

Rev Biomed 1999; 10:77-84.

Variabilidad antigénica de cepas de virus sincitial respiratorio aisladas en ciudad de la Habana mediante ELISA utilizando anticuerpos monoclonales.

Artículo Original

Greheze González, Clara E. Savón, Reynel Cancio, Angel Valdivia, Danay Chacón, Johandra Míguez, Angel Goyenechea.

Departamento de Virología, Lab. de Virus Respiratorios, Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kouri", La Habana, Cuba.

RESUMEN.

Se realizó el estudio de caracterización y análisis de la variabilidad antigénica con un panel de 10 anticuerpos monoclonales que reconocen a epítopes lineales de la proteína G, a 15 cepas de Virus Sincitial Respiratorio aisladas en dos brotes ocurridos en Ciudad Habana entre los meses de octubre a enero (1994-1995) y octubre (1996), respectivamente. Para ello se utilizaron dos cepas de referencia: la Cepa Long y la Cepa A/Mon/3/88. El ELISA fue el método empleado para los ensayos. Los resultados mostraron la variabilidad de la proteína G entre los aislamientos y su relación antigénica con la cepa prototipo Long, además de confirmar que todas las cepas que habían circulado en estos períodos correspondían antigénicamente al Subgrupo A. (*Rev Biomed 1999; 10:77-84*)

Palabras clave: Virus sincitial respiratorio, infección respiratoria aguda.

SUMMARY.

Antigenic variance of strains of the respiratory sincitial virus isolated in Habana city by eans of ELISA using antibodies.

15 strains of the respiratory sincitial virus were isolated in two outbreaks when occurred in Habana city during the months of October to January (1994-1995) and in October 1996. The study of characterisation and analysis of the antigenic variability was carried out with a panel of 10 monoclonal antibodies which recognise lineal epitopes of the G protein. Two reference strains were used: the Long strain and the A/Mon/3/88 strain. The ELISA method was used for the tests. The results showed the variability of the G protein between the isolations and their antigenic relation with the Long prototype strain, besides confirming that all the strains circulating during those outbreaks, antigenically corresponded to the A subgroup. (*Rev Biomed 1999; 10:77-84*)

Solicitud de sobretiros: MSc. Greheze González. Depto. de Virología, Lab. de Virus Respiratorios, Instituto de Medicina tropical "Pedro Kouri", Ciudad de la Habana, Cuba. E-mail : greg@ipk.sld.cu

Recibido el 2/Julio/1998. Aceptado para publicación el 25/Sep./1998.

Este artículo esta disponible en <http://www.uady.mx/~biomedic/rb991022.html>

Vol. 10/No. 2/Abril-Junio, 1999

G González, CE Savón, R Cancio, A Valdivia, D Chacón, J Míguez, A Goyenechea.

Key words: Respiratory syncytial virus, acute respiratory disease.

INTRODUCCIÓN.

El Virus Sincitial Respiratorio (VSR) es el patógeno más importante del tracto respiratorio bajo en lactantes y niños pequeños (1). A él son atribuibles el 50% de las bronquiolitis y el 25% de las neumonías en esta etapa de la vida.

Una característica poco frecuente de este virus es la posibilidad de ocasionar infecciones de repetición en algunos individuos (2). Se plantea que este fenómeno se debe a dos causas fundamentales: una respuesta inmune inadecuada del hospedero y a la variabilidad antigénica de este virus.

Anderson y cols. (3) y Mufson (4), en 1985 determinaron la existencia de 2 subgrupos antigénicos (A y B) de acuerdo con la reactividad de diferentes aislamientos frente a un panel de Anticuerpos Monoclonales (AcM) y es a partir de ese momento que comienzan los estudios sobre variabilidad antigénica de este virus, tanto entre subgrupos como dentro del mismo subgrupo (5-8).

La variabilidad antigénica y genética de las diferentes cepas aisladas es potencialmente importante, tanto para el desarrollo de vacunas como para el conocimiento de las características clínico epidemiológicas y los estudios de estacionalidad.

Una de las cuestiones más importantes sobre la epidemiología de VSR es el modo y los factores que determinan su evolución natural (9). Como primera aproximación a estos problemas nos planteamos analizar los virus que circularon durante dos brotes en Ciudad Habana en los meses de Octubre a Enero de 1994 - 1995, y en Octubre de 1996, como un paso preliminar en la caracterización de estas cepas.

