónimas), 2) sustituciones de nucleótidos que daban lugar a cambios de aa (sustituciones no sinónimas), 3) 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 más frecuentemente en la mayoría de las cepas estudiadas de otras partes del mundo (Cane and Pringle, 1991; Sullender et al., 1991; Garcia et al., 1994). En estos estudios se observó que el tercio C-terminal de la glicoproteína G es una de las regiones donde se acumulan los cambios aminoacídicos, y que la misma contiene múltiples epítomos variables reconocidos por AcMs. Esto sugiere que la selección de nuevas variantes por AcMs, pudiera ser uno de los factores que contribuyen a la generación de la diversidad del VSRH (Garcia-Barreno et al., 1990; Rueda et al., 1991; Melero et al., 1997).

Las sustituciones de nucleótidos que producen alteraciones en la posición del codón de terminación dan lugar a moléculas de diferente longitud. Han sido descrito diferentes longitudes para la glicoproteína G de ambos subgrupos (Garcia et al., 1994; Martinez et al., 1999). La glicoproteína G de los virus de Cuba pertenecientes al subgrupo B detectados durante el año 2000 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 han sido asociados con importantes variaciones antigénicas encontradas en mutantes de escape del VSRH, los cuales fueron seleccionados con AcMs que reconocen epítomos específicos de cepas (Melero et al., 1997).

El estudio de cepas del subgrupo B aisladas en diferentes partes del mundo desde 1960 hasta 1970 mostraron una glicoproteína G de 292 aa, los virus aislados entre 1980 y 1985 presentaron una glicoproteína de 299aa y los aislados en 1989 la glicoproteína G fue de 295 aa (Sullender et al., 1991). La longitud de la glicoproteína G de los aislamientos que circularon en Alabama entre 1993 y 1996 fue de 297 aa y 298 aa para el subgrupo A, y de 292 aa y 295 aa para el subgrupo B (Coggins et al., 1998).

En el análisis de cepas aisladas en una región de Japón durante un período de 20 años se observaron diferentes longitudes para la glicoproteína G del subgrupo B (292 aa, 295 aa y 299 aa). En este estudio se correlacionó el uso del codón de terminación con la fecha de aislamiento de las cepas, de este modo, se observó que virus aislados en la primera mitad de 1980 usaron el primer codón de parada, y las cepas correspondientes a la mitad de 1980 y comienzo de 1990 utilizaron el tercer codón. El segundo codón de parada fue usado en general, por cepas que circularon en la segunda mitad de 1980 y en el resto de las epidemias ocurridas durante 1990 (Kamasaki et al., 2001). La glicoproteína G de las cepas de los subgrupos A y B que circularon en Mozambique durante un año mostraron una longitud de 295 aa y 299 aa, respectivamente. En todos los casos el codón de parada fue UAG (Roca et al., 2001).

Venter y colaboradores durante el año 2001 estudiaron cepas de ambos subgrupos aisladas en Sudáfrica durante 4 años consecutivos (1997-2000). Entre las cepas aisladas del subgrupo A, ellos encontraron dos tamaños diferentes para la glicoproteína G (297 aa y 298 aa) con un mismo codón de parada UAG. En las cepas del subgrupo B se observaron dos codones de parada diferentes UAG o UAA y tres longitudes distintas para esta glicoproteína (292 aa, 295aa y 299 aa) (Venter et al., 2001).

Veintisiete cepas de VSRH pertenecientes al subgrupo A aisladas durante 9 epidemias consecutivas (1993-2001) en Montevideo, Uruguay y siete cepas aisladas en Buenos Aires, Argentina, durante el período 1996-1998 fueron estudiadas. El análisis de estas cepas también mostró 2 tamaños diferentes en la glicoproteína G (297 ó 298 aa). Estos autores además relacionaron el tamaño de la glicoproteína con la posición de las cepas en el árbol filogenético. Así por ejemplo, las cepas agrupadas dentro de los genotipos GA1 y GA2 presentaron una glicoproteína G de 297 aa, mientras que las que se

agruparon dentro de los genotipos GA3 y GA5 mostraron un tamaño de 298 aa (Frabasile et al., 2003). Las secuencias aminoacídicas de cepas de VSRH, aisladas durante 1999 en Brazil, pertenecientes al subgrupo B indicaron una glicoproteína G con 295 aa y las del subgrupo A mostraron dos tamaños distintos (297 y 298) para dicha glicoproteína (Moura et al., 2004).

IV.4 Relación filogenética entre los virus de Cuba. Comparación con cepas de otras regiones geográficas.

EL alineamiento de la secuencia de nucleótidos correspondiente al tercio C-terminal de la glicoproteína G de 44 virus cubanos analizados anteriormente se emplearon para determinar la distancia nucleotídica por el método Tamura-Nei gamma 0.5 y para construir un árbol filogenético por el método de neighbor-joining. En este análisis se incluyeron secuencias de virus que circularon en otras partes del mundo publicadas en el GenBank. Los subgrupos A y B fueron genotipados separadamente por comparación filogenética con secuencias que han sido previamente asignadas a un genotipo determinado (Peret et al., 1998; Peret et al., 2000; Venter et al., 2001; Madhi et al., 2003) y por comparación con secuencias de otras regiones geográficas (Garcia et al., 1994).

Los virus cubanos del subgrupo A se agruparon en 5 genotipos de acuerdo al porcentaje de similitud nucleotídica con los genotipos de referencias y fueron nombrados desde Cuba A1 hasta Cuba A5. Los resultados se muestran en la tabla 10. El genotipo Cuba A1 se agrupó con un 99% de similitud nucleotídica con el Genotipo Long, el genotipo Cuba A2 se agrupó con un 97% de similitud nucleotídica con el genotipo GA1, el genotipo Cuba A3 se agrupó con un 98% de similitud nucleotídica con el genotipo GA2 y los genotipos Cuba A4 y 5 se agruparon con un 96% de similitud nucleotídica con los genotipos GA3 y GA5, respectivamente.

Los genotipos cubanos pertenecientes a Cuba A3, 4 y 5 presentaron menor porcentaje de similitud nucleotídica cuando fueron comparados con los genotipos Cuba A1 y A2 (83%-66%). Esta baja similitud era de esperar pues los virus cubanos pertenecientes a estos dos genotipos se agruparon con cepas que circularon varios años atrás y con la cepa prototipo Long que circuló en el año 1956.

Tabla 10. Clasificación genotípica de los virus cubanos del subgrupo A de VSRH de acuerdo al porciento de similitud con los genotipos de referencia.

Genotipos Virus cubanos	Long	GA1	GA2	GA3	GA5
Cuba A1	99	88	83	82	81
Cuba A2	90	97	79	78	81
Cuba A3	83	77	98	95	88
Cuba A4	82	72	94	96	86
Cuba A5	81	66	88	90	96

Los virus cubanos del subgrupo A se agruparon filogenéticamente en tres ramas evolutivas principales con un valor de bootsrapt altamente significativo (87%-99%). Las cepas de las ramas superior e intermedia se agruparon con genotipos previamente identificados, el Genotipo Long o Cuba A1 y el GA1 o Cuba A2, respectivamente. La rama inferior se dividió a su vez en tres subramas, las cuáles también se relacionaron con genotipos previamente identificados, GA2, GA3 y GA5 (Cuba A3, Cuba A4 y Cuba A5). Esta clasificación se corresponde con la clasificación genotípica obtenida de acuerdo al porciento de similitud nucleotídica. Los resultados se muestran en la figura 10.

Dentro del Genotipo Long o Cuba A1 y muy cercanamente a la cepa prototipo Long se agruparon todas las cepas que circularon en la Ciudad de la Habana entre 1994 y 1996. Durante este período, como fue explicado anteriormente, todas las cepas aisladas presentaron la misma secuencia nucleotídica, solamente una cepa se diferenció del resto en un solo nucleótido. Por lo tanto, fueron incluidas en el análisis filogenético 7 cepas representativas de cada brote. Dentro de este mismo genotipo encontramos además dos virus (CHab181/98 y Tun57/00) que circularon en brotes y en zonas geográficas diferentes del país. Este genotipo no ha sido detectado desde la fecha de su aislamiento.

Resultados parecidos fueron previamente reportados en Dinamarca durante varias epidemias consecutivas (1993-1995), el genotipo predominante mostró un patrón de restricción idéntico a la cepa prototipo A2 aislada en 1961 (Johansen et al., 1997). Cepas con este mismo patrón de restricción fueron encontradas en estudios posteriores de diferentes regiones de este mismo país, en dos de estas regiones este genotipo continuó

siendo el dominante. Estos autores han planteado 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 (Christensen et al., 1999).

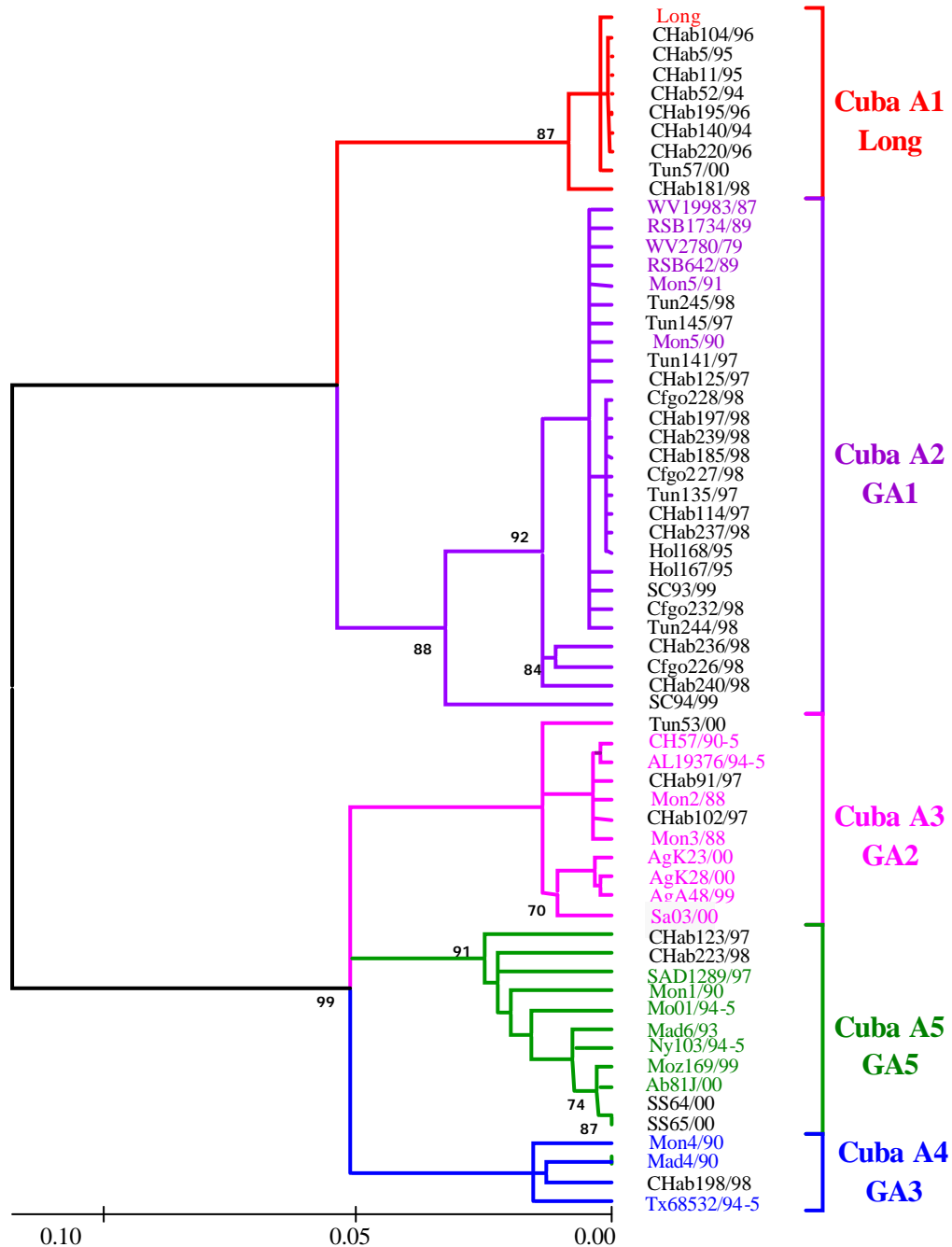


Figura 10. Árbol filogenético del VSRH del subgrupo A que circularon en algunas provincias de Cuba y en otras áreas geográficas. Los virus de Cuba son señalizados en color negro.

