



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE SAN LUIS POTOSÍ
FACULTAD DE MEDICINA**



**Centro de Investigación en Ciencias de la Salud y
Biomedicina (CICSaB)**

POSGRADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS BÁSICAS



**Análisis de la variabilidad del gen G del virus sincicial
respiratorio**

TESIS QUE PRESENTA

Q. F. B. ULRİK AVILIX OLIVA JARA

**PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS
BIOMÉDICAS BÁSICAS**

CODIRECTORES DE TESIS

Dr. DANIEL E. NOYOLA CHERPITEL

DRA. MARIANA SALGADO BUSTAMANTE

Julio de 2023

CRÉDITOS INSTITUCIONALES

Esta tesis se llevó a cabo en el Departamento de Microbiología de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí, bajo la tutoría del Dr. Daniel E. Noyola Cherpitel, gracias al apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología que otorgó la beca número 1147572. Este proyecto se realizó gracias al financiamiento del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) Convocatoria de Investigación Científica Básica (Proyecto CONACYT-A1-S-38080).

Tesis que presenta:

Q. F. B. ULRİK AVILIX OLIVA JARA

PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS BÁSICAS

CODIRECTORES DE TESIS

DR. DANIEL E. NOYOLA CHERPITEL

DRA. MARIANA SALGADO BUSTAMANTE

ASESORA

DRA. OTHIR GIDALTI GALICIA CRUZ

JURADO

PRESIDENTE

DRA. ADRIANA ELIZABETH MONSIVÁIS URENDA

SINODALES

DRA. OTHIR GIDALTI GALICIA CRUZ

DRA. SARAY ARANDA ROMO

SINODAL SUPLENTE

DRA. ESTHER LAYSECA ESPINOSA

Julio de 2023



Análisis de la variabilidad del gen G del virus sincicial respiratorio. Por Ulrik Avilix Oliva Jara. Se distribuye bajo [Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-CompartirIgual 4.0 Internacional License](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/).

AGRADECIMIENTOS

No tengo palabras ni emociones suficientes para poder expresar a todas las personas que me han apoyado para lograr este enorme paso en mi formación.

Desde luego el núcleo que me impulsa cada día a esforzarme más para lograr esto mi familia: mi mamá Silvia, papá Ramiro y mi hermana Sharis y mi hermano Didier. Los cuales siempre estuvieron para motivarme y apoyarme, pero sobre todo para servir como apoyo y escucharme cuando estuve en momentos de llanto y desconfianza sobre mí mismo. Ustedes siempre fueron, son y serán mi principal motor que tendré en toda mi vida, los amo con todo mi corazón.

Las grandes amistades que hice al llegar a San Luis Potosí, empezando por mi primera amiga María Fernanda, la cual desde un inicio me abrió los brazos y me ayudó a adaptarme de mejor forma. Todos y cada uno de los integrantes de mis amigos del team Microbiología: Camila, Sandra, Louis, Bleida, Sra José, Chava y a todos los que integran a este hermoso departamento. A las personas que me formaron todo este periodo y me instruyeron para llevar a cabo el proyecto, el Dr Noyola y el Dr Juan Carlos; Juan Carlos más que mi mentor se convirtió en un amigo que siempre me atendió y estuvo para resolver mis dudas, y para aguantar las veces que no sabía qué hacer y con toda paciencia siempre me explicó, el Dr Noyola que siempre estuvo super atento y con toda su experiencia el cual es reflejo del excelente investigador y asesor que es, me dirigió siempre de la mejor forma y le aprendí lo más que pude. Ahora mencionaré a dos personas sumamente indispensables nuevamente, Camila y Sandra, que me apoyaron en puntos clave y jamás me dejaron de brindar sus brazos y hombros para apoyarme, y la persona que se volvió mi alma gemela que me entendía cuando yo no lo hacía, nuevamente usted Maria Camila.

A cada uno de los docentes de este posgrado, los cuales me formaron a lo largo de estos dos años, los cuales son del más alto nivel, tanto ellos como investigadores como sus clases, que siempre las tendré presente y sin duda serán invaluable en toda mi vida.

A mis amistades en general que desde cualquier parte de México (principalmente Zacatecas, Aguascalientes y CDMX) me estuvieron apoyando a la distancia y no me dejaron solo nunca.

Por último pero no menos importante, a mi gran y hermosa familia, que siempre me apoyaron de forma extraordinaria y de todas formas, desde luego las que más han tenido contacto durante toda mi vida: mi prima Carla Jara y mi tía Mariela Jara, que desde pequeño no me han dejado de alentar en mis sueños; sin embargo como comenté, realmente amo a toda mi familia y agradezco siempre el apoyo que me han dado y sé que me darán siempre.

Análisis de la variabilidad del gen G del virus sincicial respiratorio

RESUMEN

Antecedentes: El virus sincicial respiratorio (VSR) es un importante patógeno respiratorio. Se clasifica en dos tipos, VSR-A y VSR-B, con base en la secuencia del gen G. A partir de los años 1999 y 2009 empezaron a circular variantes con duplicaciones parciales del gen G de VSR-B y VSR-A, respectivamente. Las medidas de higiene y prevención para evitar la propagación del coronavirus de tipo 2 causante del síndrome respiratorio agudo severo (SARS-CoV-2) afectó la prevalencia de VSR.

Objetivo: Caracterizar las secuencias de VSR circulantes en México y a nivel global antes y durante la pandemia de SARS-CoV-2.

Resultados: Se identificaron 154 muestras de estudios epidemiológicos en las que se reportó la detección de VSR. De éstas, se obtuvieron 25 secuencias de buena calidad. Se analizaron un total de 14,818 secuencias, obtenidas de GenBank y GISAID (9,267 de VSR-A y 5,551 de VSR-B), entre las cuales se encontraron 35 reportadas en México. Todas las secuencias (tanto a nivel mundial como en México) detectadas durante la pandemia de SARS-CoV-2 correspondieron a la variante ON1 del genotipo NA1 (VSR-A) y al genotipo BA-CC (VSR-B). Las secuencias de VSR-A muestran diversidad tanto a nivel nacional como global, mientras que la mayoría de las secuencias de VSR-B identificadas durante la pandemia se concentran en una clada.

Conclusión: Tras la introducción del SARS-CoV-2, los únicos genotipos de VSR que circulan a nivel mundial son la variante ON1 de NA1 y BA-CC. Las secuencias de VSR-A muestran mayor diversidad, mientras que ésta se ha reducido en el caso de VSR-B. Esto sugiere que los factores asociados a la evolución de VSR-B puedan haber diferido de los de VSR-A y se pudiera haber presentado un evento de cuello de botella evolutivo. Se requieren estudios adicionales para corroborar esta posibilidad y analizar los posibles mecanismos que dieron lugar a este comportamiento.

INTRODUCCIÓN

El virus sincicial respiratorio (VSR) es un virus de ARN monocatenario de sentido negativo, no segmentado y envuelto. Es el patógeno viral más común en bebés y niños con bronquiolitis y neumonía. Además, es causa importante de infecciones respiratorias agudas en adultos mayores (≥ 65 años) y pacientes inmunocomprometidos. El VSR pertenece al género *Orthopneumovirus* y a la familia *Pneumoviridae*, tiene un tamaño de 150 nm de diámetro y su genoma de aproximadamente 15 kilobases cuenta con 10 genes que codifican 11 proteínas (1-3).

La proteína G tiene una alta importancia en la unión del virus a la célula huésped. Además, juega un papel importante en la evolución del virus debido a que, por su hipervariabilidad, permite evadir la neutralización por anticuerpos generados por el sistema inmune. La aparición de variantes con mutaciones que traducen cambios de aminoácidos en ciertos sitios clave conduce a la incapacidad de los anticuerpos circulantes para neutralizar a estos virus; en consecuencia, se pueden seleccionar variantes y genotipos que mantengan su capacidad replicativa en el huésped y su transmisibilidad en la población. Con base a la secuencia del gen G, se puede clasificar al VSR en tipo A y tipo B, con varios genotipos identificados en cada uno (4-6). A partir del año 1999, se detectó la circulación de una variante del virus VSR-B en Buenos Aires, Argentina, con una duplicación parcial de 60 nucleótidos dentro del marco de lectura del gen de la proteína G (dando lugar a la duplicación de 20 aminoácidos); a este genotipo se le nombró BA. En el 2012 se reportó un fenómeno similar con el virus VSR-A en Ontario, Canadá: se detectó la circulación del virus con una duplicación parcial de 72 nucleótidos dentro del marco de lectura del gen

de la proteína G. A este genotipo se le nombró ON1; las primeras cepas de VSR ON1 datan de 2009 y hoy en día todas las cepas circulantes a nivel global cuentan con alguna de estas duplicaciones (7-14).

