

# INCIDENCIA Y CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DEL VIRUS SINCITAL RESPIRATORIO EN ASTURIAS

M. Gómez Novo, S. Melón, M. E. Álvarez-Argüelles, J. A. Boga, Z. Pérez-Martínez, M. J. Menéndez-Díaz, M. Sánchez-Araujo.  
Servicio de Microbiología, Hospital Universitario Central de Asturias, Oviedo.



## INTRODUCCIÓN

El Virus Sincital Respiratorio (VSR) es uno de los principales agentes etiológicos de las infecciones respiratorias agudas (IRAs). El VSR subtipo A está asociado a cuadros clínicos más severos que los causados por el VSR subtipo B. Recientemente, se han descrito nuevos genotipos que han ido desplazando a los anteriores, como ocurre con la cepa VSR A Ontario-1 (ON1).

## OBJETIVO

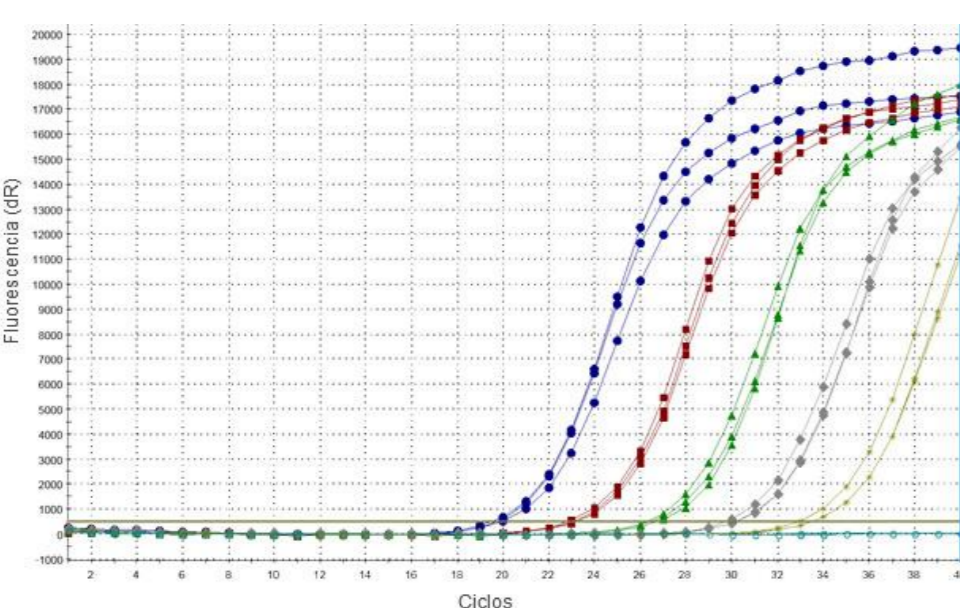
Conocer la circulación y estacionalidad de los subtipos de VSR y su caracterización molecular.

## MUESTRAS Y MÉTODOS

- **Periodos de estudio:** Temporada 1 (T1) [Octubre 2014 – Abril 2015] / Temporada 2 (T2) [Noviembre 2015 – Febrero 2016]
- **Muestras:** 341 (T1) y 523 (T2) muestras respiratorias procedentes de pacientes positivos para VSR.

### • Detección de VSR

- **Inmunofluorescencia directa**
- **Cultivo celular (MRC5, MK2, MDCK)**
- **Detección genómica**
  - **Extracción:** Extractor automático Magnapure (Roche)
  - **Amplificación:** PCR a tiempo real múltiple (IA, IB, VSR)
    - **Reactivo:** TaqMan Fast Virus 1-Step Master Mix (ABI)
    - **Cebadores/Sonda:** (Tabla 1)
    - **Perfil térmico:**



### • Subtipado de VSR (A y B)

- PCR a tiempo real sencilla para detectar los dos subtipos (VSRA y VSRB) con los cebadores y la sonda descritos en la Tabla 1 y el mismo perfil térmico que en la detección.