Dentro del genotipo GA1 o Cuba A2 se agruparon virus de casi todas las provincias estudiadas que circularon desde 1995 hasta 1999. Dentro de este grupo se observaron virus con secuencias idénticas o casi idénticas como fue ya descrito anteriormente. Los virus cubanos pertenecientes a esta rama se relacionaron filogenéticamente con cepas que circularon varios años atrás en Uruguay, Estados Unidos y Reino Unido (1979-1991). Resultados similares fueron encontrados previamente en otras localidades geográficas. Virus aislados en Gambia durante 1993 se agruparon filogenéticamente con una cepa aislada en Madrid durante 1984 (Cane et al., 1999), esta variante fue relativamente común en Europa durante la década de los 80 y no ha sido detectado desde entonces (Garcia et al., 1994; Cane and Pringle, 1995b).

En estudios realizados en Dinamarca durante varias epidemias consecutivas (1992-1998) se encontraron virus, cuyos patrones de restricción fueron similares a virus aislados en Estados Unidos entre 1982 y 1986 (Johansen et al., 1997; Christensen et al., 1999). Estos autores han sugerido que la fluctuación temporal de un genotipo predominante en un área geográficamente restringida, podría estar dado por un estado inmunológico condicionado en el hospedero que favorece a determinadas cepas dentro de la población circulante, más que por la evolución molecular inducida por la presión inmune selectiva. Ellos además plantean que determinados genotipos que no han sido reconocidos durante varios inviernos, podrían mantenerse endémicos en una población durante años manifestándose ocasionalmente. Recientemente se estudió la variabilidad genética de cepas de VSRH del subgrupo A aisladas en Buenos Aires, Argentina durante la temporada 1996-1998. Durante este período fue detectada la circulación del genotipo GA1 con muy baja frecuencia (Frabasile et al., 2003).

El resto de los virus cubanos se agruparon con los genotipos GA2, 3 y 5 (Cuba A3, 4, 5, respectivamente), dentro de cada genotipo se encontraban cepas que han circulado en diferentes partes del mundo en la misma temporada epidémica o en diferentes períodos.

El genotipo GA2 estaba compuesto por cepas que circularon en diferentes períodos en Sudáfrica, Montevideo y Norte América. Dentro del mismo se agruparon dos virus de Ciudad de la Habana que circularon durante 1997 y un virus de Las Tunas del año 2000. Los virus detectados durante 1997 se relacionaron con cepas de Norte América y

Montevideo que circularon en la primera década de los 90 y durante el año 1988, respectivamente. El virus CHab198/98 se agrupó dentro del genotipo GA3 con cepas de Montevideo, Madrid y Estados Unidos que circularon entre 1990 y 1995. Dentro del genotipo GA5, se agruparon dos virus de Ciudad de la Habana que circularon durante 1997-1998, y dos virus de Sancti Spíritus del año 2000. En esta rama se agruparon cepas que circularon durante un mismo tiempo en áreas geográficas distantes y cepas aisladas en períodos y áreas geográficas diferentes. Los virus de Sancti Spíritus estaban muy relacionados con cepas de Sudáfrica y de Mozambique que circularon durante el mismo período epidémico.

EL análisis por RFLP y secuenciación parcial de un segmento seleccionado de los genes SH, N y G revelaron que virus muy similares están presentes simultáneamente en países muy distantes (Cane and Pringle, 1992; Lukic-Grlic et al., 1998). 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 durante dos epidemias consecutivas (Melero et al., 1997). Por otro lado se han identificado también, virus con el mismo genotipo circulando en diferentes partes del mundo durante un misma temporada epidémica (Garcia et al., 1994; Sanz et al., 1994).

El análisis de secuencia de la región variable del gen G en cepas del subgrupo A, aisladas durante 38 años en diferentes partes del mundo mostró que las cepas se agrupaban más por su fecha de aislamiento que por su localización geográfica (Cane and Pringle, 1995a). El estudio por RFLP y secuenciación nucleotídica de un fragmento del gen G de cepas aisladas en Corea durante 9 epidemias consecutivas mostró múltiples genotipos. Dentro de cada genotipo estaban presentes cepas que circularon en Uruguay, Madrid, Estados Unido y Reino Unido durante el mismo período o durante tiem (Choi and Lee, 2000).

La variabilidad genética del VSRH fue estudiada en diferentes regiones de Sudáfrica durante varias estaciones consecutivas (1997-2001). En este estudio las cepas aisladas se agruparon en 4 genotipos, tres de ellos previamente identificados (GA2, GA5 y GA7), las cepas de estos genotipos se relacionaron con cepas que han circulado en Estados Unidos, Uruguay y Mozambique durante un mismo o en diferentes períodos. El 4

genotipo fue distinto de los genotipos previamente identificados y fue denominado SAA1 (Venter et al., 2001; Venter et al., 2002; Venter et al., 2003). Recientemente los genotipos GA2, GA3, GA5 y GA7 han sido detectado con mayor frecuencia en Argentina, Uruguay, Brasil, Kenya (Frabasile et al., 2003; Blanc et al., 2004; Moura et al., 2004; Scott et al., 2004).

Teniendo en cuenta todo lo planteado anteriormente, las cepas de VSRH pueden diseminarse mundialmente, pero después, los virus pueden evolucionar con patrones diferentes, lo cuál esta determinado por la cepa viral, el hospedero y las características del lugar.

De forma general podemos decir que en Las Tunas circularon los genotipos Long, GA1 y GA2. El genotipo GA1 circuló en casi todas las provincias estudiadas desde 1995 hasta 1999. En la Ciudad de la Habana circularon todos los genotipos detectados en los virus cubanos del subgrupo A, lo que sugiere que el VSRH pudiera ser introducido por la Ciudad de la Habana y diseminado al resto de las provincias.

Con el fin de conocer si los virus cubanos que se agruparon dentro del genotipo Long o Cuba A1 habían evolucionado en el tiempo, se alinearon las secuencias de estos virus por el programa Clustal X, en este alineamiento fueron incluidas las secuencias de las cepas prototipo de los subgrupos A y B (Long y CH18537, respectivamente) y la cepa Su8/60 (subgrupo B) publicadas en el Genbank. El alineamiento obtenido fue utilizado para construir un árbol filogenético por el método de neighbor-joining. Los resultados se muestran en la figura 11. Como se pudo observar, los dos virus detectados durante los años 1998 y 2000 habían evolucionado en el tiempo con respecto a las cepas que circularon entre 1994 y 1996.

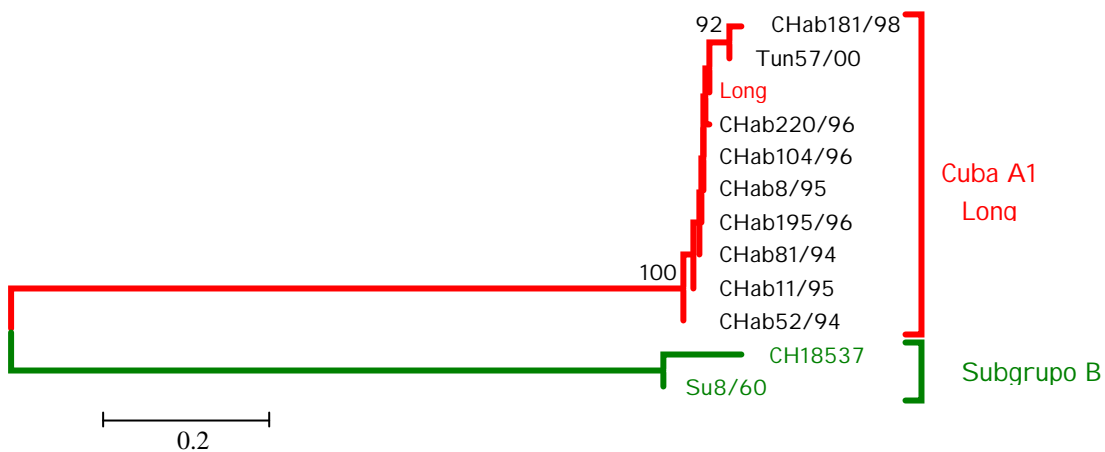


Figura 11. Árbol Filogenético del genotipo cubano del subgrupo A representado por Cuba A1 del VSRH.

Los virus cubanos del subgrupo B se agruparon en 2 genotipos de acuerdo al porcentaje de similitud nucleotídica con los genotipos de referencias y fueron nombrados Cuba B1 y Cuba B2. Los resultados se muestran en la tabla 11. El genotipo Cuba B1 se agrupó con un 99% de similitud nucleotídica con el genotipo SAB1 y el genotipo Cuba B2 se agrupó con el genotipo SAB3 con un 96% de similitud nucleotídica. A diferencia de lo ocurrido con los virus del subgrupo A, los de este subgrupo presentaban una similitud nucleotídica muy baja con la cepa prototipo CH18537 aislada en 1962.

Tabla 11. Clasificación genotípica de los virus cubanos del subgrupo B de VSRH de acuerdo al porcentaje de similitud con los genotipos de referencia.

Genotipos Virus cubanos	GB1	GB3	GB4	SAB1	SAB2	SAB3	CH18537
Cuba B1	88	91	86	99	88	87	68
Cuba B2	87	92	83	86	90	96	69

Los virus cubanos del subgrupo B se agruparon filogenéticamente en dos líneas evolutivas principales, lo cual se corresponde con la clasificación genotípica obtenida de acuerdo al porcentaje de similitud nucleotídica. Los resultados se muestran en la figura 12.

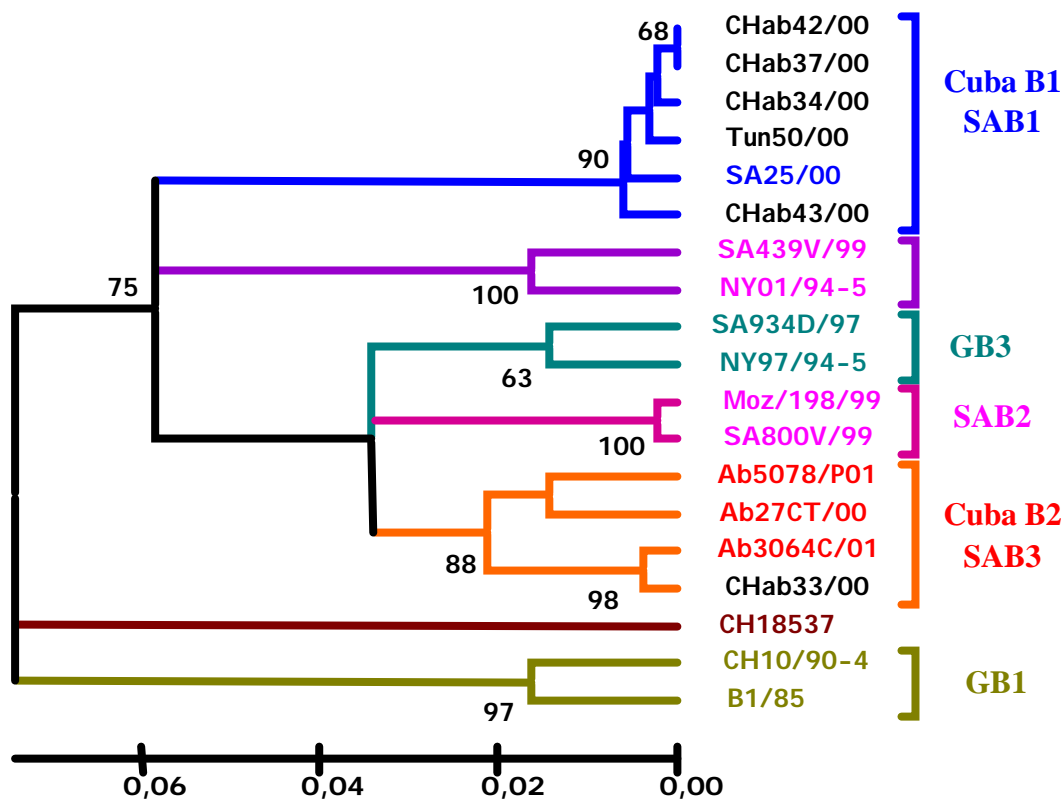


Figura 12. Árbol filogenético del VSRH del subgrupo B que circularon en algunas provincias de Cuba y en otras áreas geográficas. Los virus de Cuba son señalizados en color negro.

Los virus de ambas ramas se agruparon con genotipos previamente identificados en Sudáfrica (Venter et al., 2001). Dentro del genotipo SAB1 o Cuba B1 se agruparon casi todos los virus cubanos. Dentro de este subgrupo se observaron virus con secuencias idénticas o casi idénticas como ya fue discutido anteriormente. Este genotipo fue detectado con una frecuencia baja en Sudáfrica entre 1998 y 2000, y no pudo ser agrupado con ninguna de las cepas publicadas en el GenBank. Sin embargo, dentro del genotipo SAB3 o Cuba B2 se agrupó solamente una cepa cubana (CHab33/00), este genotipo fue dominante en Sudáfrica desde 1997 hasta el año 2000 (Venter et al., 2001). Los virus cubanos se agruparon filogenéticamente muy distantes de la cepa prototipo CH18537.