En general VSR-A predomina sobre VSR-B en pacientes con infecciones respiratorias agudas a nivel global; sin embargo, esto puede variar en diferentes años y regiones geográficas. De relevancia, a partir de la pandemia por el coronavirus de tipo 2 causante del síndrome respiratorio agudo severo (SARS-CoV-2) en el año 2020, las medidas de higiene y prevención adaptadas para evitar su propagación y con ello evitar el mayor número de defunciones posibles, alteró la circulación de otros virus respiratorios. Entre estos virus se afectó la prevalencia de VSR: en un centro hospitalario de Argentina se encontró que no hubo ninguna hospitalización por VSR durante el año 2020, en contraste con 253 hospitalizaciones durante 2018 y 215 durante 2019 (15); en un estudio realizado en Japón se registraron 179 hospitalizaciones por VSR en 2020 en comparación con 358 y 385 registradas durante 2018 y 2019, respectivamente (16). En diversos países se reportaron patrones semejantes, con reducción importante en el número de infecciones y hospitalizaciones causadas por VSR (17,18). En el año 2021 volvió a reportarse circulación de VSR, pero con un retraso en su periodo epidémico y con un incremento en el número de hospitalizaciones. Al momento se desconoce si estos cambios observados a consecuencia de la pandemia del SARS-CoV-2 hayan tenido un efecto sobre los genotipos de VSR circulantes a nivel regional o global (14–16).

El objetivo principal de este estudio fue caracterizar las secuencias de VSR circulantes en México y a nivel global antes y durante la pandemia de SARS-CoV-2. Como objetivos específicos nos propusimos analizar las características de secuencias de VSR identificadas antes y durante la pandemia de COVID-19 e identificar diferencias en las secuencias del gen G de VSR.

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestras de infecciones en México. Se incluyó una selección de muestras obtenidas en dos estudios multicéntricos para la caracterización de los virus causantes de neumonías en niños, en los que participaron hospitales de la Ciudad de México, San Luis Potosí, Guadalajara, Durango, Colima, Sinaloa, Chihuahua, Toluca y Cuernavaca, y coordinados por el Laboratorio de Investigación de Enfermedades Infecciosas de la Unidad de Investigación de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México. Se incluyeron muestras obtenidas durante el periodo 2010-2013 (19) y durante el periodo 2021-2023 y en las cuales se había identificado la presencia de VSR a través del x-TAG Respiratory Viral Panel utilizando la plataforma Bio-Plex/Luminex (Luminex Corporation), Anyplex II RV16 kit (Seegene, Seoul, South Korea), FilmArray respiratorio o mediante RT-PCR tiempo real específica para VSR. Ambos proyectos fueron aprobados por los comités de ética de las instituciones participantes y se obtuvo el consentimiento informado de los padres de los participantes.

Obtención de secuencias del gen G de VSR. Las muestras seleccionadas se sometieron a RT-PCR dirigida al ectodominio de VSR-A y VSR-B utilizando los siguientes oligos: VSR-A, Fw 5'-ACA TCA GAA CTA CAC TGC TC ACC-3' y Rv 5'-GTT ATC ACA CTG GTA TAC CAA CCR-3'; y VSR-B, Fw 5'-GCA GCC ATA ATA TTC ATC ATC TCT-3' y Rv 5'-TGC CCC AGR TTT AAA TTT CGT TC-3'. Las muestras que resultaron positivas a la amplificación fueron secuenciadas por método de Sanger/capilar en un equipo AB 3500 (Applied Biosystems) en el Laboratorio Nacional de Biotecnología Agrícola, Médica y Ambiental (LANBAMA, IPICYT).

Descarga y selección de secuencias globales. Se realizó la descarga de la totalidad de secuencias de VSR disponibles al 19 de enero de 2023 de GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) y de GISAID (<https://gisaid.org/>). Se generó un alineamiento múltiple de secuencias con ayuda del algoritmo MAFFT v7.2 y se separaron las secuencias de VSR-A de las de VSR-B. Se extrajeron las secuencias que contaran con el ectodominio completo del gen G. Se eliminaron las secuencias con nucleótidos degenerados, indeterminados, secuencias sintéticas, con inserciones o deleciones distintas a las previamente reportadas en literatura. Se obtuvo un dataset por cada subtipo viral.

Análisis de las secuencias. A cada dataset de secuencias obtenidas de las bases de datos, se agregaron las secuencias obtenidas en nuestro estudio para análisis. Se seleccionó el modelo de sustitución de nucleótidos mejor adaptado a cada dataset con ayuda de jmodeltest y se realizó el análisis filogenético mediante el método de Máxima Verosimilitud con ayuda del software MEGA v.10.

Elaboración de árbol filogenético. Se generó un dendrograma a partir del archivo Newick y se visualizó la distribución de las cladas correspondientes a las secuencias identificadas en el dendrograma con el programa FigTree v1.4.4.

RESULTADOS

En total se identificaron 154 muestras de los estudios epidemiológicos en las que se reportó la detección de VSR. De éstas, se logró amplificar el ectodominio del gen G en 81 muestras, las cuales se sometieron a secuenciación tanto en sentido positivo como en sentido negativo. Se obtuvieron secuencias de buena calidad en 25 muestras, las cuales se incluyeron para análisis filogenético y determinación del genotipo viral. La mayoría de las secuencias obtenidas fueron de muestras recolectadas en San Luis Potosí. El análisis de las secuencias disponibles en GenBank y GISAID resultó en un total de 14,818 secuencias, de las cuales 9,267 corresponden a VSR-A y 5,551 a VSR-B. El análisis filogenético mostró que las cladas predominantes corresponden a la variante ON1 del genotipo NA1, en el caso de VSR-A, y al genotipo BA-CC, en el caso de VSR-B (Figura 1).

De las secuencias descargadas de GenBank y GISAID, 35 correspondieron a secuencias reportadas en México. Algunas de estas secuencias corresponden a muestras detectadas previamente en nuestro laboratorio (6,20). Las secuencias obtenidas de GenBank y GISAID se analizaron en conjunto con las 25 secuencias generadas en este estudio, para un total de 60 secuencias de México.

Análisis de secuencias de VSR de México

Entre las 60 secuencias disponibles de México, 35 corresponden a muestras obtenidas previo al inicio de la pandemia por SARS-CoV-2 (anteriores a 2020); 26 corresponden a VSR-A (1, 5, 10 y 10 son de los genotipos GA1, GA5, NA1 y ON1, respectivamente) y 9 corresponden a VSR-B (4 y 5 son de los genotipos GB3 y BA, respectivamente) (Figura 2). Veinticinco muestras fueron obtenidas durante la pandemia de SARS-CoV-2, de las cuales 13 corresponden a VSR-B (todas fueron del genotipo BA-CC) y 12 corresponden a VSR-A (todas fueron del genotipo ON1).

Análisis de secuencias a nivel global.

A nivel global un total de 12,471 secuencias corresponden al periodo antes de la pandemia por el SARS-CoV-2, de las cuales 7,879 corresponden a VRS-A y 4,592 corresponden a VSR-B. Posterior al inicio de la pandemia, se cuenta con un total de 2,065 secuencias, las cuales están distribuidas de la siguiente forma, de acuerdo con el año de detección: 617 de 2020 (481 VSR-A y 138 VSR-B); 762 de 2021 (508 VSR-A y 254 VSR-B); y 683 de 2022 (407 VSR-A y 276 VSR-B).

Todas las secuencias VSR-A reportadas posterior al inicio de la pandemia corresponden al genotipo ON1. En la Figura 1A puede observarse que las secuencias reportadas durante la pandemia de COVID-19 se encuentran distribuidas en varios clados; en contraste, todas las secuencias de VSR-B detectadas tras el inicio de la pandemia corresponden al genotipo BA-CC y se encuentran conjuntadas mayoritariamente en una sola clada (Figura 1B).