Nos centramos en el análisis de la proteína G por un doble motivo: 1) presenta el mayor grado de variabilidad entre los productos génicos de VSR, por tanto, en el estudio de los diferentes aislamientos, la comparación entre ellos tendrá el mayor poder discriminatorio. 2) Presenta el mayor grado de

divergencia antigénica entre los aislamientos de VSR, lo que sugiere que la presión inmune ejercida sobre la proteína G podría ser un factor determinante en la selección de nuevas variantes.

MATERIALES Y MÉTODOS.

Virus.

Se utilizaron 15 cepas de VSR que fueron aisladas en Ciudad Habana durante dos brotes, 11 correspondientes al brote de Octubre de 1994 a Enero de 1995 y 4 en Octubre de 1996, clasificadas dentro del subgrupo antigénico A, por las técnicas de Inmunofluorescencia Indirecta (IFI) y la Reacción en Cadena de la Polimerasa (RCP) (10,11). Todas provenían de niños menores de 1 año con diagnóstico clínico de bronquiolitis. Como cepas prototipos del subgrupo A se emplearon la Cepa Long, donada por la Dr. Monica Grandien del Centro para el Control de Enfermedades de Estocolmo, Suecia y la cepa A/Mon/3/88, donada gentilmente por el Dr. J.A.Melero del Centro de Biología Fundamental del Instituto de Salud Carlos III, Madrid, España. Además como control de los ensayos se utilizó una cepa del grupo B procedente de Estocolmo, Suecia.

Los aislamientos se realizaron en tubos de cultivo con células de línea HEp-2 (carcinoma laríngeo humano, American Type Culture Collection, ATCC: L-23) y las cepas fueron cultivadas en frascos de 75 cm³ hasta la observación de un claro efecto citopático (formación de sincitios), desprendidas posteriormente con policías de goma y se procedió a la obtención de los extractos virales.

Preparación y análisis de los extractos virales.

Los cultivos de células infectados con las cepas de VSR, se centrifugaron durante 20 minutos a 2000 rpm a 4°C. El sedimento se lavó dos veces resuspendiendo en PBS, posteriormente se le añadió 400 µL de tampón de lisis, se le aplicó vortex dos veces y el material no soluble se eliminó por centrifugación a 10 000 rpm por 10 minutos.

Ultramicro-ELISA para virus sincitial respiratorio.

La concentración de proteínas de los diferentes extractos virales (200-250 µg/mL) fue determinada mediante el método de Lowry (12).

Anticuerpos Monoclonales (AcM).

Fueron utilizados un total de 10 AcM dirigidos a epítopes lineales de la proteína G empleados a partir de líquidos ascíticos.

1 específico de subgrupo A (021/19G); 1 dirigido a un epítipo conservado (021/1G) 4 dirigidos a epítipes variables de la cepa Long (25G, 63G, 68G y 78G), 3 específicos de la cepa A/Mon/3/88 (021/5G, 021/8G y 021/9G) y 1 grupo B específico (2B/G) todos obtenidos en el Centro de Biología Fundamental de Madrid, España.

ELISA.

Se siguió la misma metodología reportada por Palomo y colaboradores en 1990 (13) con algunas modificaciones. Las placas de microtitulación de 96 pocillos fueron fijadas durante 18 h a 4°C con 50 µL de los extractos virales y las cepas de referencia diluidos en PBS a una concentración de 0.33 a 0.5 µg/mL. Posterior a este paso los sitios libres fueron saturados con 1% de suero fetal bovino (SFB) por 30 min a Temperatura Ambiente (TA). Los anticuerpos monoclonales, diluidos en PBS conteniendo SFB al 0.1%, fueron incubados en la placa de reacción durante 1 h a 37°C. Se adicionó el conjugado anti IgG de ratón marcado con biotina a una dilución de 1:1000 en el mismo diluyente e incubada 1 h a igual temperatura. Finalmente se agregó el conjugado estreptavidina peroxidasa (dilución 1:2000) 30 min. a TA. Entre los subsecuentes pasos del ensayo los pocillos fueron lavados con agua corriente con tween al 0.05% 5 veces. La reacción fue revelada con una mezcla de *o*-fenilendiamina con peróxido de hidrógeno en Buffer fosfato-citrato de 5 a 10 min a TA. La absorbancia a 492 nM fue determinada en un espectrofotómetro de la serie Titertek Multiscan (Flow Laboratories, Inc.). Los resultados fueron expresados en porcentos de actividad con respecto a la respuesta

observada para las cepas de referencia, la reactividad se clasificó en muy baja o ninguna (por debajo del 25%), moderada (entre el 25% - 50%) y alta (por encima del 50%).