### • Genotipado de VSR A

- **Extracción:** Extractor automático Magnapure (Roche)
- **Amplificación:** Retrotranscriptasa-PCR
  - **Reactivo:** Titan One Tube RT-PCR System (Roche)
  - **Cebadores:** VSR-G2-A-F y VSR-G2-A-R (Tabla 1)
  - **Perfil térmico:**

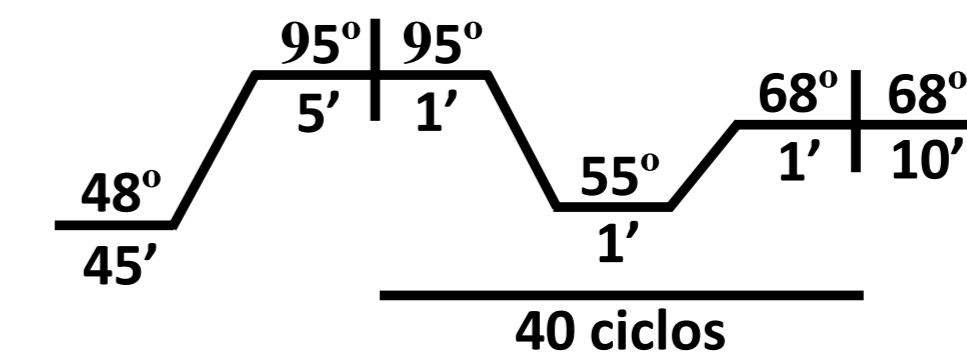


Tabla 1. Cebadores y sonda usados para la detección, genotipado y subtipado de VSR.

Virus	Nombre	Secuencia (5'-3')	Técnica
VSR	VSRA-TR-S	GCCAGTGGCATTGCTGTAT	Detección
	VSRA-TR-A	CTGACTACGGCCTTGTGTTGT	
	VSRB-TR-S	GCAAGTGGTATAGCTGTAT	
	VSRB-TR-A	CTGACTACAGCTTGTGTTGT	
	VSR-VIC	AGAAGTGAACAAGATCAA	
VSR	VSR-G2-A-F	GAAGTGTTCAACTTTGTACC	Genotipado
	VSR-G2-A-R	CTGCAATTCTGTTACAGCAT	

- **Revelado:** Análisis en una electroforesis gel de agarosa al 2%
- **Purificación amplicón (755pb):** Montage DNA Gel Extraction Kit (Millipore)
- **Secuenciación amplicón:**
  - **Reactivo:** BigDye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit (ABI)
  - **Cebadores:** VSR-G2-A-F ó VSR-G2-A-R (Tabla 1)
- **Comparación** con secuencias análogas de aislados representativos (Clustal Omega EBI)

## RESULTADOS

La distribución de los subtipos de VSR en cada temporada se observa en la Figura 1. En la Tabla 2 y en la Figura 2 se refleja la distribución por edades de ambos subtipos en cada temporada.