Durante la pandemia se registraron cambios en las secuencias de nucleótidos de VSR-A con respecto al paso de los años, y es en el 2020 y 2021 cuando estos

cambios son más notorios; asimismo, en el 2022 se puede observar un comportamiento interesante en el cambio de nucleótidos, ya que algunos de los cambios de nucleótidos que se habían registrado en los años previos ya no se observaron (por ejemplo, en las posiciones 273 y 299 de VSR-A, y en estos casos, la secuencias se asemejan a las registradas en los años posteriores a la pandemia (2018 y 2019) (Tabla 1A y 1B). En general, en años recientes se han fijado algunos polimorfismos en los aislados de VSR-A, los que constituyen características distintivas de las variantes ON1 (con duplicación parcial del gen G), las cuales son las únicas cepas que circulan actualmente a nivel global (Tabla 1B). De relevancia, se observa que algunos de estos cambios nucleotídicos son no sinónimos, y resultan en cambios importantes en la secuencia de aminoácidos tanto en los virus NA1 (sin duplicación), como ON1 (con duplicación parcial del gen G) (Tabla 2). En el caso de VSR-B, se registró la presencia de polimorfismos no sinónimos en las secuencias nucleotídicas, las cuales también se vieron reflejados en las secuencias de aminoácidos de los aislados detectados durante la pandemia; esos polimorfismos son característicos del genotipo BA-CC, el cual es el de más reciente aparición y actualmente predomina a nivel global (Tabla 3A y 3B). También es de interés el observar que, durante los últimos años (2021, 2022), algunos de los cambios nucleotídicos (por ejemplo, en las posiciones 831 y 835) son menos prevalentes que en años previos (Tabla 4).

DISCUSIÓN

En el presente estudio se realizó un análisis exhaustivo de las secuencias de VSR disponibles en México y a nivel global hasta el 19 de enero de 2023. Con la adición de 25 secuencias generadas en este trabajo, incrementamos en aproximadamente 40% la información de genotipos de VSR circulantes en nuestro país, particularmente aquellos encontrados tras la pandemia de SARS-CoV-2. Tanto a nivel global, como en México, todas las muestras circulantes a partir del 2020 corresponden a los genotipos ON1 (en el caso de VSR-A) y BA-CC (en el caso de VSR-B). De interés, la mayoría de las secuencias de VSR-A corresponden a un número limitado de países en cada continente: Norteamérica, Estados Unidos; Sudamérica, Argentina y Brasil; Oceanía, Australia; Europa, España, Francia, Reino Unido; Asia, Japón; y África, Kenia y Sudáfrica. Sin embargo, algunos otros países también están representados, incluyendo Austria, Bélgica, China, Egipto, Filipinas, India, México, Países Bajos, Rusia, Tailandia y Vietnam. Las secuencias de VSR-A que se han reportado a partir de 2020 corresponden a la variante ON1 y están distribuidas a lo largo de toda la clada de esta variante (Figura 2a).

Por otro lado, en el caso de VSR-B todas las secuencias que circulan actualmente se concentraron en una sola clada dentro del genotipo BA-CC (Figura 2b). Si bien la mayoría de estas secuencias corresponden a México y Estados Unidos, también se encontraron secuencias de Argentina, Australia, Brasil, China, Egipto, España, Francia, Reino Unido, Israel, Japón, Macedonia del Norte, Países Bajos, Rusia, Arabia Saudita y Vietnam. Si bien las secuencias que conforman esta clada dentro del genotipo BA-CC cuentan con polimorfismos en muchas posiciones de la secuencia del gen G, la mayoría de estos cambios son sinónimos. Sin embargo, los

cambios no sinónimos que están presentes podrían ser relevantes en las interacciones entre el virus y el huésped y ameritan un seguimiento epidemiológico y análisis subsecuentes para conocer sus posibles implicaciones biológicas. También sería de interés analizar si estos cambios siguen algún patrón que permita predecir cambios subsecuentes o si son predominantemente el resultado de eventos estocásticos.

Las secuencias de VSR-A reportadas en los últimos años muestran un comportamiento interesante. Observamos que se han presentado diversos polimorfismos (tanto sinónimos como no sinónimos), particularmente en las secuencias obtenidas durante el año 2020, en comparación con las secuencias de los años 2018 y 2019; sin embargo, en los años 2021 y 2022 se observa una clara tendencia de “retroceso”, encontrando que la prevalencia de esos polimorfismos es menor y las secuencias nucleotídicas (así como las secuencias predichas de aminoácidos) muestran una alta similitud a las secuencias reportadas en los años 2018 y 2019. Es posible que este comportamiento esté asociado, de alguna forma, con el efecto que tuvo la pandemia de COVID-19 sobre la circulación de virus respiratorios, ya sea como consecuencia de la alta prevalencia de SARS-CoV-2 o de las medidas sanitarias establecidas durante el 2020, con la subsecuente relajación en 2021 y 2022.

Una limitante en nuestro estudio fue la disponibilidad de solamente 60 secuencias de VSR de México. A pesar de que identificamos un gran número de muestras positivas a VSR a nivel nacional, muchas de estas tenían más de 10 años en almacenamiento, por lo que la carga viral dentro de éstas puede haber disminuido drásticamente dificultando la amplificación del ectodominio del gen G, ya que la

carga viral en muestras almacenadas a largo plazo disminuye al paso del tiempo. Por otro lado, es posible que la carga viral en algunos casos haya sido baja, dependiendo de la evolución clínica del paciente (21,22). Como consecuencia, al realizar los ensayos de detección mediante RT-PCR para confirmar la presencia de VSR y procesar las muestras para su genotipificación, no fue posible detectar al virus en un número importante de muestras.

En conclusión, nuestro estudio muestra que las secuencias de VSR que circulan tras la introducción del SARS-CoV-2 en la población a nivel mundial corresponden a la variante ON1 del genotipo NA1 y al genotipo BA-CC. El genotipo BA-CC que apenas hace unos años se presentaba en unos cuantos países, ahora es el genotipo predominante a nivel mundial y el único que detectamos en México a partir de la pandemia de COVID-19. En el caso de VSR-A, las secuencias analizadas muestran que existe diversidad en los virus que circulan en México y a nivel global; en contraste, la gran mayoría de las cepas de VSR-B BA-CC detectadas tras el inicio de la pandemia de COVID-19 se agrupan en una clada en la que localizan las secuencias que detectamos en México, así como las secuencias reportadas en los Estados Unidos y otros países. Esto sugiere que, en el caso de VSR-B, pudiera haberse generado un evento de cuello de botella evolutivo, que dio lugar a una reducción en la variabilidad del virus, indicando posibles diferencias en la evolución de VSR-A y VSR-B. Es de relevancia contar con un mayor número de secuencias de los virus que actualmente están en circulación y con mayor representación geográfica para evaluar esta posibilidad y los posibles mecanismos que dieron lugar a este comportamiento.