RESULTADOS.

Reactividad de los virus aislados frente al panel de AcM:

Frente a un AcM específico de subgrupo A.

Para todas las cepas aisladas en ambos brotes frente al AcM 021/19G, se presentó un patrón de reactividad por encima del 50%. No fue observada reactividad con la Cepa B utilizada como control en este ensayo, por lo que estos aislamientos pertenecen antigénicamente al subgrupo A.

Frente a un AcM dirigido a un epítipo conservado.

Para todas las Cepas aisladas en ambos brotes y para la Cepa B frente al AcM 021/1G los valores de reactividad sobrepasaron el 50% de lo que se deduce que este epítipo está altamente conservado para todos los aislamientos de RSV estudiados.

Frente a los AcM dirigidos a epítipes variables de la Cepa Long.

En las figuras 1 y 2, se muestra que para los epítipes 25G, 68G y 78G, las cepas del brote 1 muestran un amplio y variado patrón de reactividad que va del 30 al 100% y observamos un patrón uniforme en el caso del brote 2, donde la reactividad alcanza el 100% para todas las cepas estudiadas. La reactividad de la Cepa A/Mon/3/88 no sobrepasa el 20%.

Como podemos observar para el epítipo 63 G los patrones de reactividad aunque diferentes, no alcanzan el 25% para ninguna de las cepas estudiadas.

Frente a AcM dirigidos a epítipes específicos de la Cepa A/Mon/3/88

En este grupo de tres epítipes, la reactividad

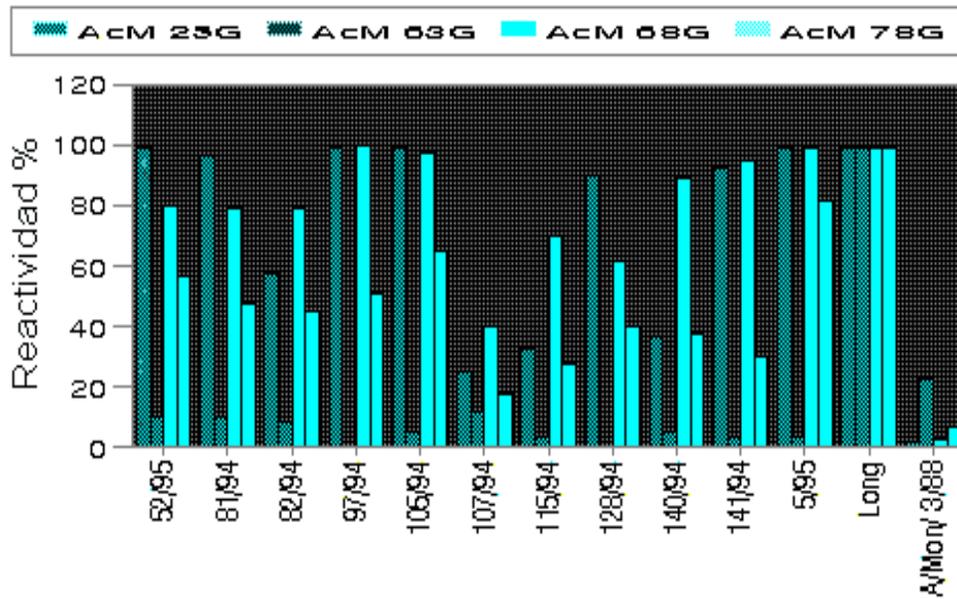


Figura1.- Reactividad de las Cepas del brote 1 frente a epítopes variables de la Cepa Long.