Sullender y colaboradores en 1991 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 (Sullender et al., 1991). Cepas pertenecientes al subgrupo B aisladas durante 3 períodos epidémicos (1993-1996) en Alabama fueron analizadas. Diferentes genotipos fueron observados dentro de este subgrupo, las cepas antiguas se agruparon muy distantes de las cepas más recientes (Coggins et al., 1998). En una comunidad de Estados Unidos fue examinado un grupo de cepas aisladas durante 5 períodos epidémicos, en la misma fueron identificados cuatro genotipos (GB1-GB4). Este estudio fue extendido a cinco comunidades de Estados Unidos durante un mismo período epidémico detectándose solamente la circulación de los genotipos GB3 y GB4 (Peret et al., 1998; Peret et al., 2000).

Venter y colaboradores en el 2001 identificaron durante tres epidemias consecutivas en Sudáfrica la circulación de múltiples genotipos dentro del subgrupo B. Se detectaron 5 genotipos, dos de ellos ya previamente identificados (GB3 y GB4), y tres de ellos nuevos (SAB1, SAB2 y SAB3) (Venter et al., 2001). En Uruguay durante los períodos 1989-1996 y 1999-2001 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 (Blanc et al., 2004).

V. Discusión General

La variabilidad del VSRH ha sido examinada a nivel antigénico utilizando un panel de AcMs y a nivel genético usando TR-RCP y RFLP, digestión con RNAsa A y secuenciación nucleotídica. La variabilidad de este virus, se debe al alto grado de diversidad antigénica y genética que presenta la glicoproteína G. Las reinfecciones con el VSRH se han relacionado con cambios en las propiedades antigénicas del mismo, particularmente en esta glicoproteína, sugiriendo que la selección inmune de nuevas variantes antigénicas puede ser uno de los factores que contribuye a la evolución del virus (Sullender, 2000; Cane, 2001). Existen otros factores que también parecen ser importantes en la evolución genética del VSRH. Entre ellos tenemos: la infectividad del virus, su rápida diseminación, la resistencia inmunológica en la comunidad y los cambios genéticos debido a las mutaciones espontáneas (Choi et al., 2001).

El análisis de la secuencia del gen G, ha mostrado que en cada epidemia circulan múltiples genotipos dentro de cada subgrupo, los cuales se diseminan rápidamente en el mundo, con un reemplazamiento del genotipo predominante cada año. La disminución o desaparición del genotipo predominante en epidemias posteriores puede ser causado por un incremento de la resistencia inmunológica en la comunidad a este genotipo (Peret et al., 1998; Cane, 2001; Choi et al., 2001).

Los conocimientos sobre la variabilidad antigénica y genética entre y dentro de ambos subgrupos del VSRH son importantes a tener en cuenta para el desarrollo de una posible vacuna y en programas futuros de inmunización. Hasta la fecha muchos han sido los trabajos realizados para conocer la distribución de los genotipos que circulan en las diferentes áreas geográficas, fundamentalmente en países desarrollados con clima templado. Pocos estudios se han llevado a cabo en países en vías de desarrollo y mucho menos en países con clima tropical (Cane, 2001).

La caracterización antigénica y genética de las cepas de VSRH circulantes en Cuba constituye una necesidad imperiosa para el desarrollo de un candidato vacunal que pueda ser utilizado en nuestras condiciones, ya que la eficacia del mismo depende en gran parte de los diferentes genotipos del virus que circulan en el país.

La caracterización antigénica de la glicoproteína G de cepas aisladas en la Ciudad de la Habana entre 1994 y 1998, mostró que todas pertenecieron al subgrupo antigénico A. Las cepas que circularon entre 1994 y 1996, presentaron características singulares ya que las mismas fueron reconocidas por AcMs específicos de la cepa prototipo Long aislada en 1956, ninguna cepa reaccionó con el AcM 63G. Todas las cepas aisladas durante ese período presentaron un alto grado de identidad nucleotídica entre ellas y con la cepa prototipo Long. La pérdida del reconocimiento del AcM 63G se debió a un cambio en la posición del aa 209 (K-E).

Las cepas pertenecientes al período 1997 y 1998 reaccionaron con AcMs preparados contra una cepa más reciente (Mon3/88). En estudios de caracterización de cepas aisladas en diferentes partes del mundo, se ha visto que los AcMs preparados contra la cepa Long reconocían solamente cepas muy antiguas y que las cepas más recientes reaccionaron con los AcMs específicos de Mon3/88 (Garcia et al., 1994; Cane and Pringle, 1995a).

Se encontró que existe relación entre la variabilidad genética de la glicoproteína G de las cepas que circularon en la Ciudad de La Habana desde 1994 hasta 1998 y los cambios antigénicos detectados con un panel de AcM anti-G. El árbol filogenético generado del análisis de la relación de las secuencias nucleotídicas y aminoacídicas mostró dos ramas principales. En la rama inferior y muy cercana a la cepa prototipo Long, se agruparon todas las cepas que circularon entre 1994 y 1996, todas estas cepas fueron reconocidas por los AcMs específicos de la cepa Long. En la rama superior se agruparon todas las cepas que circularon durante el período 1997-1998, las mismas estaban muy relacionadas con la cepa Mon3/88 y con otras cepas que circularon en Montevideo y Madrid, a finales de la década del 80 y principio del 90. Las cepas pertenecientes a esta rama reaccionaron con los AcMs específicos de Mon3/88. Estudios previos de caracterización antigénica y genética en cepas del subgrupo A aisladas en diferentes partes del mundo han mostrado que los cambios antigénicos detectados con un panel de AcM anti-G se relacionaron con las posiciones de los aislamientos en el árbol filogenético (Garcia et al., 1994; Cane and Pringle, 1995a).

El resto de los virus que circularon en las diferentes provincias estudiadas entre 1995 y 1999 pertenecieron también al subgrupo antigénico A. El análisis genético del gen de la glicoproteína G, mostró que la mayoría de estos virus presentaron secuencias nucleotídicas muy similares. Durante el año 2000 se detectó la circulación de virus de ambos subgrupos, y fue observada nuevamente la presencia de virus con secuencias casi idénticas dentro de cada subgrupo. Dentro de los virus que circularon durante 1998 y el 2000 se detectaron dos virus cuyas secuencias nucleotídicas fueron muy similares a la de la cepa Long. La circulación de cepas con secuencias casi idénticas han sido reportadas durante una epidemia en diferentes comunidades y durante varios períodos epidémicos en una misma comunidad de Estados Unidos (Peret et al., 1998; Peret et al., 2000).

Los cambios nucleotídicos encontrados en las secuencias de los virus que circularon en Cuba, en el período 1995-2000 para ambos subgrupos fueron sustituciones nucleotídicas, y dentro de estas las transiciones fueron más frecuentes que las transversiones. Resultados similares han sido encontrados en las cepas de VSRH aisladas en diferentes regiones del mundo (Martinez et al., 1997). Las sustituciones nucleotídicas fueron de tres tipo: sustituciones sinónimas, sustituciones no sinónimas y sustituciones de nucleótidos que introducen cambios en la posición del codón de terminación.

Las sustituciones de nucleótidos que producen alteraciones en la posición del codón de terminación dan lugar a moléculas de diferente longitud. Los virus de Cuba pertenecientes al subgrupo B mostraron una glicoproteína G de 295 aa con dos codones de parada diferentes (UAG o UAA). Sin embargo, dentro de los virus del subgrupo A se observaron dos tamaños de proteína (297 aa y 298 aa) con un solo codón de parada (UAG). Han sido descritas diferentes longitudes para la glicoproteína G de ambos subgrupos (Garcia et al., 1994; Martinez et al., 1999).

Los virus cubanos que presentaron la misma secuencia nucleotídica que la cepa prototipo Long, se agruparon filogenéticamente dentro del genotipo Long con un 99% de similitud nucleotídica. La cepa Long fue aislada en el año 1956 y desde su fecha de aislamiento no ha sido detectada nuevamente. No obstante, en Dinamarca durante varias temporadas epidémicas (1993-1998) se detectó la circulación de cepas cuyos patrones de

restricción fueron idénticos al de la cepa A2 aislada en 1961 (Johansen et al., 1997; Christensen et al., 1999).

La mayoría de los virus que circularon entre 1995 y 1999 en las diferentes provincias estudiadas se agruparon filogenéticamente con cepas pertenecientes al genotipo GA1 con un 97% de similitud nucleotídica. Los virus cubanos pertenecientes a este genotipo, se agruparon con cepas que circularon varios años atrás (década del 80 y principio del 90) en otras áreas geográficas. Este genotipo fue común en la década del 80 y no ha sido detectado nuevamente. En Dinamarca (1993-1998) y en Gambia (1993) se detectaron cepas cuyos genotipos fueron similares al de las cepas aisladas en Estados Unidos y Madrid a principio de la década del 80, respectivamente (Johansen et al., 1997; Cane et al., 1999; Christensen et al., 1999).

Un número pequeño de virus que circularon durante 1997-1998 y durante el año 2000 se agruparon filogenéticamente dentro de los genotipos GA2, GA3 y GA5 con cepas que circularon más recientemente en otras partes del mundo, durante el mismo período o en períodos diferentes. Los genotipos del VSRH tienen una distribución mundial y se ha visto que un mismo genotipo puede circular en diferentes partes del mundo al mismo tiempo, o que virus aislados en lugares distantes y en tiempos diferentes pueden estar más relacionados que dos virus aislados en un mismo lugar al mismo tiempo (Melero et al., 1997).

A diferencia de lo ocurrido con el subgrupo A, los virus del subgrupo B se encontraban muy alejados de las cepas antiguas. Los virus de este período se agruparon filogenéticamente en dos genotipos (SAB1 y SAB3), 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 este continente a finales de la década de los 90.

El patrón epidemiológico descrito para el VSRH en Cuba, ha sido discutido previamente en otros trabajos del laboratorio, en los mismos se ha observado, que la circulación de este virus ocurre desde el mes de septiembre hasta febrero. En este sentido podemos decir, que Cuba, tiene condiciones geográficas únicas, las cuales pudieran estar influyendo en la diseminación y evolución del VSRH.

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

- Ahmadian, G., Randhawa, J.S. and Easton, A.J. (2000) Expression of the ORF-2 protein of the human respiratory syncytial virus M2 gene is initiated by a ribosomal termination-dependent reinitiation mechanism. *Embo J* 19, 2681-9.
- Akerlind-Stopner, B., Utter, G., Mufson, M.A., Orvell, C., Lerner, R.A. and Norrby, E. (1990) A subgroup-specific antigenic site in the G protein of respiratory syncytial virus forms a disulfide-bonded loop. *J Virol* 64, 5143-8.
- Alwan, W.H., Kozłowska, W.J. and Openshaw, P.J. (1994) Distinct types of lung disease caused by functional subsets of antiviral T cells. *J Exp Med* 179, 81-9.
- Alwan, W.H. and Openshaw, P.J. (1993) Distinct patterns of T- and B-cell immunity to respiratory syncytial virus induced by individual viral proteins. *Vaccine* 11, 431-7.
- Alwan, W.H., Record, F.M. and Openshaw, P.J. (1993) Phenotypic and functional characterization of T cell lines specific for individual respiratory syncytial virus proteins. *J Immunol* 150, 5211-8.
- American Academy of Pediatrics Committee on Infectious Diseases. (1996) Reassessment of the indications for ribavirin therapy in respiratory syncytial virus infections. *Pediatrics* 97: 137-40.
- Anderson, L.J., Hendry, R.M., Pierik, L.T., Tsou, C. and McIntosh, K. (1991) Multicenter study of strains of respiratory syncytial virus. *J Infect Dis* 163, 687-92.
- Anderson, L.J., Hierholzer, J.C., Tsou, C., Hendry, R.M., Fernie, B.F., Stone, Y. and McIntosh, K. (1985a) Antigenic characterization of respiratory syncytial virus strains with monoclonal antibodies. *J Infect Dis* 151, 626-33.
- Anderson, L.J., Hierholzer, J.C., Tsou, C., Hendry, R.M., Fernie, B.F., Stone, Y. and McIntosh, K. (1985b) Antigenic characterization of respiratory syncytial virus strains with monoclonal antibodies. *J Infect Dis* 151, 626-33.
- Anderson, L.J., Tsou, C., Potter, C., Keyserling, H.L., Smith, T.F., Ananaba, G. and Bangham, C.R. (1994) Cytokine response to respiratory syncytial virus stimulation of human peripheral blood mononuclear cells. *J Infect Dis* 170, 1201-8.
- Bastien, N., Taylor, G., Thomas, L.H., Wyld, S.G., Simard, C. and Trudel, M. (1997) Immunization with a peptide derived from the G glycoprotein of bovine respiratory syncytial virus (BRSV) reduces the incidence of BRSV-associated pneumonia in the natural host. *Vaccine* 15, 1385-90.
- Bello, M., Goyenechea, A., Perez, M. and Diaz, O. (1990) Diagnóstico rápido por inmunofluorescencia en niños hospitalizados por IRA. *Rev Cubana Pediatría*. 62 (5).