FIGURAS Y TABLAS

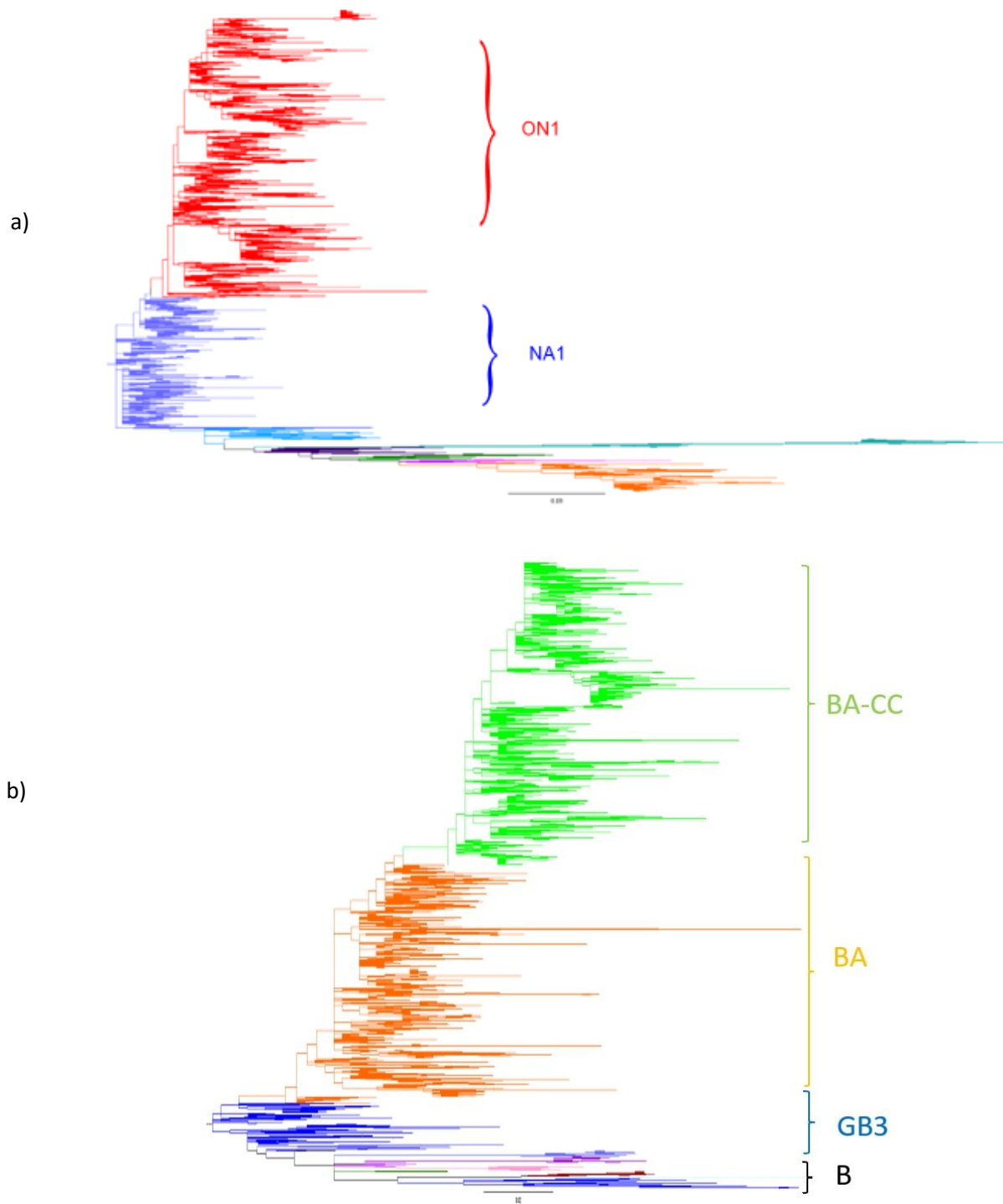


Figura 1. Cladogramas de Máxima Verosimilitud de secuencias del ectodominio de VSR-A (a) y VSR-B (b).

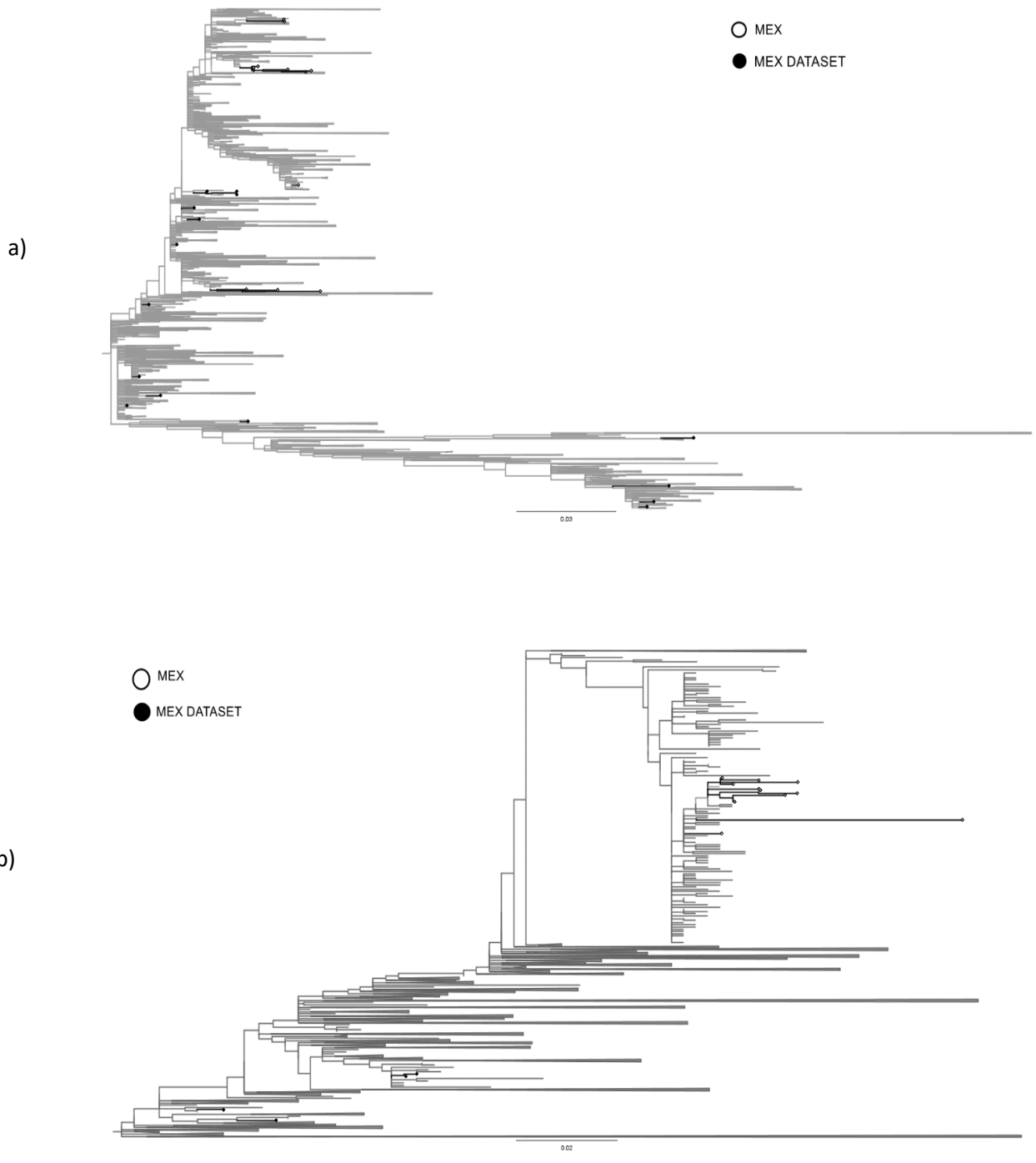


Figura 2. Cladogramas de Máxima Verosimilitud de secuencias del ectodominio de VSR-A (a) y VSR-B (b) señalando las secuencias mexicanas (líneas en negro) incluyendo las generadas en este estudio (marcador con círculos abiertos) y aquellas descargadas de GenBank (marcador con círculos cerrados).

Tabla 1. Cambios de nucleótidos en las secuencias de VSR-A de acuerdo con el genotipo (a) y durante los últimos 4 años (b).

Tabla 1A

Ref	Posición	RSVA		NA1		ON1	
c	199	a	c	c		c	
		60%	40%	100%		98%	
a	240	a		g		g	
		99%		91%		98%	
g	242	g		a		a	
		75%		100%		99%	
c	273	g	c	c		c	
		61%	35%	99%		91%	
c	305	t	c	c		c	
		61%	39%	99%		98%	
t	315	t		c		c	
		77%		98%		98%	
c	323	t	c	c		c	
		53%	47%	99%		100%	
a	331	a		t		t	
		75%		99%		99%	
a	337	g	a	a		a	
		50%	49%	100%		100%	
t	365	t		c		c	
		75%		100%		98%	
c	366	c		t		t	
		77%		97%		97%	
c	374	t	c	c		c	
		60%	38%	99%		100%	
t	377	t	c	c		c	
		62%	37%	99%		99%	
g	378	g		a		a	
		74%		100%		98%	
c	384	t	c	c		c	
		59%	41%	100%		100%	
c	398	c		t		t	
		87%		98%		98%	
c	424	c		c		t	
		100%		73%		99%	