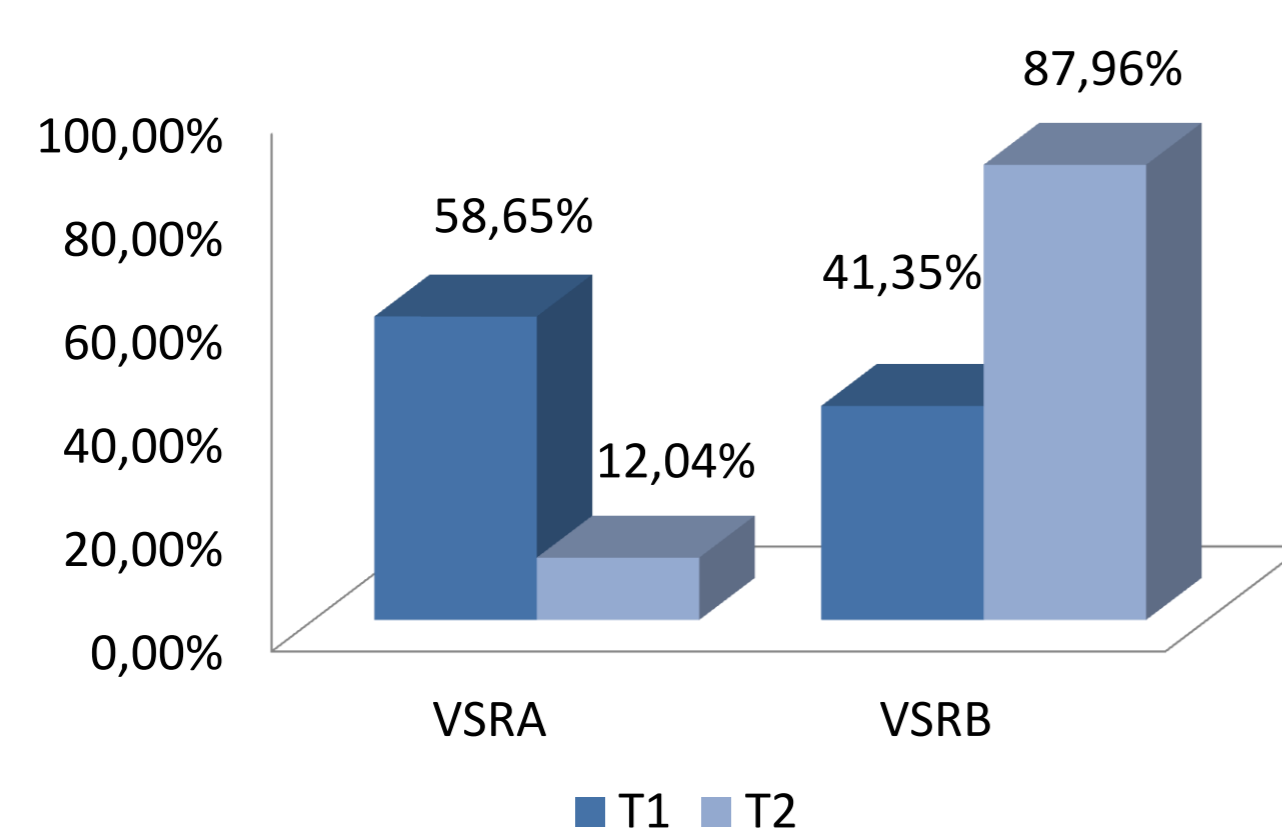


Figura 1: Porcentaje de muestras positivas de VSRA y VSRB en las dos temporadas.

Tabla 2: Distribución por edades en las dos temporadas.

	VSRA	VSRB	Total	
T1	<5 años	42 (68,85%)	43 (100%)	85 (81,73%)
	5-15 años	1 (1,64%)	0	1 (0,96%)
	16-70 años	10 (16,39%)	0	10 (9,62%)
	>70 años	8 (13,1%)	0	8 (7,69%)
T2	<5 años	5 (38,46%)	56 (58,95%)	61 (56,48%)
	5-15 años	1 (7,69%)	7 (7,37%)	8 (7,41%)
	16-70 años	3 (23,08%)	19 (20,0%)	22 (20,37%)
	>70 años	4 (30,77%)	13 (13,68%)	17 (15,74%)