- Bello, M., Goyenechea, A., Perez, M. and Ruiz, N. (1983) Resultados obtenidos en monosueros de una población infantil frente a VSR y Adenovirus. *Bol Epid INHEM.* 5, 23-24.
- Bembridge, G.P., Rodriguez, N., Garcia-Beato, R., Nicolson, C., Melero, J.A. and Taylor, G. (2000a) DNA encoding the attachment (G) or fusion (F) protein of respiratory syncytial virus induces protection in the absence of pulmonary inflammation. *J Gen Virol* 81, 2519-23.
- Bembridge, G.P., Rodriguez, N., Garcia-Beato, R., Nicolson, C., Melero, J.A. and Taylor, G. (2000b) Respiratory syncytial virus infection of gene gun vaccinated mice induces Th2-driven pulmonary eosinophilia even in the absence of sensitisation to the fusion (F) or attachment (G) protein. *Vaccine* 19, 1038-46.
- Bermingham, A. and Collins, P.L. (1999) The M2-2 protein of human respiratory syncytial virus is a regulatory factor involved in the balance between RNA replication and transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 11259-64.
- Bitko, V., Velazquez, A., Yang, L., Yang, Y.C. and Barik, S. (1997) Transcriptional induction of multiple cytokines by human respiratory syncytial virus requires activation of NF-kappa B and is inhibited by sodium salicylate and aspirin. *Virology* 232, 369-78.
- Black, C.P. (2003) Systematic review of the biology and medical management of respiratory syncytial virus infection. *Respir Care* 48, 209-33.
- Blanc, A., Delfraro, A., Frabasile, S. and Arbiza, J. (2004) Genotypes of respiratory syncytial virus group B identified in Uruguay. *Arch Virol en prensa.*
- Brandenburg, A.H., Neijens, H.J. and Osterhaus, A.D. (2001) Pathogenesis of RSV lower respiratory tract infection: implications for vaccine development. *Vaccine* 19, 2769-82.
- Bresee, J.S., Fischer, M., Dowell, S.F., Johnston, B.D., Biggs, V.M., Levine, R.S., Lingappa, J.R., Keyserling, H.L., Petersen, K.M., Bak, J.R., Cary, H.E., Jr., Sowell, A.L., Rubens, C.E. and Anderson, L.J. (1996) Vitamin A therapy for children with respiratory syncytial virus infection: a multicenter trial in the United States. *Pediatr Infect Dis J* 15, 777-82.
- Bukreyev, A., Whitehead, S.S., Murphy, B.R. and Collins, P.L. (1997) Recombinant respiratory syncytial virus from which the entire SH gene has been deleted grows efficiently in cell culture and exhibits site-specific attenuation in the respiratory tract of the mouse. *J Virol* 71, 8973-82.
- Burke, E., Dupuy, L., Wall, C. and Barik, S. (1998) Role of cellular actin in the gene expression and morphogenesis of human respiratory syncytial virus. *Virology* 252, 137-48.

- Burke, E., Mahoney, N.M., Almo, S.C. and Barik, S. (2000) Profilin is required for optimal actin-dependent transcription of respiratory syncytial virus genome RNA. *J Virol* 74, 669-75.
- Cameron, C.E., Grinde, B., Jentoft, J., Leis, J., Weber, I.T., Copeland, T.D. and Wlodawer, A. (1992) Mechanism of inhibition of the retroviral protease by a Rous sarcoma virus peptide substrate representing the cleavage site between the gag p2 and p10 proteins. *J Biol Chem* 267, 23735-41.
- Cancio, R., Savón, C., Oropeza, S., Abreu, I., Pérez, T., Hernández, B., González, G., Valdés, O. and Goyenechea, A. (2000) Diagnóstico rápido de los principales virus respiratorios en Ciudad de la Habana, 1995-1997. *Rev Argentina de Microbiología* 24., 21-26.
- Cane, P.A. (2001) Molecular epidemiology of respiratory syncytial virus. *Rev Med Virol* 11, 103-16.
- Cane, P.A., Matthews, D.A. and Pringle, C.R. (1991) Identification of variable domains of the attachment (G) protein of subgroup A respiratory syncytial viruses. *J Gen Virol* 72 (Pt 9), 2091-6.
- Cane, P.A., Matthews, D.A. and Pringle, C.R. (1992) Analysis of relatedness of subgroup A respiratory syncytial viruses isolated worldwide. *Virus Res* 25, 15-22.
- Cane, P.A., Matthews, D.A. and Pringle, C.R. (1994) Analysis of respiratory syncytial virus strain variation in successive epidemics in one city. *J Clin Microbiol* 32, 1-4.
- Cane, P.A. and Pringle, C.R. (1991) Respiratory syncytial virus heterogeneity during an epidemic: analysis by limited nucleotide sequencing (SH gene) and restriction mapping (N gene). *J Gen Virol* 72 (Pt 2), 349-57.
- Cane, P.A. and Pringle, C.R. (1992) Molecular epidemiology of respiratory syncytial virus: rapid identification of subgroup A lineages. *J Virol Methods* 40, 297-306.
- Cane, P.A. and Pringle, C.R. (1995a) Evolution of subgroup A respiratory syncytial virus: evidence for progressive accumulation of amino acid changes in the attachment protein. *J Virol* 69, 2918-25.
- Cane, P.A. and Pringle, C.R. (1995b) Molecular epidemiology of respiratory syncytial virus: a review of the use of reverse transcription-polymerase chain reaction in the analysis of genetic variability. *Electrophoresis* 16, 329-33.
- Cane, P.A., Weber, M., Sanneh, M., Dackour, R., Pringle, C.R. and Whittle, H. (1999) Molecular epidemiology of respiratory syncytial virus in The Gambia. *Epidemiol Infect* 122, 155-60.
- Carballal, G., Videla, C., Sequeira, M.D., Mistchenko, A., Requeijo, P.V. and Arbiza, J. (2000) Respiratory syncytial virus: changes in prevalence of subgroups A and B among Argentinian children, 1990-1996. *J Med Virol* 61, 275-9.

- Chacon, D., Valdivia, A., Goyenechea, A., Oropesa, I. and Savon, C. (1996) [Subgroups classification of strains of the respiratory syncytial virus isolated in an outbreak in Ciudad de La Havana]. *Rev Cubana Med Trop* 48, 136-7.
- Chandwani, S., Borkowsky, W., Krasinski, K., Lawrence, R. and Welliver, R. (1990) Respiratory syncytial virus infection in human immunodeficiency virus-infected children. *J Pediatr* 117, 251-4.
- Chanock, R.M., Roizman, B. and Myers, R. (1957) Recovery from infants with respiratory illness of a virus related to chimpanzee coryza agent (CCA). I. Isolation properties and characterization. *Am J Hyg* 66, 281-290.
- Chiba, Y., Higashidate, Y., Suga, K., Honjo, K., Tsutsumi, H. and Ogra, P.L. (1989) Development of cell-mediated cytotoxic immunity to respiratory syncytial virus in human infants following naturally acquired infection. *J Med Virol* 28, 133-9.
- Choi, E.H. and Lee, H.J. (2000) Genetic diversity and molecular epidemiology of the G protein of subgroups A and B of respiratory syncytial viruses isolated over 9 consecutive epidemics in Korea. *J Infect Dis* 181, 1547-56.
- Choi, J.K., Hoang, N., Vilardi, A.M., Conrad, P., Emerson, S.G. and Gewirtz, A.M. (2001) Hybrid HIV/MSCV LTR enhances transgene expression of lentiviral vectors in human CD34(+) hematopoietic cells. *Stem Cells* 19, 236-46.
- Chonmaitree, T. and Henrickson, K.J. (2000) Detection of respiratory viruses in the middle ear fluids of children with acute otitis media by multiplex reverse transcription:polymerase chain reaction assay. *Pediatr Infect Dis J* 19, 258-60.
- Christensen, L.S., Larsen, L.B., Johansen, J., Andersen, E.A., Wejse, C., Klug, B. and Hornsleth, A. (1999) The fluctuating pattern of various genome types of respiratory syncytial virus in Copenhagen and some other locations in Denmark. *Apmis* 107, 843-50.
- Coggins, W.B., Lefkowitz, E.J. and Sullender, W.M. (1998) Genetic variability among group A and group B respiratory syncytial viruses in a children's hospital. *J Clin Microbiol* 36, 3552-7.
- Coiras, M.T., Perez-Brena, P., Garcia, M.L. and Casas, I. (2003) Simultaneous detection of influenza A, B, and C viruses, respiratory syncytial virus, and adenoviruses in clinical samples by multiplex reverse transcription nested-PCR assay. *J Med Virol* 69, 132-44.
- Collins, C.L. and Pollard, A.J. (2002) Respiratory syncytial virus infections in children and adults. *J Infect* 45, 10-7.
- Collins, P.L., Camargo, E. and Hill, M.G. (1999) Support plasmids and support proteins required for recovery of recombinant respiratory syncytial virus. *Virology* 259, 251-5.

- Collins, P.L., Chanock, R.M. and Murphy, B.R. (2001) Section 2 Chapter 45: Respiratory Syncytial Virus. In: B. N. Fields, D. M. Knipe and P. M. Howley. (Eds), *Fields Virology*. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia. Pa.
- Collins, P.L., Hill, M.G., Cristina, J. and Grosfeld, H. (1996) Transcription elongation factor of respiratory syncytial virus, a nonsegmented negative-strand RNA virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 81-5.
- Collins, P.L. and Mottet, G. (1991) Post-translational processing and oligomerization of the fusion glycoprotein of human respiratory syncytial virus. *J Gen Virol* 72 (Pt 12), 3095-101.
- Collins, P.L., Olmsted, R.A. and Johnson, P.R. (1990) The small hydrophobic protein of human respiratory syncytial virus: comparison between antigenic subgroups A and B. *J Gen Virol* 71 (Pt 7), 1571-6.
- Connors, M., Collins, P.L., Firestone, C.Y. and Murphy, B.R. (1991) Respiratory syncytial virus (RSV) F, G, M2 (22K), and N proteins each induce resistance to RSV challenge, but resistance induced by M2 and N proteins is relatively short-lived. *J Virol* 65, 1634-7.
- Connors, M., Giese, N.A., Kulkarni, A.B., Firestone, C.Y., Morse, H.C., 3rd and Murphy, B.R. (1994) Enhanced pulmonary histopathology induced by respiratory syncytial virus (RSV) challenge of formalin-inactivated RSV-immunized BALB/c mice is abrogated by depletion of interleukin-4 (IL-4) and IL-10. *J Virol* 68, 5321-5.
- Connors, M., Kulkarni, A.B., Firestone, C.Y., Holmes, K.L., Morse, H.C., 3rd, Sotnikov, A.V. and Murphy, B.R. (1992) Pulmonary histopathology induced by respiratory syncytial virus (RSV) challenge of formalin-inactivated RSV-immunized BALB/c mice is abrogated by depletion of CD4⁺ T cells. *J Virol* 66, 7444-51.
- Cox, M.J., Azevedo, R.S., Cane, P.A., Massad, E. and Medley, G.F. (1998) Seroepidemiological study of respiratory syncytial virus in Sao Paulo state, Brazil. *J Med Virol* 55, 234-9.
- Cristina, J., Lopez, J.A., Albo, C., Garcia-Barreno, B., Garcia, J., Melero, J.A. and Portela, A. (1990) Analysis of genetic variability in human respiratory syncytial virus by the RNase A mismatch cleavage method: subtype divergence and heterogeneity. *Virology* 174, 126-34.
- Cristina, J., Moya, A., Arbiza, J., Russi, J., Hortal, M., Albo, C., Garcia-Barreno, B., Garcia, O., Melero, J.A. and Portela, A. (1991) Evolution of the G and P genes of human respiratory syncytial virus (subgroup A) studied by the RNase A mismatch cleavage method. *Virology* 184, 210-8.
- Crowe, J.E., Jr. (1999) Host responses to respiratory virus infection and immunization. *Curr Top Microbiol Immunol* 236, 191-214.
- Crowe, J.E., Jr. (2001) Influence of maternal antibodies on neonatal immunization against respiratory viruses. *Clin Infect Dis* 33, 1720-7.