a	425	a		a	t	t	
		99%		58%	36%	75%	
c	429	c		t		t	
		83%		84%		86%	
g	435	g		a		a	
		84%		100%		100%	
c	459	c		t		t	
		98%		86%		94%	
c	467	c		a		a	
		82%		100%		100%	
t	480	t		c		c	
		82%		100%		98%	
a	481	g	a	a		a	
		55%	45%	100%		100%	
c	507	c		t		t	
		87%		96%		97%	
c	543	t	c	c		c	
		67%	33%	100%		100%	
a	561	a		g		g	
		99%		99%		99%	
a	572	g	a	a		a	
		61%	39%	100%		100%	
a	609	g	a	a		a	
		53%	46%	100%		99%	
c	622	a		a		c	
		90%		71%		99%	
c	644	t		c		c	
		77%		100%		99%	
t	674	c	t	t		t	
		67%	33%	95%		86%	
c	677	c		t		t	
		77%		99%		99%	
c	678	t	c	c		c	
		50%	49%	100%		99%	
c	681	c		c		t	
		98%		97%		83%	
c	690	c		c		t	
		97%		76%		83%	
a	695	a		a		g	
		100%		100%		99%	

a	709	a		g		a	
		98%		78%		100%	
c	713	t	c	c		c	
		60%	40%	100%		100%	
c	717	c		c		t	c
		99%		97%		63%	37%
a	721	c	a	a		a	
		60%	39%	99%		100%	
t	748	a		t		t	
		72%		98%		99%	
c	749	a	c	c		c	
		66%	32%	97%		99%	
a	752	g	a	a		a	
		62%	37%	100%		100%	
c	753	t	c	c		c	
		65%	35%	99%		99%	
c	758	c		c		a	
		100%		97%		99%	
c	798	t	c	c		c	
		62%	38%	100%		100%	
t	805	t		a		a	
		81%		100%		100%	
a	817	a		a		t	
		99%		71%		90%	
c	820	a	c	c		c	
		61%	39%	100%		98%	
c	821	c		t		c	t
		96%		73%		65%	35%
t	828	t		a		a	
		96%		100%		100%	
g	835	a	g	g		g	
		55%	43%	100%		97%	
t	838	t		t		c	t
		98%		98%		53%	47%
c	953	c		t		t	
		78%		100%		100%	
c	957	c		c		t	
		85%		98%		82%	
c	962	c		t		t	
		99%		99%		92%	

c	972	t	c	c		c	
		61%	39%	100%		91%	
c	977	g	a	a		a	
		57%	33%	97%		93%	
c	979	c		a		a	
		86%		97%		100%	
c	980	c		t		t	
		71%		98%		99%	
a	981	a		g		g	
		87%		98%		98%	
g	982	g		a		a	
		96%		93%		99%	

* Referencia se refiere a la secuencia prototipo. El color azul indica cambios sustantivos en comparación con los genotipos de VSR-A que no corresponden al genotipos NA1 (incluyendo las cepas ON1).

Tabla 1B

Ref	Posición	2018		2019		2020		2021		2022	
c	273	c		c		t	c	c		c	
		99%		94%		55%	45%	73%		97%	
g	299	g		g		t	g	g		g	
		99%		94%		55%	45%	73%		96%	
t	348	t		t	c	c		c	t	t	
		76%		57%	42%	82%		54%	42%	82%	
a	425	t		t	c	c		c	t	t	
		76%		55%	45%	83%		59%	41%	78%	
t	552	c	t	c		c		c		t	
		68%	21%	77%		92%		76%		72%	
t	674	t		t		c	t	t		t	
		91%		97%		55%	45%	76%		82%	
c	690	t		t		c	t	t		t	
		85%		92%		57%	43%	76%		85%	
c	717	t	c	t	c	c	t	c		c	
		52%	48%	64%	35%	67%	33%	71%		90%	
t	735	t		t		c	t	t		t	
		96%		99%		55%	45%	77%		94%	
t	799	t		t		c	t	t		t	
		99%		100%		54%	46%	78%		97%	
a	817	t		t		c	t	t	c	t	

		97%		97%		55%	45%	69%	31%	92%	
t	838	t	c	c	t	c		c		c	t
		63%	37%	58%	42%	87%		76%		62%	38%
-	860	g		g		c	g	g		g	
		99%		97%		54%	43%	74%		81%	
-	867	t		t		c	t	t		t	
		99%		97%		54%	43%	74%		94%	
-	881	t		t		c	t	t	c	t	
		97%		89%		57%	40%	64%	32%	92%	
-	890	t		t		c	t	t	c	t	
		94%		96%		55%	42%	57%	40%	83%	
-	902	t		t		c	t	t		t	
		99%		98%		54%	43%	75%		94%	
-	911	t		t		c	t	t		t	
		95%		89%		57%	41%	71%		88%	
-	913	t		t		c	t	t	c	c	t
		89%		81%		59%	38%	50%	47%	62%	36%
c	929	t		t		c	t	t	c	t	c
		86%		83%		59%	41%	57%	43%	50%	49%
c	941	t		t		c	t	t	c	t	
		88%		87%		58%	42%	66%	34%	80%	
t	945	t		t		c	t	t		t	
		100%		100%		55%	45%	76%		94%	
c	946	t		t		c	t	t		t	
		100%		99%		54%	46%	78%		95%	
c	958	a		a	g	g		g		g	a
		71%		52%	48%	85%		70%		59%	40%
c	961	a		a		t	a	a		a	
		100%		100%		54%	46%	77%		96%	

* Referencia se refiere a la secuencia prototipo. El color azul indica cambios sustantivos en la secuencia nucleotídica en comparación con aquellas identificadas en 2018.

Tabla 2. Cambios de aminoácidos en las secuencias de VSR-A de acuerdo con el genotipo (a) y durante los últimos 4 años (b)

Tabla 2A

Ref	Posición	A		NA1		ON1	
V	69	V		V		V	
		100%		100%		100%	
I	111	T	P	S		S	
		66%	24%	99%		98%	
T	113	A/T	T	T		T	
		50%	50%	98%		89%	
V	131	V		V		V	
		95%		99%		85%	
Q	142	Q		Q	L	L	
		99%		58%	36%	75%	
P	146	P		P		P	
		70%		99%		99%	
V	225	A	V	V		V	
		66%	32%	94%		85%	
L	248	L		L		L	
		98%		99%		91%	
L	158	H		H		H	
		85%		97%		88%	
N	273	N		N		Y	
		99%		71%		90%	
P	274	T	P	L		P	L
		61%	35%	73%		63%	35%
V	279	I	V	V		V	
		55%	43%	99%		90%	
S	280	Y		Y		H	Y
		90%		98%		53%	47%
Y	245	Y		Y		Y	
		98%		97%		98%	
-	288	-		-		E	
		100%		99%		88%	
-	290	-		-		L	
		100%		99%		87%	
-	291	-		-		H	
		100%		99%		86%	
-	295	-		-		S	
		100%		99%		87%	

-	298	-		-		Y	
		100%		99%		83%	
-	299	-		-		P	L
		100%		99%		62%	36%
-	302	-		-		S	
		100%		99%		90%	
P	310	L		L		L	
		87%		92%		75%	
S	314	P		P		L	
		76%		97%		82%	
P	316	P		S		S	
		99%		99%		91%	
T	319	I	T	T		T	
		61%	39%	99%		88%	
P	320	T		T		T	A
		92%		93%		68%	30%
R	321	D	N	K		K	
		55%	20%	96%		93%	

* Referencia se refiere a la secuencia prototipo. El color azul indica cambios sustantivos en la secuencia de aminoácidos

Tabla 2B

Ref	Posición	2018		2019		2020		2021		2022	
V	69	V		V		V		V		V	
		100%		99%		99%		100%		99%	
I	111	S		S		S		S		S	
		97%		98%		100%		95%		94%	
T	113	T		T		T		T		T	I
		71%		83%		92%		82%		63%	36%
V	131	V		V		V		V		V	D
		70%		84%		92%		80%		63%	36%
Q	142	L		L	S	S		S	L	L	
		76%		55%	45%	83%		58%	41%	78%	
P	146	P		P		P		P		P	
		100%		99%		100%		99%		98%	
V	225	V		V		A	V	V		V	
		90%		97%		53%	44%	76%		81%	
L	248	L		L		L		L		L	I
		91%		89%		96%		84%		60%	39%
L	258	H		H		H		H		H	Q
		71%		82%		92%		82%		63%	35%