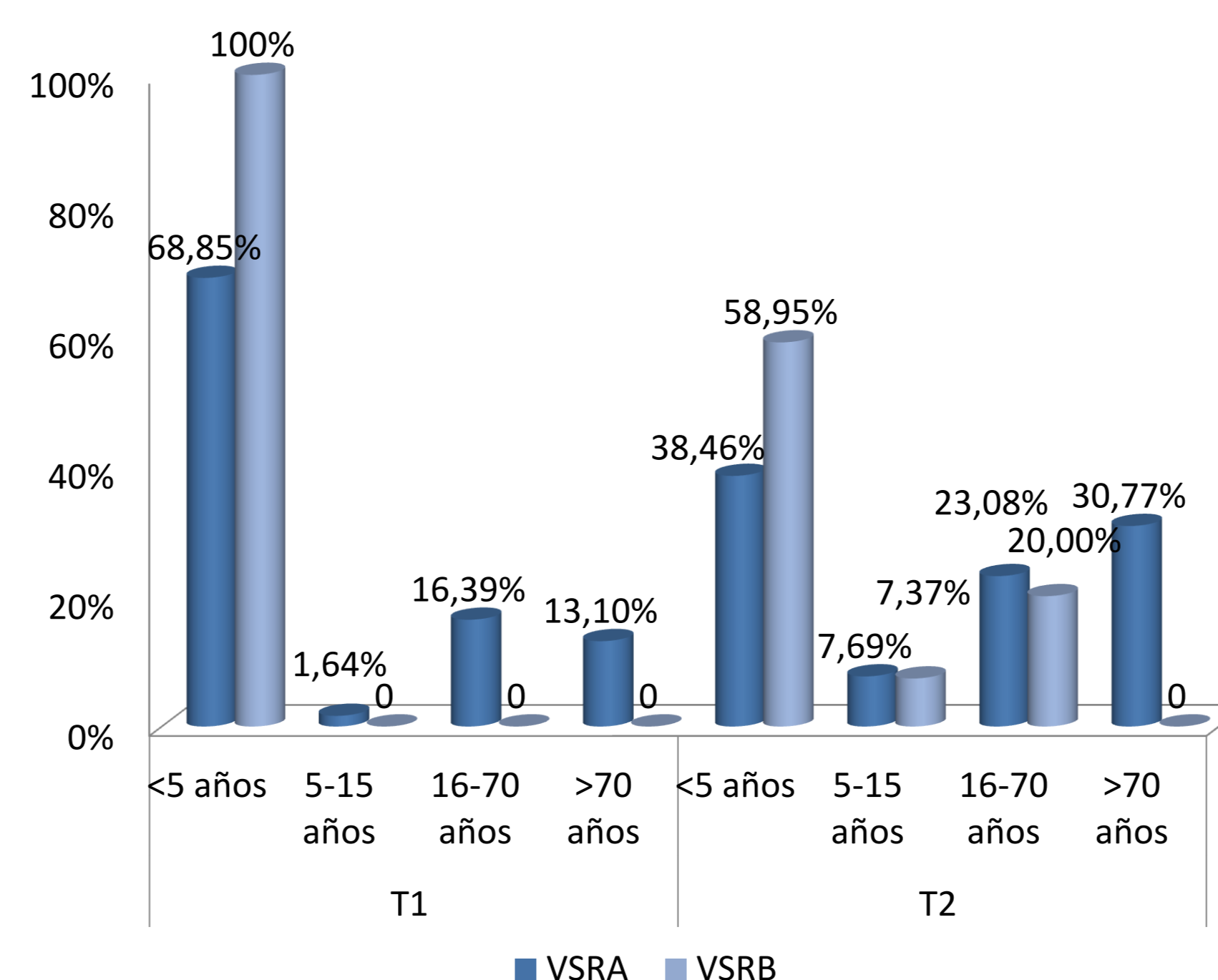


Figura 2: Distribución por edades de los subtipos de VSR en cada temporada

El análisis filogenético de una cepa representativa de VSRA aislada en la T1 (VSRA/Ast/2015) demostró que ésta era filogenéticamente similar a la cepa ON1 (Fig. 3)