- Cubie, H.A., Duncan, L.A., Marshall, L.A. and Smith, N.M. (1997) Detection of respiratory syncytial virus nucleic acid in archival postmortem tissue from infants. *Pediatr Pathol Lab Med* 17, 927-38.
- DeFilippis, V.R. and Villarreal, L.P. (2001) Section 1 Chapter 13: Virus Evolution. In: B. N. Fields, D. M.Knipe and P. M.Howley. (Eds), *Fields Virology*. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia. Pa.
- Dickens, L.E., Collins, P.L. and Wertz, G.W. (1984) Transcriptional mapping of human respiratory syncytial virus. *J Virol* 52, 364-9.
- Djelantik, I.G., Gessner, B.D., Soewignjo, S., Steinhoff, M., Sutanto, A., Widjaya, A., Linehan, M., Moniaga, V. and Ingerani. (2003) Incidence and clinical features of hospitalization because of respiratory syncytial virus lower respiratory illness among children less than two years of age in a rural Asian setting. *Pediatr Infect Dis J* 22, 150-7.
- Dowell, S.F., Anderson, L.J., Gary, H.E., Jr., Erdman, D.D., Plouffe, J.F., File, T.M., Jr., Marston, B.J. and Breiman, R.F. (1996) Respiratory syncytial virus is an important cause of community-acquired lower respiratory infection among hospitalized adults. *J Infect Dis* 174, 456-62.
- Dudas, R.A. and Karron, R.A. (1998) Respiratory syncytial virus vaccines. *Clin Microbiol Rev* 11, 430-9.
- Englund, J.A., Anderson, L.J. and Rhame, F.S. (1991) Nosocomial transmission of respiratory syncytial virus in immunocompromised adults. *J Clin Microbiol* 29, 115-9.
- Evans, J.E., Cane, P.A. and Pringle, C.R. (1996) Expression and characterisation of the NS1 and NS2 proteins of respiratory syncytial virus. *Virus Res* 43, 155-61.
- Falsey, A.R. and Walsh, E.E. (2000) Respiratory syncytial virus infection in adults. *Clin Microbiol Rev* 13, 371-84.
- Fearn, R. and Collins, P.L. (1999a) Model for polymerase access to the overlapped L gene of respiratory syncytial virus. *J Virol* 73, 388-97.
- Fearn, R. and Collins, P.L. (1999b) Role of the M2-1 transcription antitermination protein of respiratory syncytial virus in sequential transcription. *J Virol* 73, 5852-64.
- Frabasile, S., Delfraro, A., Facal, L., Videla, C., Galiano, M., de Sierra, M.J., Ruchansky, D., Vitreira, N., Berois, M., Carballal, G., Russi, J. and Arbiza, J. (2003) Antigenic and genetic variability of human respiratory syncytial viruses (group A) isolated in Uruguay and Argentina: 1993-2001. *J Med Virol* 71, 305-12.
- Garcia, J., Garcia-Barreno, B., Vivo, A. and Melero, J.A. (1993) Cytoplasmic inclusions of respiratory syncytial virus-infected cells: formation of inclusion bodies in transfected cells that coexpress the nucleoprotein, the phosphoprotein, and the 22K protein. *Virology* 195, 243-7.

- Garcia, O., Martin, M., Dopazo, J., Arbiza, J., Frabasile, S., Russi, J., Hortal, M., Perez-Brena, P., Martinez, I., Garcia-Barreno, B. and et al. (1994) Evolutionary pattern of human respiratory syncytial virus (subgroup A): cocirculating lineages and correlation of genetic and antigenic changes in the G glycoprotein. *J Virol* 68, 5448-59.
- Garcia-Barreno, B., Delgado, T., Akerlind-Stopner, B., Norrby, E. and Melero, J.A. (1992) Location of the epitope recognized by monoclonal antibody 63G on the primary structure of human respiratory syncytial virus G glycoprotein and the ability of synthetic peptides containing this epitope to induce neutralizing antibodies. *J Gen Virol* 73 (Pt 10), 2625-30.
- Garcia-Barreno, B., Delgado, T. and Melero, J.A. (1994) Oligo(A) sequences of human respiratory syncytial virus G protein gene: assessment of their genetic stability in frameshift mutants. *J Virol* 68, 5460-8.
- Garcia-Barreno, B., Delgado, T. and Melero, J.A. (1996) Identification of protein regions involved in the interaction of human respiratory syncytial virus phosphoprotein and nucleoprotein: significance for nucleocapsid assembly and formation of cytoplasmic inclusions. *J Virol* 70, 801-8.
- Garcia-Barreno, B., Palomo, C., Penas, C., Delgado, T., Perez-Brena, P. and Melero, J.A. (1989) Marked differences in the antigenic structure of human respiratory syncytial virus F and G glycoproteins. *J Virol* 63, 925-32.
- Garcia-Barreno, B., Portela, A., Delgado, T., Lopez, J.A. and Melero, J.A. (1990) Frame shift mutations as a novel mechanism for the generation of neutralization resistant mutants of human respiratory syncytial virus. *Embo J* 9, 4181-7.
- Garofalo, R., Mei, F., Espejo, R., Ye, G., Haeberle, H., Baron, S., Ogra, P.L. and Reyes, V.E. (1996) Respiratory syncytial virus infection of human respiratory epithelial cells up-regulates class I MHC expression through the induction of IFN-beta and IL-1 alpha. *J Immunol* 157, 2506-13.
- Ghosh, S., Champlin, R.E., Englund, J., Giralto, S.A., Rolston, K., Raad, I., Jacobson, K., Neumann, J., Ippoliti, C., Mallik, S. and Whimbey, E. (2000) Respiratory syncytial virus upper respiratory tract illnesses in adult blood and marrow transplant recipients: combination therapy with aerosolized ribavirin and intravenous immunoglobulin. *Bone Marrow Transplant* 25, 751-5.
- Gonzalez, I.M., Karron, R.A., Eichelberger, M., Walsh, E.E., Delagarza, V.W., Bennett, R., Chanock, R.M., Murphy, B.R., Clements-Mann, M.L. and Falsey, A.R. (2000) Evaluation of the live attenuated cpts 248/404 RSV vaccine in combination with a subunit RSV vaccine (PFP-2) in healthy young and older adults. *Vaccine* 18, 1763-72.
- Gorman, J.J., Ferguson, B.L., Speelman, D. and Mills, J. (1997) Determination of the disulfide bond arrangement of human respiratory syncytial virus attachment (G) protein by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Protein Sci* 6, 1308-15.

- Goyenechea, A., Bello, M., Clua, A., Savon, C., Valdivia, A., Oropesa, S., Diaz, O. and Hernandez, B. (1994) [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* 46, 79-85.
- Goyenechea, A., Razon, R., Savon, C., Valdivia, A., Chacon, D. and Sarmiento, L. (1996) Rapid detection of respiratory syncytial virus by indirect immunofluorescence in infants hospitalized with acute respiratory disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 91, 489-90.
- Graham, B.S., Bunton, L.A., Wright, P.F. and Karzon, D.T. (1991) Role of T lymphocyte subsets in the pathogenesis of primary infection and rechallenge with respiratory syncytial virus in mice. *J Clin Invest* 88, 1026-33.
- Graham, B.S., Henderson, G.S., Tang, Y.W., Lu, X., Neuzil, K.M. and Colley, D.G. (1993) Priming immunization determines T helper cytokine mRNA expression patterns in lungs of mice challenged with respiratory syncytial virus. *J Immunol* 151, 2032-40.
- Greenberg, S.B. (2002) Respiratory viral infections in adults. *Curr Opin Pulm Med* 8, 201-8.
- Greenough, A. (2002) Respiratory syncytial virus infection: clinical features, management, and prophylaxis. *Curr Opin Pulm Med* 8, 214-7.
- Hall, C.B., Walsh, E.E., Long, C.E. and Schnabel, K.C. (1991) Immunity to and frequency of reinfection with respiratory syncytial virus. *J Infect Dis* 163, 693-8.
- Hall, C.B., Walsh, E.E., Schnabel, K.C., Long, C.E., McConnochie, K.M., Hildreth, S.W. and Anderson, L.J. (1990) Occurrence of groups A and B of respiratory syncytial virus over 15 years: associated epidemiologic and clinical characteristics in hospitalized and ambulatory children. *J Infect Dis* 162, 1283-90.
- Hancock, G.E., Speelman, D.J., Heers, K., Bortell, E., Smith, J. and Cosco, C. (1996) Generation of atypical pulmonary inflammatory responses in BALB/c mice after immunization with the native attachment (G) glycoprotein of respiratory syncytial virus. *J Virol* 70, 7783-91.
- Hardy, R.W., Harmon, S.B. and Wertz, G.W. (1999) Diverse gene junctions of respiratory syncytial virus modulate the efficiency of transcription termination and respond differently to M2-mediated antitermination. *J Virol* 73, 170-6.
- Hardy, R.W. and Wertz, G.W. (1998) The product of the respiratory syncytial virus M2 gene ORF1 enhances readthrough of intergenic junctions during viral transcription. *J Virol* 72, 520-6.
- Heikkinen, T., Thint, M. and Chonmaitree, T. (1999) Prevalence of various respiratory viruses in the middle ear during acute otitis media. *N Engl J Med* 340, 260-4.

- Heminway, B.R., Yu, Y., Tanaka, Y., Perrine, K.G., Gustafson, E., Bernstein, J.M. and Galinski, M.S. (1994) Analysis of respiratory syncytial virus F, G, and SH proteins in cell fusion. *Virology* 200, 801-5.
- Hendricks, D.A., McIntosh, K. and Patterson, J.L. (1988) Further characterization of the soluble form of the G glycoprotein of respiratory syncytial virus. *J Virol* 62, 2228-33.
- Hendry, R.M., Pierik, L.T. and McIntosh, K. (1989) Prevalence of respiratory syncytial virus subgroups over six consecutive outbreaks: 1981-1987. *J Infect Dis* 160, 185-90.
- Higgins, P.G., Barrow, G.I., Tyrrell, D.A., Isaacs, D. and Gauci, C.L. (1990) The efficacy of intranasal interferon alpha-2a in respiratory syncytial virus infection in volunteers. *Antiviral Res* 14, 3-10.
- Holberg, C.J., Wright, A.L., Martinez, F.D., Ray, C.G., Taussig, L.M. and Lebowitz, M.D. (1991) Risk factors for respiratory syncytial virus-associated lower respiratory illnesses in the first year of life. *Am J Epidemiol* 133, 1135-51.
- Hussell, T., Georgiou, A., Sparer, T.E., Matthews, S., Pala, P. and Openshaw, P.J. (1998) Host genetic determinants of vaccine-induced eosinophilia during respiratory syncytial virus infection. *J Immunol* 161, 6215-22.
- Hussell, T., Spender, L.C., Georgiou, A., O'Garra, A. and Openshaw, P.J. (1996) Th1 and Th2 cytokine induction in pulmonary T cells during infection with respiratory syncytial virus. *J Gen Virol* 77 (Pt 10), 2447-55.
- Ishibashi, T., Monobe, H., Nomura, Y., Shinogami, M. and Yano, J. (2003) Multiplex nested reverse transcription-polymerase chain reaction for respiratory viruses in acute otitis media. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 112, 252-7.
- Jaovisidha, P., Peeples, M.E., Brees, A.A., Carpenter, L.R. and Moy, J.N. (1999) Respiratory syncytial virus stimulates neutrophil degranulation and chemokine release. *J Immunol* 163, 2816-20.
- Jin, H., Zhou, H., Cheng, X., Tang, R., Munoz, M. and Nguyen, N. (2000) Recombinant respiratory syncytial viruses with deletions in the NS1, NS2, SH, and M2-2 genes are attenuated in vitro and in vivo. *Virology* 273, 210-8.
- Johansen, J., Christensen, L.S., Hornsleth, A., Klug, B., Hansen, K.S. and Nir, M. (1997) Restriction pattern variability of respiratory syncytial virus during three consecutive epidemics in Denmark. *Apmis* 105, 303-8.
- Johnson, P.R. and Collins, P.L. (1988) The fusion glycoproteins of human respiratory syncytial virus of subgroups A and B: sequence conservation provides a structural basis for antigenic relatedness. *J Gen Virol* 69 (Pt 10), 2623-8.
- Johnson, P.R. and Collins, P.L. (1989) The 1B (NS2), 1C (NS1) and N proteins of human respiratory syncytial virus (RSV) of antigenic subgroups A and B: sequence

conservation and divergence within RSV genomic RNA. *J Gen Virol* 70 (Pt 6), 1539-47.