N	273	Y		Y		H	Y	Y	H	Y	
		97%		97%		53%	44%	69%	30%	92%	
P	274	P	L	P		P		P		P	L
		52%	47%	71%		89%		70%		63%	33%
V	279	V		V		V		V		V	A
		95%		86%		95%		83%		49%	38%
S	280	Y	H	H	Y	H		H		H	Y
		63%	37%	58%	42%	87%		76%		61%	38%
Y	285	Y		Y		Y		Y		Y	
		93%		99%		99%		97%		98%	
-	288	E		E		Q	E	E		E	
		98%		94%		54%	42%	73%		80%	
-	290	L		L		P	L	L		L	
		93%		89%		54%	39%	73%		92%	
-	291	H	L	H		H		H		H	L
		60%	29%	82%		90%		82%		62%	35%
-	295	S		S		P	S	S	P	S	
		96%		89%		57%	40%	64%	31%	91%	
-	298	Y		Y		H	Y	Y	H	Y	
		93%		96%		55%	42%	57%	39%	83%	
-	299	P	L	P	L	P		P		P	
		52%	47%	66%	32%	90%		77%		83%	
-	302	S		S		P	S	S		S	
		99%		98%		54%	43%	74%		93%	
P	310	L		L		P	L	L	P	L	P
		86%		83%		58%	41%	56%	43%	50%	48%
S	314	L		L		P	L	L	P	L	
		88%		87%		58%	41%	66%	33%	79%	
P	316	S		S		P	S	S		S	
		100%		S		53%	45%	73%		94%	
T	319	T		T		T		T		T	I
		90%		83%		96%		76%		58%	34%
P	320	T		T	A	A		A	T	A	T
		70%		50%	48%	84%		69%	29%	58%	39%
R	321	K		K		*	K	K		K	
		100%		100%		54%	45%	77%		95%	

* Referencia se refiere a la secuencia prototipo. El color azul indica cambios sustantivos en la secuencia de aminoácidos

Tabla 3. Cambios de nucleótidos en las secuencias de VSR-B de acuerdo con el genotipo (a) y durante los últimos 4 años (b).

Tabla 3A

Ref	Posición	VSRB		GB3		BA		BA-CC	
c	360	c		t	c	t		c	
		68%		60%	40%	85%		99%	
g	407	g		g		g		c	
		97%		100%		99%		100%	
c	410	c	t	c		c		c	t
		70%	30%	100%		99%		64%	36%
a	412	a		a		t		t	
		98%		100%		96%		100%	
c	414	c		c		t		t	
		86%		99%		90%		94%	
c	470	c		c		a		a	
		76%		100%		100%		100%	
c	504	c		c		c		t	
		79%		99%		97%		99%	
c	591	c		c		c	t	t	
		99%		98%		55%	45%	87%	
t	593	t		t		t		c	
		99%		85%		75%		100%	
c	615	c		c		c		t	
		99%		100%		86%		87%	
a	642	a		a		t	a	c	
		97%		100%		44%	31%	94%	
c	662	c	t	t		c		c	
		66%	34%	86%		98%		93%	
c	681	c		c		t		t	
		99%		100%		80%		93%	
c	711	c		c		c		t	
		98%		100%		98%		93%	
t	733	t		c	t	c		c	
		88%		56%	44%	100%		99%	
c	755	c		c		c		t	
		99%		100%		99%		78%	
a	768	a	t	a		a		a	
		63%	37%	99%		99%		93%	

t	776	t		t		t		c	
		92%		100%		79%		100%	
c	789	c		c		c		t	
		99%		100%		80%		97%	
c	793	c		c		t		t	
		99%		73%		74%		70%	
c	819	c		c		c	a	c	
		97%		98%		63%	37%	100%	
-	841	-		a		a		g	a
		98%		76%		99%		58%	40%
-	864	-		t	c	t		t	
		98%		43%	33%	75%		84%	
-	867	-		t		c		c	
		98%		76%		78%		88%	
-	871	-		c	-	t		t	
		98%		56%	24%	74%		86%	
c	927	c		c		c		t	
		73%		100%		98%		95%	
c	929	c		c	a	c		c	t
		99%		64%	36%	99%		56%	44%
a	935	a		a		a		g	
		85%		99%		99%		93%	
c	938	c		t		t		t	
		83%		100%		100%		100%	
c	940	t	c	t		c		c	
		58%	41%	89%		96%		96%	
c	946	c		t		t		t	
		86%		100%		98%		99%	

* Referencia se refiere a la secuencia prototipo. El color azul indica cambios sustantivos en comparación con los genotipos de VSR-B que no corresponden al genotipos GB3, BA, BA-CC.

Tabla 3B

Ref	Posición	2018		2019		2020		2021		2022	
c	410	c	t	t		t		t		t	c
		60%	40%	84%		84%		73%		57%	43%
c	755	t		t		t		t	c	c	t
		84%		82%		85%		65%	35%	51%	49%
c	771	c		c		c		c		c	t

		98%		100%		99%		87%		62%	38%
c	793	t		t		t		t	c	c	t
		86%		89%		88%		61%	39%	52%	48%
-	864	t		t		t		t		t	c
		87%		87%		91%		70%		55%	45%
-	871	t		t		t		t		t	c
		96%		90%		89%		71%		57%	43%
-	884	t		t		t		t		t	c
		100%		91%		97%		75%		55%	45%

* Referencia se refiere a la secuencia prototipo. El color azul indica cambios sustantivos en la secuencia nucleotídica en comparación con aquellas identificadas en 2018.

Tabla 4. Cambios de aminoácidos en las secuencias de VSR-B de acuerdo con el genotipo (a) y durante los últimos 4 años (b)

Tabla 4A

Ref	Posición	VSRB			GB3		BA		BA-CC	
R	136	R			R		R		T	
		97%			100%		99%		99%	
T	137	T	I		T		T		T	I
		70%	30%		99%		98%		64%	36%
T	138	T			T		S		S	
		97%			98%		94%		92%	
T	143	T			N		N		N	
		87%			98%		99%		99%	
T	157	T			T		K		K	
		76%			100%		100%		100%	
I	198	I			I		I		T	
		98%			85%		74%		100%	
T	221	L	T	P	L		P		P	
		34%	33%	32%	86%		98%		90%	
S	245	S			P	S	P		P	
		87%			56%	44%	99%		97%	
T	252	T			T		T		I	
		99%			100%		99%		78%	
E	256	K	N		K		K		K	
		56%	22%		90%		98%		93%	
I	259	I			I		I		T	
		70%			100%		77%		100%	
H	265	H			H		Y		Y	H
		99%			73%		74%		70%	30%
-	289	-			I	T	I		I	
		98%			43%	33%	75%		83%	
-	290	-			V		A		A	
		98%			76%		76%		88%	
T	310	T			T	N	T		T	I
		99%			64%	36%	98%		55%	43%
Q	311	Q			Q		*		*	
		76%			98%		78%		76%	

* Referencia se refiere a la secuencia prototipo. El color azul indica cambios sustantivos en la secuencia de aminoácidos

Tabla 4B

Ref	Posición	2018		2019		2020		2021		2022	
R	136	T		T		T		T		T	
		99%		99%		99%		99%		100%	
T	137	T	I	I		I		I		I	T
		59%	39%	84%		83%		72%		57%	43%
T	138	S		S		S		S		S	F
		100%		97%		83%		80%		57%	42%
T	143	N		N		N		N		N	
		99%		100%		100%		100%		93%	
T	157	K		K		K		K		K	
		100%		100%		100%		100%		100%	
I	198	T		T		T		T		T	
		100%		100%		99%		100%		100%	
T	221	P		P		P		P		P	L
		95%		96%		93%		74%		57%	43%
S	245	P		P		P		P		P	
		96%		100%		99%		98%		99%	
T	252	I		I		I		I	T	T	I
		84%		81%		85%		65%	35%	51%	49%
E	256	K		K		K		K		K	N
		100%		100%		100%		87%		60%	40%
I	259	T		T		T		T		T	
		100%		100%		99%		100%		100%	
H	265	Y		Y		Y		Y	H	H	Y
		86%		89%		88%		61%	39%	52%	48%
-	289	I		I		I		I		I	T
		87%		87%		91%		70%		55%	45%
-	290	A		A		A		A		A	
		87%		87%		78%		76%		99%	
T	310	T	I	I		I		I		I	
		53%	42%	85%		86%		96%		99%	
Q	311	*		*		*		*		*	
		82%		86%		91%		97%		93%	