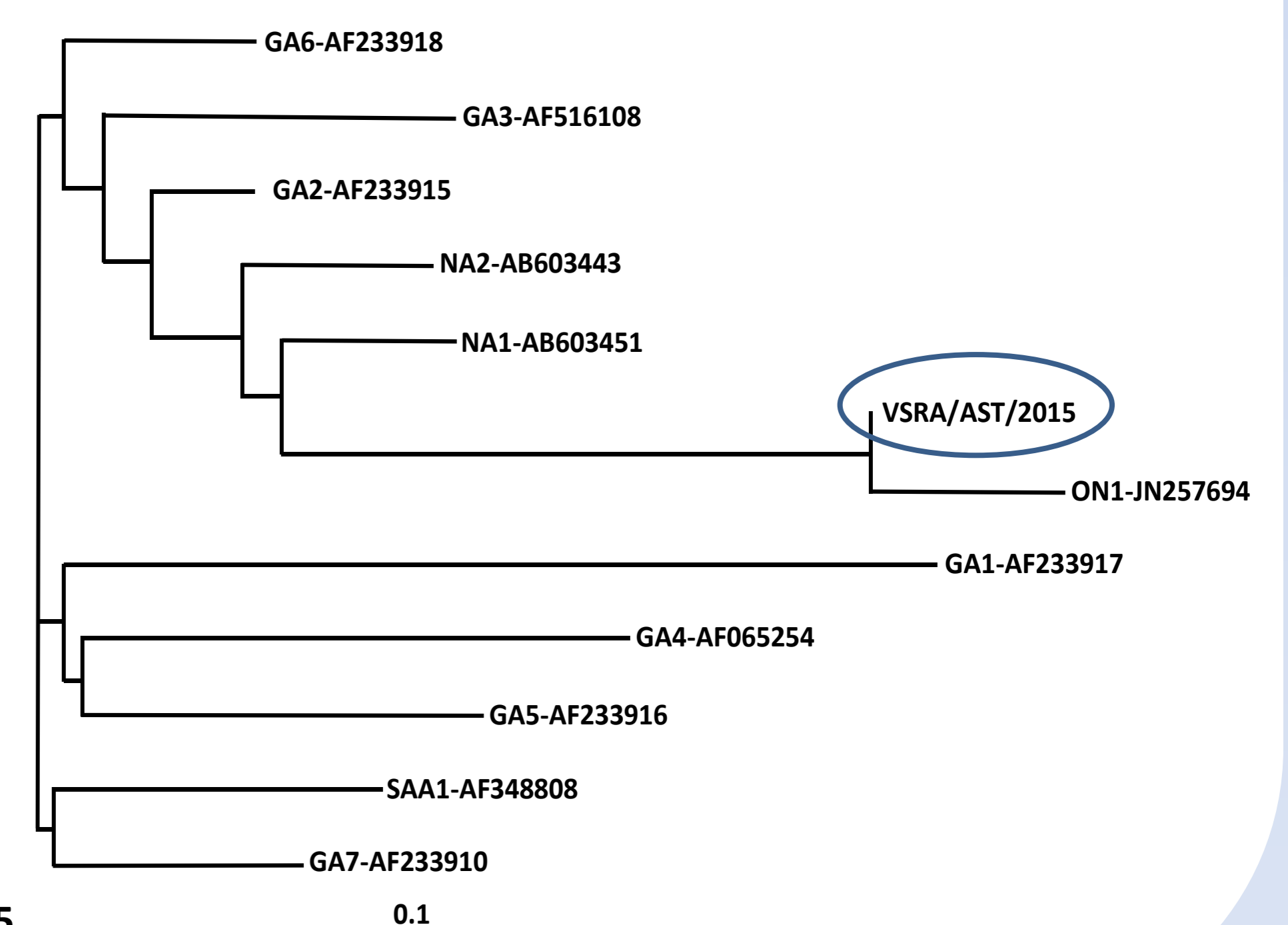


Figura 3. Análisis filogenético de la cepa VSRA/Ast/2015.

## CONCLUSIONES

- Ambos subtipos del VSR circularon de forma simultánea durante la T1. Sin embargo, en la T2 circuló mayoritariamente el tipo B.
- Mientras que en la T1, el subtipo B sólo fue aislado en niños menores de 5 años, en la T2 se encontró en todos los grupos de edad.
- Durante la T1, circuló la nueva cepa VSR-A ON1.