- Johnson, P.R., Spriggs, M.K., Olmsted, R.A. and Collins, P.L. (1987) 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* 84, 5625-9.
- Johnson, T.R., Johnson, J.E., Roberts, S.R., Wertz, G.W., Parker, R.A. and Graham, B.S. (1998) Priming with secreted glycoprotein G of respiratory syncytial virus (RSV) augments interleukin-5 production and tissue eosinophilia after RSV challenge. *J Virol* 72, 2871-80.
- Kahn, J.S., Schnell, M.J., Buonocore, L. and Rose, J.K. (1999) Recombinant vesicular stomatitis virus expressing respiratory syncytial virus (RSV) glycoproteins: RSV fusion protein can mediate infection and cell fusion. *Virology* 254, 81-91.
- Kamasaki, H., Tsutsumi, H., Seki, K. and Chiba, S. (2001) Genetic variability of respiratory syncytial virus subgroup B strain isolated during the last 20 years from the same region in Japan: existence of time-dependent linear genetic drifts. *Arch Virol* 146, 457-66.
- Kang, J.O. and Kim, C.R. (1997) Nosocomial respiratory syncytial virus infection in a newborn nursery. *J Korean Med Sci* 12, 489-91.
- Kumar, S., Tamura, K., Jakobsen, I. and Nei, M. (2001) MEGA: molecular evolutionary genetics analyses software., Vol. 109., University Park: Pennsylvania State University.
- Kuo, L., Fearn, R. and Collins, P.L. (1997) Analysis of the gene start and gene end signals of human respiratory syncytial virus: quasi-templated initiation at position 1 of the encoded mRNA. *J Virol* 71, 4944-53.
- Kuo, L., Grosfeld, H., Cristina, J., Hill, M.G. and Collins, P.L. (1996) Effects of mutations in the gene-start and gene-end sequence motifs on transcription of monocistronic and dicistronic minigenomes of respiratory syncytial virus. *J Virol* 70, 6892-901.
- La Via, W.V., Marks, M.I. and Stutman, H.R. (1992) Respiratory syncytial virus puzzle: clinical features, pathophysiology, treatment, and prevention. *J Pediatr* 121, 503-10.
- Lacaze-Masmonteil, T., Seidenberg, J., Mitchell, I., Cossey, V., Cihar, M., Csader, M., Baarsma, R., Valido, M., Pollack, P.F. and Groothuis, J.R. (2003) Evaluation of the safety of palivizumab in the second season of exposure in young children at risk for severe respiratory syncytial virus infection. *Drug Saf* 26, 283-91.
- Langedijk, J.P., Schaaper, W.M., Meloen, R.H. and van Oirschot, J.T. (1996) Proposed three-dimensional model for the attachment protein G of respiratory syncytial virus. *J Gen Virol* 77 (Pt 6), 1249-57.

- Leonov, S.V., Utter, G., Waris, M. and Norrby, E. (1994) Linear antigenic and immunogenic regions of the respiratory syncytial virus P protein. *J Gen Virol* 75 (Pt 6), 1353-9.
- Li, X., Sambhara, S., Li, C.X., Ewasyshyn, M., Parrington, M., Caterini, J., James, O., Cates, G., Du, R.P. and Klein, M. (1998) Protection against respiratory syncytial virus infection by DNA immunization. *J Exp Med* 188, 681-8.
- Lim, C.S., Kumarasinghe, G. and Chow, V.T. (2003) Sequence and phylogenetic analysis of SH, G, and F genes and proteins of Human respiratory syncytial virus isolates from Singapore. *Acta Virol* 47, 97-104.
- Lopez, J.A., Bustos, R., Orvell, C., Berois, M., Arbiza, J., Garcia-Barreno, B. and Melero, J.A. (1998) Antigenic structure of human respiratory syncytial virus fusion glycoprotein. *J Virol* 72, 6922-8.
- Lopez, J.A., Villanueva, N., Melero, J.A. and Portela, A. (1988) Nucleotide sequence of the fusion and phosphoprotein genes of human respiratory syncytial (RS) virus Long strain: evidence of subtype genetic heterogeneity. *Virus Res* 10, 249-61.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, F.L. and Randall, R.J. (1951) Protein Measurement with the Folin phenol reagent. *J. Bio. Chem.* 193, 265-275.
- Lukic-Grlic, A., Cane, P.A., Bace, A., Pringle, C.R., Mlinaric-Galinovic, G. and Popow-Kraupp, T. (1998) Antigenic and genomic diversity of central European respiratory syncytial virus strains. *Arch Virol* 143, 1441-7.
- Madhi, S.A., Venter, M., Alexandra, R., Lewis, H., Kara, Y., Karshagen, W.F., Greef, M. and Lassen, C. (2003) Respiratory syncytial virus associated illness in high-risk children and national characterisation of the circulating virus genotype in South Africa. *J Clin Virol* 27, 180-9.
- Mallipeddi, S.K. and Samal, S.K. (1993) Analysis of the ovine respiratory syncytial virus (RSV) G glycoprotein gene defines a subgroup of ungulate RSV. *J Gen Virol* 74 (Pt 12), 2787-91.
- Martinello, R.A., Chen, M.D., Weibel, C. and Kahn, J.S. (2002) Correlation between respiratory syncytial virus genotype and severity of illness. *J Infect Dis* 186, 839-42.
- Martinez, F.D. (2003) Respiratory syncytial virus bronchiolitis and the pathogenesis of childhood asthma. *Pediatr Infect Dis J* 22, S76-82.
- Martinez, I., Dopazo, J. and Melero, J.A. (1997) Antigenic structure of the human respiratory syncytial virus G glycoprotein and relevance of hypermutation events for the generation of antigenic variants. *J Gen Virol* 78 (Pt 10), 2419-29.
- Martinez, I., Valdes, O., Delfraro, A., Arbiza, J., Russi, J. and Melero, J.A. (1999) 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* 80 (Pt 1), 125-30.

- Mas, P., Goyenechea, A. and Moluk, A. (1967) Estudio Viroológico de una epidemia de bronquiolitis. *Bol Hig Epid.* 5, 141-144.
- Mazumder, B., Adhikary, G. and Barik, S. (1994) Bacterial expression of human respiratory syncytial viral phosphoprotein P and identification of Ser237 as the site of phosphorylation by cellular casein kinase II. *Virology* 205, 93-103.
- Melero, J.A., Garcia-Barreno, B., Martinez, I., Pringle, C.R. and Cane, P.A. (1997) Antigenic structure, evolution and immunobiology of human respiratory syncytial virus attachment (G) protein. *J Gen Virol* 78 (Pt 10), 2411-8.
- Mills, J. (1999) Prevention and treatment of respiratory syncytial virus infections. *Adv Exp Med Biol* 458, 39-53.
- Milner, M.E., de la Monte, S.M. and Hutchins, G.M. (1985) Fatal respiratory syncytial virus infection in severe combined immunodeficiency syndrome. *Am J Dis Child* 139, 1111-4.
- Mink, M.A., Stec, D.S. and Collins, P.L. (1991) Nucleotide sequences of the 3' leader and 5' trailer regions of human respiratory syncytial virus genomic RNA. *Virology* 185, 615-24.
- Mohapatra, S.S. (2003) Mucosal gene expression vaccine: a novel vaccine strategy for respiratory syncytial virus. *Pediatr Infect Dis J* 22, S100-3; discussion S103-4.
- Morgan, L.A., Routledge, E.G., Willcocks, M.M., Samson, A.C., Scott, R. and Toms, G.L. (1987) Strain variation of respiratory syncytial virus. *J Gen Virol* 68 (Pt 11), 2781-8.
- Morris, J.A., Blount, R.E. and Savage, R.R. (1956) Recovery of cytopathic agent from chimpanzees with coryza. *Proc Soc Exp Biol Med* 92, 544-550.
- Moura, F.E., Blanc, A., Frabasile, S., Delfraro, A., de Sierra, M.J., Tome, L., Ramos, E.A., Siqueira, M.M. and Arbiza, J. (2004) Genetic Diversity of Respiratory Syncytial Virus Isolated During an Epidemic Period From Children of Northeastern Brazil. *J Med Virol* en prensa.
- Mufson, M.A., Akerlind-Stopner, B., Orvell, C., Belshe, R.B. and Norrby, E. (1991) A single-season epidemic with respiratory syncytial virus subgroup B2 during 10 epidemic years, 1978 to 1988. *J Clin Microbiol* 29, 162-5.
- Mufson, M.A., Belshe, R.B., Orvell, C. and Norrby, E. (1988) Respiratory syncytial virus epidemics: variable dominance of subgroups A and B strains among children, 1981-1986. *J Infect Dis* 157, 143-8.
- Mufson, M.A., Orvell, C., Rafnar, B. and Norrby, E. (1985) Two distinct subtypes of human respiratory syncytial virus. *J Gen Virol* 66 (Pt 10), 2111-24.
- Murphy, B.R., Sotnikov, A.V., Lawrence, L.A., Banks, S.M. and Prince, G.A. (1990) Enhanced pulmonary histopathology is observed in cotton rats immunized with

formalin-inactivated respiratory syncytial virus (RSV) or purified F glycoprotein and challenged with RSV 3-6 months after immunization. *Vaccine* 8, 497-502.

- Murry, A.R. and Dowell, S.F. (1997) Respiratory syncytial virus: not just for kids. *Hosp Pract (Off Ed)* 32, 87-8, 91-4, 98 passim.
- Nagai, K., Tsutsumi, H., Yamazaki, H., Pattamadilok, S. and Chiba, S. (1993) Three antigenic variant groups in human respiratory syncytial virus subgroup B isolated in Japan. *Arch Virol* 128, 55-63.
- Neuzil, K.M., Johnson, J.E., Tang, Y.W., Prieels, J.P., Slaoui, M., Gar, N. and Graham, B.S. (1997) Adjuvants influence the quantitative and qualitative immune response in BALB/c mice immunized with respiratory syncytial virus FG subunit vaccine. *Vaccine* 15, 525-32.
- Neuzil, K.M., Tang, Y.W. and Graham, B.S. (1996) Protective Role of TNF-alpha in respiratory syncytial virus infection in vitro and in vivo. *Am J Med Sci* 311, 201-4.
- O'Donnell D, R., Milligan, L. and Stark, J.M. (1999) Induction of CD95 (Fas) and apoptosis in respiratory epithelial cell cultures following respiratory syncytial virus infection. *Virology* 257, 198-207.
- O'Donnell, D.R., McGarvey, M.J., Tully, J.M., Balfour-Lynn, I.M. and Openshaw, P.J. (1998) Respiratory syncytial virus RNA in cells from the peripheral blood during acute infection. *J Pediatr* 133, 272-4.
- Oh, P.I., Lanctjt, K.L., Yoon, A., Lee, D.S., Paes, B.A., Simmons, B.S., Parison, D. and Manzi, P. (2002) Palivizumab prophylaxis for respiratory syncytial virus in Canada: utilization and outcomes. *Pediatr Infect Dis J* 21, 512-8.
- Oien, N.L., Brideau, R.J., Walsh, E.E. and Wathen, M.W. (1994) Induction of local and systemic immunity against human respiratory syncytial virus using a chimeric FG glycoprotein and cholera toxin B subunit. *Vaccine* 12, 731-5.
- Olszewska-Pazdrak, B., Casola, A., Saito, T., Alam, R., Crowe, S.E., Mei, F., Ogra, P.L. and Garofalo, R.P. (1998a) Cell-specific expression of RANTES, MCP-1, and MIP-1alpha by lower airway epithelial cells and eosinophils infected with respiratory syncytial virus. *J Virol* 72, 4756-64.
- Olszewska-Pazdrak, B., Pazdrak, K., Ogra, P.L. and Garofalo, R.P. (1998b) Respiratory syncytial virus-infected pulmonary epithelial cells induce eosinophil degranulation by a CD18-mediated mechanism. *J Immunol* 160, 4889-95.
- Openshaw, P.J., Clarke, S.L. and Record, F.M. (1992) Pulmonary eosinophilic response to respiratory syncytial virus infection in mice sensitized to the major surface glycoprotein G. *Int Immunol* 4, 493-500.
- Openshaw, P.J., Culley, F.J. and Olszewska, W. (2001) Immunopathogenesis of vaccine-enhanced RSV disease. *Vaccine* 20 Suppl 1, S27-31.