* Referencia se refiere a la secuencia prototipo. El color azul indica cambios sustantivos en la secuencia de aminoácidos

REFERENCIAS

1. Graham BS, Anderson LJ. Challenges and opportunities for respiratory syncytial virus vaccines. *Curr Top Microbiol Immunol* 2013;372:391-404.
2. Griffiths C, Drews SJ, Marchant DJ. respiratory syncytial virus: infection, detection, and new options for prevention and treatment. *Clin Microbiol Rev* 2017;30:277-319.
3. Collins PL, Fearn R, Graham BS. Respiratory syncytial virus: virology, reverse genetics, and pathogenesis of disease. *Curr Top Microbiol Immunol* 2013;372:3-38.
4. Cantú-Flores K, Rivera-Alfaro G, Muñoz-Escalante JC, Noyola DE. Global distribution of respiratory syncytial virus A and B infections: a systematic review. *Pathog Glob Health* 2022;116:398-409.
5. Muñoz-Escalante JC, Comas-García A, Bernal-Silva S, Noyola DE. Respiratory syncytial virus B sequence analysis reveals a novel early genotype. *Sci Rep* 2021;11(1).
6. Comas-García A, Noyola DE, Cadena-Mota S, Rico-Hernández M, Bernal-Silva S. Respiratory syncytial virus-A ON1 genotype emergence in central Mexico in 2009 and evidence of multiple duplication events. *J Infect Dis* 2018;217:1089-1098.
7. Efstathiou C, Abidi SH, Harker J, Stevenson NJ. Revisiting respiratory syncytial virus's interaction with host immunity, towards novel therapeutics. *Cell Mol Life Sci* 2020;77:5045-5058.
8. McLellan JS, Ray WC, Peeples ME. Structure and function of respiratory syncytial virus surface glycoproteins. *Curr Top Microbiol Immunol* 2013;372:83-104.
9. Trento A, Galiano M, Videla C, Carballal G, García-Barreno B, Melero JA, et al. Major changes in the G protein of human respiratory syncytial virus isolates introduced by a duplication of 60 nucleotides. *J Gen Virol* 2003;84:3115-3120.
10. Eshaghi A, Duvvuri VR, Lai R, Nadarajah JT, Li A. Genetic variability of human respiratory syncytial virus a strains circulating in Ontario: a novel genotype with a 72 nucleotide G gene duplication. *PLoS One* 2012;7(3):32807.
11. Thampi N, Knight BD, Thavorn K, Webster RJ, Lanctot K, Hawken S, et al. Health care costs of hospitalization of young children for respiratory syncytial virus infections: a population-based matched cohort study. *CMAJ Open*. 2021;9:E948-E956.
12. Li X, Lander W, Antillon M, Bilcke J, Jit M, Beutels P. Health and economic burden of respiratory syncytial virus (RSV) disease and the cost-effectiveness of potential interventions against RSV among children under 5 years in 72 Gavi-eligible countries. *BMC Med* 2020;18:82.

13. Valero N, Larreal Y, Arocha F, Gotera J, Mavarez A, Bermudez J, et al. Etiología viral de las infecciones respiratorias agudas. *Invest Clin* 2009;50:359-68.
14. Lin GL, Drysdale SB, Snape MD, O'Connor D, Brown A, MacIntyre-Cockett G, et al. Distinct patterns of within-host virus populations between two subgroups of human respiratory syncytial virus. *Nat Commun* 2021;12:5125.
15. Dolores A, Stephanie G, Mercedes S NJ, Érica G, Mistchenko AS, Mariana V. RSV reemergence in Argentina since the SARS-CoV-2 pandemic. *J Clin Virol* 2022;149:105126.
16. Kume Y, Hashimoto K, Chishiki M, Norito S, Suwa R, Ono T, et al. Changes in virus detection in hospitalized children before and after the severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 pandemic. *Influenza Other Respir Viruses* 2022;16:837-841.
17. Bermúdez Barrezueta L, Matías Del Pozo V, López-Casillas P, Brezmes Raposo M, Gutiérrez Zamorano M, Pino Vázquez MA. Variation in the seasonality of the respiratory syncytial virus during the COVID-19 pandemic. *Infection* 2022;50:1001-1005.
18. Yuan H, Yeung A, Yang W. Interactions among common non-SARS-CoV-2 respiratory viruses and influence of the COVID-19 pandemic on their circulation in New York City. *Influenza Other Respir Viruses* 2022;16:653-661.
19. Wong-Chew RM, García-León ML, Noyola DE, Perez Gonzalez LF, Gaitan Meza J, Vilaseñor-Sierra A, et al. Respiratory viruses detected in Mexican children younger than 5 years old with community-acquired pneumonia: a national multicenter study. *Int J Infect Dis* 2017;62:32-38.
20. Bose ME, He J, Shrivastava S, Nelson MI, Bera J, Halpin RA, et al. Sequencing and analysis of globally obtained human respiratory syncytial virus A and B genomes. *PLoS One* 2015;10:e0120098.
21. El Saleeby CM, Bush AJ, Harrison LM, Aitken JA, DeVincenzo JP. Respiratory syncytial virus load, viral dynamics, and disease severity in previously healthy naturally infected children. *J Infect Dis* 2011;204(7):996.
22. Lim AY, Cheong HK, Oh YJ, Lee JK, So JB, Kim HJ, et al. Modeling the early temporal dynamics of viral load in respiratory tract specimens of COVID-19 patients in Incheon, the Republic of Korea. *Int J Infect Dis* 2021;108:428.

AGRADECIMIENTOS

Este proyecto se realizó gracias al financiamiento del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) Convocatoria de Investigación Científica Básica (Proyecto CONACYT-A1-S-38080).

ANEXO 1. Evaluación de pérdida de la duplicación parcial del gen G de VSR-A en un modelo in vitro de infección persistente.

INTRODUCCIÓN

Como parte de este proyecto, se realizaron estudios in vitro con el objetivo de identificar cambios en el gen de la proteína G que pudieran ocurrir en pasajes consecutivos de infección por VSR con duplicación parcial de la proteína G.

ANTECEDENTES

El genotipo ON1 de VSR-A tiene una duplicación parcial del gen G; sin embargo, en 2011, en dos pacientes del Hospital Universitario Heidelberg (Alemania), quienes tenían infección persistente con excreción viral durante más de 100 días, presentaron en la secuencia del virus que portaban, mutaciones los cuales conducían a la presentación prematura de codones de paro dando como consecuencia la pérdida de la duplicación parcial del gen G (19). Con base en estas observaciones, se tiene la hipótesis de que una infección persistente de VSR-A ON1 puede conducir a cambios que conduzcan a la pérdida de la duplicación del gen G.

METODOLOGÍA

Cultivo celular. Se empleó la línea celular HEp-2 (ATCC CCL-23) y se cultivó en Medio de Eagle modificado de Dulbecco (DMEM; Sigma Aldrich) suplementado con

5% de suero bovino fetal (SFB; Thermo Fisher Scientific), penicilina y estreptomina al 1% (100 unidades/mL de penicilina G y 100µL de estreptomina) y se incubó a 37°C y 5% de CO₂ en una incubadora Compact Series 5000 (Thermolyne).

Ensayo de infección. El cultivo celular se realizó empleando la línea celular HEp-2, se cultivó en frasco de cultivo de 25 cm² en medio DMEM suplementado con 1% de SFB y penicilina y estreptomina al 1%, a 37°C y 5% de CO₂ hasta confluencia del 90% (2.5x10⁶ células). Posteriormente, se realizó la infección añadiendo una suspensión viral de VSR genotipo NA1, que contaba con la duplicación parcial (virus ON1), a una multiplicidad de infección (MOI) de 0.01 al cultivo celular de HEp-2. El cultivo se incubó por 2 horas a 37°C y 5% de CO₂ y se realizó agitación en intervalos de 15 minutos. Se añadió medio DMEM suplementado con 1% de SFB, penicilina y estreptomina al 1% (100 unidades/mL de penicilina G y 100µL de estreptomina) y se mantuvo en incubación a 37°C y 5% de CO₂ durante 5 días.

Cosecha del virus. Transcurridos los 5 días de infección, se recolectó el sobrenadante en tubo cónico de 15 mL. Se añadieron 650 µL de tripsina (1X TrypLE Express; Gibco) en cada caja de cultivo y se incubó a 37°C y 5% de CO₂ por 12 minutos, posteriormente se procedió a la disgregación mecánica de la monocapa. Las células recuperadas se eluyeron con el sobrenadante y se homogenizó cada tubo con agitador vórtex. Se almacenó la suspensión viral a -80°C. Este proceso se llevó a cabo en 9 ocasiones consecutivas (para un total de 10 cultivos), utilizando una alícuota del cultivo obtenido para realizar los cultivos subsecuentes ajustando el inóculo a una MOI de 0.01 (Figura 1).

Extracción de RNA y RT-PCR. Para la evaluación de la duplicación se tomaron 140 μ L del cultivo recuperado de la disgregación de la monocapa; se realizó lisado de las células y se llevó a cabo la extracción RNA de acuerdo con el protocolo del kit QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN). Se realizó la retrotranscripción del DNA complementario (cDNA) con el uso del kit RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis (Thermo Fisher Scientific).

Cuantificación absoluta de genomas virales. Se usó el cDNA obtenido y se realizó qRT-PCR usando primers específicos (Fw 5'-GGC AAA TAT GGA AAC ATA CGT GAA-3' y Rv 5'-TCT TTT TCT AGG ACA TTG TAY TGA ACA-3') dirigidos a la región intergénica entre los genes P y M del VSR. Los valores de umbral de ciclo (C_T) se midieron utilizando el sistema de detección de PCR en tiempo real CFX96 Touch (Bio-Rad). Los valores umbral se establecieron de acuerdo con las recomendaciones del fabricante, esto para evaluar la carga viral del pasaje y con ello se ajustará el volumen restante y se realizó la infección subsecuente a MOI de 0.01.

Los estándares de cuantificación consistieron en diluciones en serie de un plásmido que contenía la región objetivo de los cebadores. Los valores de C_T se midieron por duplicado para cada dilución y se calculó un C_T promedio. La concentración se evaluó utilizando el C_T promedio obtenido de ensayos duplicados de qRT-PCR. Cada muestra de C_T promedio se convirtió en número de copias usando la relación lineal para el C_T estándar frente a \log_{10} de la concentración estándar.

Infección persistente. Para realizar el ensayo de infección persistente, se realizó una primera infección con stock viral como se describe en las secciones anteriores,

a partir de la cosecha de virus de la primera infección, se extrajo el RNA y se realizó la determinación de número de copias virales. A partir de este número se ajustó el volumen con PBS para obtener una suspensión viral con cantidad suficiente para realizar una infección subsecuente a multiplicidad de infección de 0.01, se realizó la infección, cosecha, extracción y cuantificación de este subcultivo. Este procedimiento se realizó por duplicado y de forma subsecuente hasta obtener 10 subcultivos secuenciales.

Evaluación de la duplicación. Finalmente, para analizar la presencia o pérdida de la duplicación, las muestras de RNA de cada cultivo se utilizaron para amplificar un fragmento del gen G. Los productos de amplificación se sometieron a electroforesis en gel de agarosa y se evaluó el tamaño del amplicón para identificar la presencia o ausencia de la duplicación parcial. Los productos de PCR fueron sometidos a secuenciación por el método de Sanger en el Laboratorio Nacional de Biotecnología Agrícola, Médica y Ambiental (LANBAMA, IPICYT).

Fig. 1

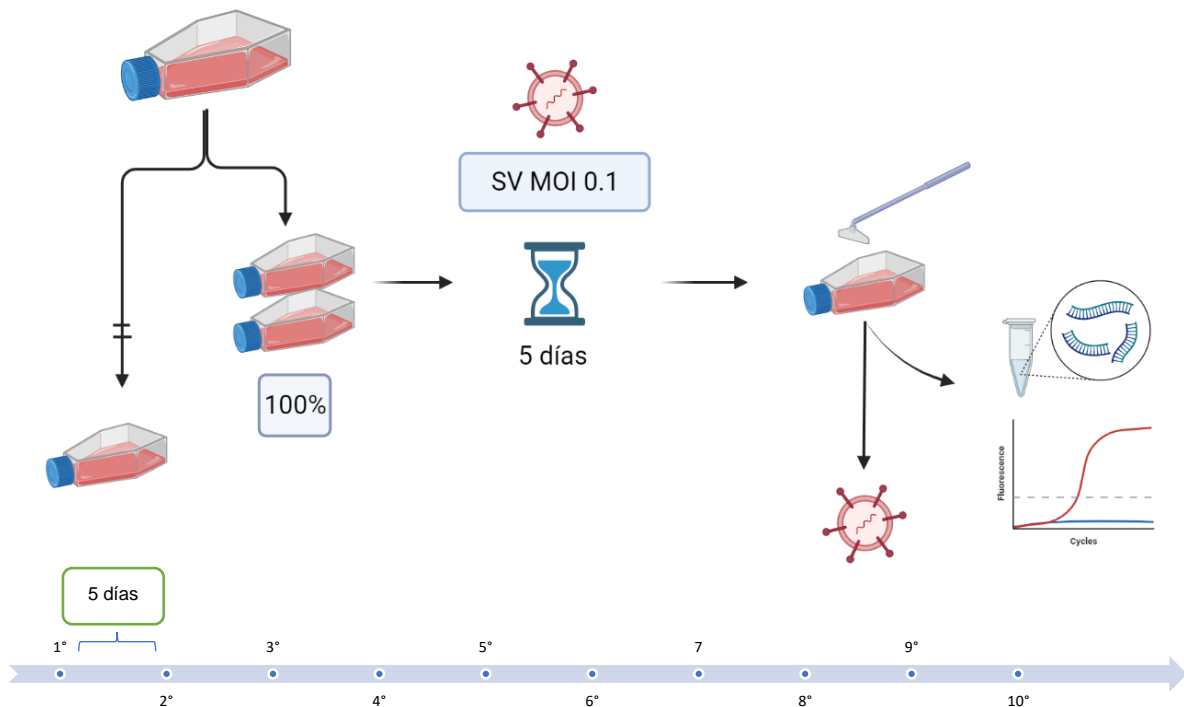


Figura 1. Representación del procedimiento para realizar el cultivo e infección seriada por VSR, la cual comprendió un total de 10 muestras seriadas (cultivo original y 9 pasajes), cada una hecha con duplicado.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Cada uno de los cultivos seriados mostró evidencia de efecto citopático y se detectó la presencia de VSR a través de RT-PCR en tiempo real. La concentración viral en los duplicados en cada uno de los tiempos fue comparable (Tabla 1). Se amplificó un fragmento del gen G mediante RT-PCR encontrando en todos los cultivos que, de acuerdo al tamaño del amplicón, corresponde al gen con la duplicación parcial. Para corroborar esto, se realizó secuenciación de los productos de amplificación.

Tabla 1. Concentración de partículas virales de las infecciones seriadas.

Infección	Partículas virales/μL (log₁₀)	Promedio partículas virales/μL(log₁₀)
1	301.8 162	231.9
2	39.6 189.3	114.4
3	3.7 4.1	3.9
4	0.96 0.78	0.87
5	1.1 1.5	1.3
6	1.2 2.5	1.92
7	1 0.78	0.9
8	4.6 4.8	4.71
9	8.1 9.1	8.6
10	7.6 7.7	7.63

Se obtuvieron las secuencias correspondientes a las infecciones seriadas, encontrando que, hasta la décima infección consecutiva, estaba presente la duplicación del gen G. Además, no se encontró ningún polimorfismo en el fragmento del gen G analizado (Figura 2).

Los resultados de este experimento mostraron que, en una infección seriada (hasta 10 pasajes), la duplicación parcial del gen G en una cepa de VSR ON1 es estable. Sin embargo, es posible que, bajo condiciones distintas al cultivo celular, como lo es en la replicación in vivo en el organismo humano, pudiera registrarse una dinámica distinta. También, es posible que una infección más prolongada, con pasajes seriados a más largo plazo, pudieran asociarse a cambios en la secuencia genética del virus, incluyendo cambios en la región con duplicación parcial.

Fig. 2