- Orvell, C., Norrby, E. and Mufson, M.A. (1987) Preparation and characterization of monoclonal antibodies directed against five structural components of human respiratory syncytial virus subgroup B. *J Gen Virol* 68 (Pt 12), 3125-35.
- Ottolini, M.G., Porter, D.D., Hemming, V.G., Zimmerman, M.N., Schwab, N.M. and Prince, G.A. (1999) Effectiveness of RSVIG prophylaxis and therapy of respiratory syncytial virus in an immunosuppressed animal model. *Bone Marrow Transplant* 24, 41-5.
- Paes, B.A. (2003) Current strategies in the prevention of respiratory syncytial virus disease. *Paediatr Respir Rev* 4, 21-7.
- Palomo, C., Cane, P.A. and Melero, J.A. (2000) Evaluation of the antibody specificities of human convalescent-phase sera against the attachment (G) protein of human respiratory syncytial virus: influence of strain variation and carbohydrate side chains. *J Med Virol* 60, 468-74.
- Panuska, J.R., Merolla, R., Rebert, N.A., Hoffmann, S.P., Tsivitse, P., Cirino, N.M., Silverman, R.H. and Rankin, J.A. (1995) Respiratory syncytial virus induces interleukin-10 by human alveolar macrophages. Suppression of early cytokine production and implications for incomplete immunity. *J Clin Invest* 96, 2445-53.
- Papadopoulos, N.G., Gourgiotis, D., Javadyan, A., Bossios, A., Kallergi, K., Psarras, S., Tsolia, M.N. and Kafetzis, D. (2004) Does respiratory syncytial virus subtype influences the severity of acute bronchiolitis in hospitalized infants? *Respir Med* 98, 879-82.
- Pasty, M.K. and Samal, S.K. (1997) Analysis of bovine respiratory syncytial virus envelope glycoproteins in cell fusion. *J Gen Virol* 78 (Pt 8), 1885-9.
- Peebles, R.S., Jr. (2004) Viral infections, atopy, and asthma: is there a causal relationship? *J Allergy Clin Immunol* 113, S15-8.
- Peret, T.C., Hall, C.B., Hammond, G.W., Piedra, P.A., Storch, G.A., Sullender, W.M., Tsou, C. and Anderson, L.J. (2000) Circulation patterns of group A and B human respiratory syncytial virus genotypes in 5 communities in North America. *J Infect Dis* 181, 1891-6.
- Peret, T.C., Hall, C.B., Schnabel, K.C., Golub, J.A. and Anderson, L.J. (1998) Circulation patterns of genetically distinct group A and B strains of human respiratory syncytial virus in a community. *J Gen Virol* 79 (Pt 9), 2221-9.
- Perez, M., Garcia-Barreno, B., Melero, J.A., Carrasco, L. and Guinea, R. (1997) Membrane permeability changes induced in *Escherichia coli* by the SH protein of human respiratory syncytial virus. *Virology* 235, 342-51.
- Piedra, P.A. (2003) Clinical experience with respiratory syncytial virus vaccines. *Pediatr Infect Dis J* 22, S94-9.

- Plotnicky-Gilquin, H., Huss, T., Aubry, J.P., Haeuw, J.F., Beck, A., Bonnefoy, J.Y., Nguyen, T.N. and Power, U.F. (1999) Absence of lung immunopathology following respiratory syncytial virus (RSV) challenge in mice immunized with a recombinant RSV G protein fragment. *Virology* 258, 128-40.
- Power, U.F., Nguyen, T.N., Rietveld, E., de Swart, R.L., Groen, J., Osterhaus, A.D., de Groot, R., Corvaia, N., Beck, A., Bouveret-Le-Cam, N. and Bonnefoy, J.Y. (2001) Safety and immunogenicity of a novel recombinant subunit respiratory syncytial virus vaccine (BBG2Na) in healthy young adults. *J Infect Dis* 184, 1456-60.
- Prince, G.A., Capiou, C., Deschamps, M., Fabry, L., Garcon, N., Gheysen, D., Prieels, J.P., Thiry, G., Van Opstal, O. and Porter, D.D. (2000) Efficacy and safety studies of a recombinant chimeric respiratory syncytial virus FG glycoprotein vaccine in cotton rats. *J Virol* 74, 10287-92.
- Prince, G.A., Hemming, V.G., Horswood, R.L., Baron, P.A. and Chanock, R.M. (1987) Effectiveness of topically administered neutralizing antibodies in experimental immunotherapy of respiratory syncytial virus infection in cotton rats. *J Virol* 61, 1851-4.
- Randolph, A.G. and Wang, E.E. (2000) Ribavirin for respiratory syncytial virus infection of the lower respiratory tract. *Cochrane Database Syst Rev*, CD000181.
- Roberts, S.R., Lichtenstein, D., Ball, L.A. and Wertz, G.W. (1994) The membrane-associated and secreted forms of the respiratory syncytial virus attachment glycoprotein G are synthesized from alternative initiation codons. *J Virol* 68, 4538-46.
- Roca, A., Loscertales, M.P., Quinto, L., Perez-Brena, P., Vaz, N., Alonso, P.L. and Saiz, J.C. (2001) Genetic variability among group A and B respiratory syncytial viruses in Mozambique: identification of a new cluster of group B isolates. *J Gen Virol* 82, 103-11.
- Romero, J.R. (2003) Palivizumab prophylaxis of respiratory syncytial virus disease from 1998 to 2002: results from four years of palivizumab usage. *Pediatr Infect Dis J* 22, S46-54.
- Rota, P.A., Hemphill, M.A., Whistler, T. and Regnery, H.L. (1992) Antigenic and genetic characterization of the haemagglutinins of recent cocirculating strains of influenza B virus. *J Gen Virol* 7, 2737-2742.
- Routledge, E.G., Willcocks, M.M., Morgan, L., Samson, A.C., Scott, R. and Toms, G.L. (1987) Expression of the respiratory syncytial virus 22K protein on the surface of infected HeLa cells. *J Gen Virol* 68 (Pt 4), 1217-22.
- Rueda, P., Delgado, T., Portela, A., Melero, J.A. and Garcia-Barreno, B. (1991) Premature stop codons in the G glycoprotein of human respiratory syncytial viruses resistant to neutralization by monoclonal antibodies. *J Virol* 65, 3374-8.
- Rueda, P., Garcia-Barreno, B. and Melero, J.A. (1994) Loss of conserved cysteine residues in the attachment (G) glycoprotein of two human respiratory syncytial virus

escape mutants that contain multiple A-G substitutions (hypermutations). *Virology* 198, 653-62.

- Russi, J.C., Chiparelli, H., Montano, A., Etorena, P. and Hortal, M. (1989) Respiratory syncytial virus subgroups and pneumonia in children. *Lancet* 2, 1039-40.
- Salomon, H.E., Avila, M.M., Cerqueiro, M.C., Orvell, C. and Weissenbacher, M. (1991) Clinical and epidemiologic aspects of respiratory syncytial virus antigenic variants in Argentinian children. *J Infect Dis* 163, 1167.
- Sanchez-Seco, M.P., Navarro, J., Martinez, R. and Villanueva, N. (1995) C-terminal phosphorylation of human respiratory syncytial virus P protein occurs mainly at serine residue 232. *J Gen Virol* 76 (Pt 2), 425-30.
- Sandhu, J.S., Krasnyanski, S.F., Domier, L.L., Korban, S.S., Osadjan, M.D. and Buetow, D.E. (2000) Oral immunization of mice with transgenic tomato fruit expressing respiratory syncytial virus-F protein induces a systemic immune response. *Transgenic Res* 9, 127-35.
- Sanz, M.C., Kew, O.M. and Anderson, L.J. (1994) Genetic heterogeneity of the attachment glycoprotein G among group A respiratory syncytial viruses. *Virus Res* 33, 203-17.
- Sarmiento, L., Chacon, D., Valdivia, A., Savon, C. and Goyenechea, A. (1997) [Application of the polymerase chain reaction for detecting respiratory syncytial virus]. *Rev Cubana Med Trop* 49, 21-3.
- Savon, C., Laferte, J., Goyenechea, A., Valdivia, A., Morier, L. and Tejeiro, Y. (1996) [The standardization of an ultramicro ELISA assay for the detection of IgG antibodies to the respiratory syncytial virus]. *Rev Cubana Med Trop* 48, 161-2.
- Schlender, J., Bossert, B., Buchholz, U. and Conzelmann, K.K. (2000) Bovine respiratory syncytial virus nonstructural proteins NS1 and NS2 cooperatively antagonize alpha/beta interferon-induced antiviral response. *J Virol* 74, 8234-42.
- Scholz, H. (2000) [Palivizumab--a monoclonal antibody for passive immunoprophylaxis of respiratory syncytial virus infections]. *Z Geburtshilfe Neonatol* 204, 120-2.
- Schwarze, J., Cieslewicz, G., Hamelmann, E., Joetham, A., Shultz, L.D., Lamers, M.C. and Gelfand, E.W. (1999) IL-5 and eosinophils are essential for the development of airway hyperresponsiveness following acute respiratory syncytial virus infection. *J Immunol* 162, 2997-3004.
- Scott, P.D., Ochola, R., Ngama, M., Okiro, E.A., Nokes, D.J., Medley, G.F. and Cane, P.A. (2004) Molecular epidemiology of respiratory syncytial virus in Kilifi district, Kenya. *J Med Virol* 74, 344-54.

- Shay, D.K., Holman, R.C., Newman, R.D., Liu, L.L., Stout, J.W. and Anderson, L.J. (1999) Bronchiolitis-associated hospitalizations among US children, 1980-1996. *Jama* 282, 1440-6.
- Siqueira, M.M., Nascimento, J.P. and Anderson, L.J. (1991) Antigenic characterization of respiratory syncytial virus group A and B isolates in Rio de Janeiro, Brazil. *J Clin Microbiol* 29, 557-9.
- Srikiatkachorn, A. and Braciale, T.J. (1997) Virus-specific CD8⁺ T lymphocytes downregulate T helper cell type 2 cytokine secretion and pulmonary eosinophilia during experimental murine respiratory syncytial virus infection. *J Exp Med* 186, 421-32.
- Srikiatkachorn, A., Chang, W. and Braciale, T.J. (1999) Induction of Th-1 and Th-2 responses by respiratory syncytial virus attachment glycoprotein is epitope and major histocompatibility complex independent. *J Virol* 73, 6590-7.
- Srinivasakumar, N., Ogra, P.L. and Flanagan, T.D. (1991) Characteristics of fusion of respiratory syncytial virus with HEp-2 cells as measured by R18 fluorescence dequenching assay. *J Virol* 65, 4063-9.
- Stensballe, L.G. and Kristensen, K. (2002) [Respiratory syncytial virus]. *Ugeskr Laeger* 164, 5623-6.
- Steward, M.W. (2001) The development of a mimotope-based synthetic peptide vaccine against respiratory syncytial virus. *Biologicals* 29, 215-9.
- Storch, G.A., Anderson, L.J., Park, C.S., Tsou, C. and Dohner, D.E. (1991) Antigenic and genomic diversity within group A respiratory syncytial virus. *J Infect Dis* 163, 858-61.
- Storch, G.A. and Park, C.S. (1987) Monoclonal antibodies demonstrate heterogeneity in the G glycoprotein of prototype strains and clinical isolates of respiratory syncytial virus. *J Med Virol* 22, 345-56.
- Storch, G.A., Park, C.S. and Dohner, D.E. (1989) RNA fingerprinting of respiratory syncytial virus using ribonuclease protection. Application to molecular epidemiology. *J Clin Invest* 83, 1894-902.
- Suara, R.O., Piedra, P.A., Glezen, W.P., Adegbola, R.A., Weber, M., Mulholland, E.K., Greenwood, B.M. and Whittle, H. (1996) Prevalence of neutralizing antibody to respiratory syncytial virus in sera from mothers and newborns residing in the Gambia and in The United States. *Clin Diagn Lab Immunol* 3, 477-9.
- Sullender, W.M. (2000) Respiratory syncytial virus genetic and antigenic diversity. *Clin Microbiol Rev* 13, 1-15, table of contents.
- Sullender, W.M., Mufson, M.A., Anderson, L.J. and Wertz, G.W. (1991) Genetic diversity of the attachment protein of subgroup B respiratory syncytial viruses. *J Virol* 65, 5425-34.

- Sullender, W.M., Mufson, M.A., Prince, G.A., Anderson, L.J. and Wertz, G.W. (1998) Antigenic and genetic diversity among the attachment proteins of group A respiratory syncytial viruses that have caused repeat infections in children. *J Infect Dis* 178, 925-32.
- Sullender, W.M., Sun, L. and Anderson, L.J. (1993) Analysis of respiratory syncytial virus genetic variability with amplified cDNAs. *J Clin Microbiol* 31, 1224-31.
- Sung, R.Y., Chan, R.C., Tam, J.S., Cheng, A.F. and Murray, H.G. (1992) Epidemiology and aetiology of acute bronchiolitis in Hong Kong infants. *Epidemiol Infect* 108, 147-54.
- Tebbey, P.W., Unczur, C.A., LaPierre, N.A. and Hancock, G.E. (1999) A novel and effective intranasal immunization strategy for respiratory syncytial virus. *Viral Immunol* 12, 41-5.
- Teng, M.N. and Collins, P.L. (1998) Identification of the respiratory syncytial virus proteins required for formation and passage of helper-dependent infectious particles. *J Virol* 72, 5707-16.
- Thomas, E., Margach, M.J., Orvell, C., Morrison, B. and Wilson, E. (1994) Respiratory syncytial virus subgroup B dominance during one winter season between 1987 and 1992 in Vancouver, Canada. *J Clin Microbiol* 32, 238-42.
- Thompson, J., T., G., F., P., F., J and D., H. (1997) The CLUSTAL X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res* 25, 4876-4882.
- Thompson, W.W., Shay, D.K., Weintraub, E., Brammer, L., Cox, N., Anderson, L.J. and Fukuda, K. (2003) Mortality associated with influenza and respiratory syncytial virus in the United States. *Jama* 289, 179-86.
- Tristram, D.A., Hicks, W., Jr. and Hard, R. (1998) Respiratory syncytial virus and human bronchial epithelium. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 124, 777-83.
- Tsutsumi, H., Matsuda, K., Sone, S., Takeuchi, R. and Chiba, S. (1996) Respiratory syncytial virus-induced cytokine production by neonatal macrophages. *Clin Exp Immunol* 106, 442-6.
- Tsutsumi, H., Onuma, M., Suga, K., Honjo, T., Chiba, Y., Chiba, S. and Ogra, P.L. (1988) Occurrence of respiratory syncytial virus subgroup A and B strains in Japan, 1980 to 1987. *J Clin Microbiol* 26, 1171-4.
- Venter, M., Collinson, M. and Schoub, B.D. (2002) Molecular epidemiological analysis of community circulating respiratory syncytial virus in rural South Africa: Comparison of viruses and genotypes responsible for different disease manifestations. *J Med Virol* 68, 452-61.
- Venter, M., Madhi, S.A., Tiemessen, C.T. and Schoub, B.D. (2001) 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* 82, 2117-24.

- Venter, M., Rock, M., Puren, A.J., Tiemessen, C.T. and Crowe, J.E., Jr. (2003) Respiratory Syncytial Virus Nucleoprotein-Specific Cytotoxic T-Cell Epitopes in a South African Population of Diverse HLA Types Are Conserved in Circulating Field Strains. *J Virol* 77, 7319-29.
- Villanueva, N., Navarro, J., Mendez, E. and Garcia-Albert, I. (1994) Identification of a protein kinase involved in the phosphorylation of the C-terminal region of human respiratory syncytial virus P protein. *J Gen Virol* 75 (Pt 3), 555-65.
- Vogel, A.M., Lennon, D.R., Broadbent, R., Byrnes, C.A., Grimwood, K., Mildenhall, L., Richardson, V. and Rowley, S. (2002) Palivizumab prophylaxis of respiratory syncytial virus infection in high-risk infants. *J Paediatr Child Health* 38, 550-4.
- Vos, G.D., Rijtema, M.N. and Blanco, C.E. (1996) Treatment of respiratory failure due to respiratory syncytial virus pneumonia with natural surfactant. *Pediatr Pulmonol* 22, 412-5.
- Walsh, E.E. and Hruska, J.F. (1983) Identification of the virus-specific proteins of respiratory syncytial virus temperature-sensitive mutants by immunoprecipitation. *Proc Soc Exp Biol Med* 172, 202-6.
- Walsh, E.E., McConnochie, K.M., Long, C.E. and Hall, C.B. (1997) Severity of respiratory syncytial virus infection is related to virus strain. *J Infect Dis* 175, 814-20.
- Wang, S.Z., Xu, H., Wraith, A., Bowden, J.J., Alpers, J.H. and Forsyth, K.D. (1998) Neutrophils induce damage to respiratory epithelial cells infected with respiratory syncytial virus. *Eur Respir J* 12, 612-8.
- Wang, Z., Mu, L., Tao, Y. and Yuan, L. (2001) [A study on the relationship between respiratory tract viruses antigen in peripheral blood mononuclear cells and their antibody from children with steroid-sensitive and simple nephrotic syndrome]. *Hua Xi Yi Ke Da Xue Xue Bao* 32, 559-61.
- Ward, K.A., Everson, J.S., Lambden, P.R. and Watt, P.J. (1984) Antigenic and structural variation in the major nucleocapsid protein of respiratory syncytial virus. *J Gen Virol* 65 (Pt 10), 1749-57.
- Wathen, M.W., Aeed, P.A. and Elhammer, A.P. (1991) Characterization of oligosaccharide structures on a chimeric respiratory syncytial virus protein expressed in insect cell line Sf9. *Biochemistry* 30, 2863-8.
- Weber, E., Humbert, B., Streckert, H.J. and Werchau, H. (1995) Nonstructural protein 2 (NS2) of respiratory syncytial virus (RSV) detected by an antipeptide serum. *Respiration* 62, 27-33.
- Weber, M.W., Milligan, P., Sanneh, M., Awemoyi, A., Dakour, R., Schneider, G., Palmer, A., Jallow, M., Oparaogu, A., Whittle, H., Mulholland, E.K. and Greenwood,

B.M. (2002) An epidemiological study of RSV infection in the Gambia. *Bull World Health Organ* 80, 562-8.

- Weber, M.W., Mulholland, E.K. and Greenwood, B.M. (1998) Respiratory syncytial virus infection in tropical and developing countries. *Trop Med Int Health* 3, 268-80.
- Welliver, R.C. (2003) Review of epidemiology and clinical risk factors for severe respiratory syncytial virus (RSV) infection. *J Pediatr* 143, S112-7.
- Wertz, G.W., Krieger, M. and Ball, L.A. (1989) Structure and cell surface maturation of the attachment glycoprotein of human respiratory syncytial virus in a cell line deficient in O glycosylation. *J Virol* 63, 4767-76.
- Wessebasher, C. and Avila, W. (1997) Los virus como causa de IRA alta y baja en niños: Características generales y diagnóstico. In: Y. Benguigui, F. Antuñano, G. Schimunis and J. Yunis (Eds), *Infecciones respiratorias en niños USA OPS/OMS*, p. 123-148.
- West, J.V. (2002) Acute upper airway infections. *Br Med Bull* 61, 215-30.
- Whitehead, S.S., Bukreyev, A., Teng, M.N., Firestone, C.Y., St Claire, M., Elkins, W.R., Collins, P.L. and Murphy, B.R. (1999) Recombinant respiratory syncytial virus bearing a deletion of either the NS2 or SH gene is attenuated in chimpanzees. *J Virol* 73, 3438-42.
- Woelk, C.H. and Holmes, E.C. (2001) Variable immune-driven natural selection in the attachment (G) glycoprotein of respiratory syncytial virus (RSV). *J Mol Evol* 52, 182-92.
- Wyatt, L.S., Whitehead, S.S., Venanzi, K.A., Murphy, B.R. and Moss, B. (1999) Priming and boosting immunity to respiratory syncytial virus by recombinant replication-defective vaccinia virus MVA. *Vaccine* 18, 392-7.
- Zambon, M.C., Stockton, J.D., Clewley, J.P. and Fleming, D.M. (2001) Contribution of influenza and respiratory syncytial virus to community cases of influenza-like illness: an observational study. *Lancet* 358, 1410-6.
- Zheng, H., Storch, G.A., Zang, C., Peret, T.C., Park, C.S. and Anderson, L.J. (1999) Genetic variability in envelope-associated protein genes of closely related group A strains of respiratory syncytial virus. *Virus Res* 59, 89-99.
- Zlateva, K.T., Lemey, P., Vandamme, A.M. and Van Ranst, M. (2004) Molecular evolution and circulation patterns of human respiratory syncytial virus subgroup a: positively selected sites in the attachment g glycoprotein. *J Virol* 78, 4675-83.

BIBLIOGRAFÍA DEL AUTOR RELACIONADA CON EL TEMA DE LA TESIS.

1. Valdivia, A., Chacón, D., Savón, C., Oropesa, S., Sarmiento, L., **Valdés, O.**, Otero, A., Rosario D., and Goyenechea. Molecular Characterization of Outbreak of Respiratory Syncytial Virus (Subgroup A) in Havana, Cuba, by Monoclonal Antibodies and Restriction Mapping. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* 1997; Vol 4; No 5: 633-634.
2. **Valdés, O.**, Martínez, I., Valdivia, A., Cancio, R., Savón, C., Goyenechea, A., and Melero, J.A. Unusual Antigenic and Genetic Characteristics of Human Respiratory Syncytial Viruses Isolated in Cuba. *Journal of Virology* 1998; Vol 72; No 9: 7589-7592.
3. Martínez, I., **Valdés, O.**, Delfraro, A., Arbiza, J., Russi, J., and Melero, J.A. Evolutionary pattern of the G glycoprotein of human respiratory syncytial viruses from antigenic group B: the use of alternative termination codons and lineage diversification. *Journal of General Virology* 1999; 80: 125-130.
4. Valdivia, A., Chacón, D., Savón, C., **Valdés, O.**, Goyenechea, A., González, G., Cancio, R., Malero, J.A., Confirmation of unusual epidemiological behavior in the city of Havana, Cuba. *Biotecnología Aplicada* 1999; 16 (1).
5. Valdivia, A., González, G., Chacón, D., Savón, C., Otero, A., **Valdés, O.**, Cancio, R., Oropesa, S., Melero, J.A. García-Barreno, B., Goyenechea, A. Antigenic and genetic characterization of twenty-six strain of human respiratory syncytial virus (subgrupo A). Isolated during three consecutive in Havana city, Cuba. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 1999; 94 (4): 469-475.
6. Riba, M.A., **Valdés, O.**, Valdivia, A. Paramixovirus y Rubéola. En: Llop, A., Valdés-Dapena, M., Zuazo, J.L. (ed). *Microbiología y Parasitología Médicas*. La Habana, Editorial Ciencias Médicas 2001; Cap. 68, p: 247-272.
7. **Valdés, O.**, Savón, C., Goyenechea, A., Valdivia, A., González, G., Palerm, L., González, G., Melero, J. A. Genetic Diversity and Molecular Epidemiology of Respiratory Syncytial Virus Over Six Consecutive. *International Journal of Infectious Diseases* 2004; Vol 8, supplement 1, march.

8. Savón, C., Goyenechea, A., **Valdés, O.**, González, G., González, G., Palerm, L., Pérez, P. Respiratory Syncytial Virus genotypes and Disease severity among Cuban Infants. *International Journal of Infectious Diseases* 2004; Vol 8, supplent 1, march.
9. **Valdes, O.**, Savón, C., Goyenechea, A., Valdivia, A., González, G., Palerm, L., Melero, J.A. Diferentes patrones de circulación dentro de los subgrupos A y B del Virus Sincitial Respiratorio Humano en algunas provincias de Cuba. *Revista Cubana de Medicina Tropical* 2004; Vol 56, No2.

TRABAJOS RELACIONADOS CON EL TEMA DE TESIS PRESENTADOS EN EVENTOS CIENTÍFICOS.

1. Biotecnología Habana 97.
 - Caracterización antigénica y genética de un grupo de cepas de Virus Respiratorio Sincitial aisladas en Cuba durante 2 epidemias.
2. XVI Congreso Latinoamericano de Microbiología. VI Congreso Cubano de Microbiología y Parasitología (2003).
 - Diagnóstico Molecular del VSRH, subgrupo A y B durante las temporadas epidémicas 2000-2001, Cuba.
 - Epidemiología Molecular del VSRH en 6 provincias de Cuba.
3. 11 th International Congress on Infectious Diseases en Cancun (2004).
 - Genetic Diversity and Molecular Epidemiology of Respiratory Syncytial Virus Over Six Consecutive.
 - Respiratory Syncytial Virus genotypes and Disease severity among Cuban Infants.
4. V Jornada Internacional de Infectología Pediátrica (2004).
 - Diagnóstico molecular de la infección respiratoria baja en niños menores de un año en tres temporadas epidémicas. Reporte preliminar.

ANEXO: 1

**CONSENTIMIENTO PARA PARTICIPAR EN LA INVESTIGACION DE
CARACTERIZACIÓN ANTIGÉNICA Y MOLECULAR DEL VIRUS
SINCITAL RESPIRATORIO.HUMANO, CUBA 1994-2000.**

Padres o Tutores del niño/a: _____.

El Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí " (IPK) del Ministerio de Salud Pública de Cuba (MINSAP) desean realizar el siguiente Proyecto de Caracterización antigénica y molecular del Virus Sincital Respiratorio Humano, Cuba 1994-200 con el fin de contribuir al mejor manejo clínico-terapéutico del niño y al conocimiento del papel que juega este virus en las infecciones respiratorias bajas en edades pediátricas. Esta investigación no conlleva riesgo ni daño para el voluntario.

Por lo antes expuestos solicitamos su colaboración, absolutamente voluntaria, para que su pequeño hijo/a sea incluido en esta investigación. Si accede a que su hijo/a participe se le obtendrá muestra de exudado nasofaríngeo cuando presente un cuadro clínico de Infección Respiratoria Aguda. Los resultados que se obtengan del estudio virológico de los exudados nasofaríngeos realizados se le entregaran al médico que atiende a su hijo/a.

El MINSAP y el IPK agradecen anticipadamente su colaboración para la feliz culminación de esta investigación.

Nombre del padre o tutor

Fecha

Firma