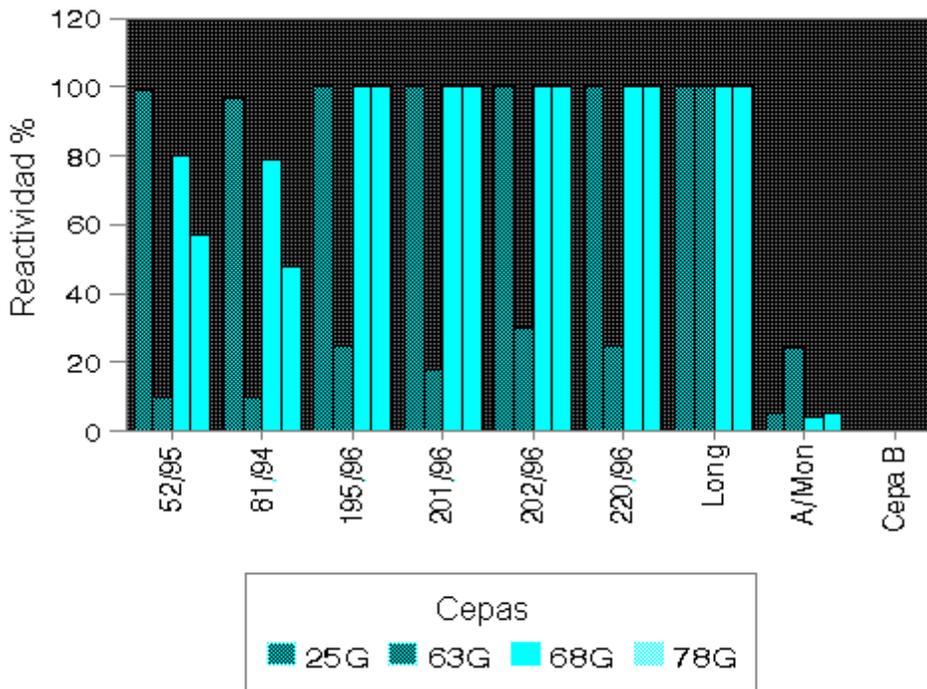


Figura 2.- Reactividad de las Cepas del brote 2 frente a los epítopes variables de la Cepa Long.

Ultramicro-ELISA para virus sincitial respiratorio.

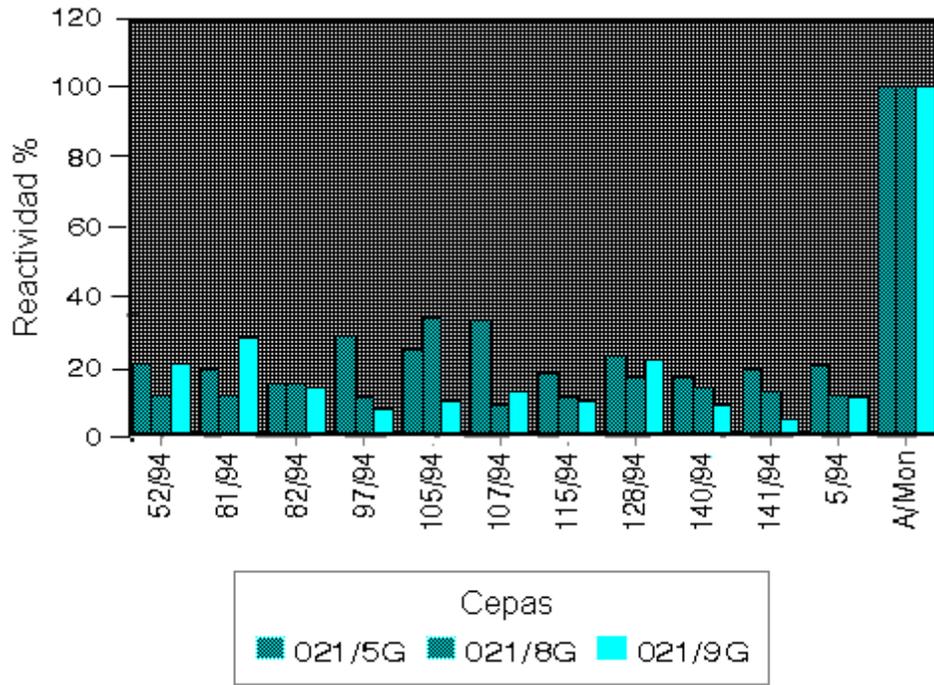


Figura 3.- Reactividad de las Cepas del brote 1 frente a AcM específicos a la Cepa A/Mon.

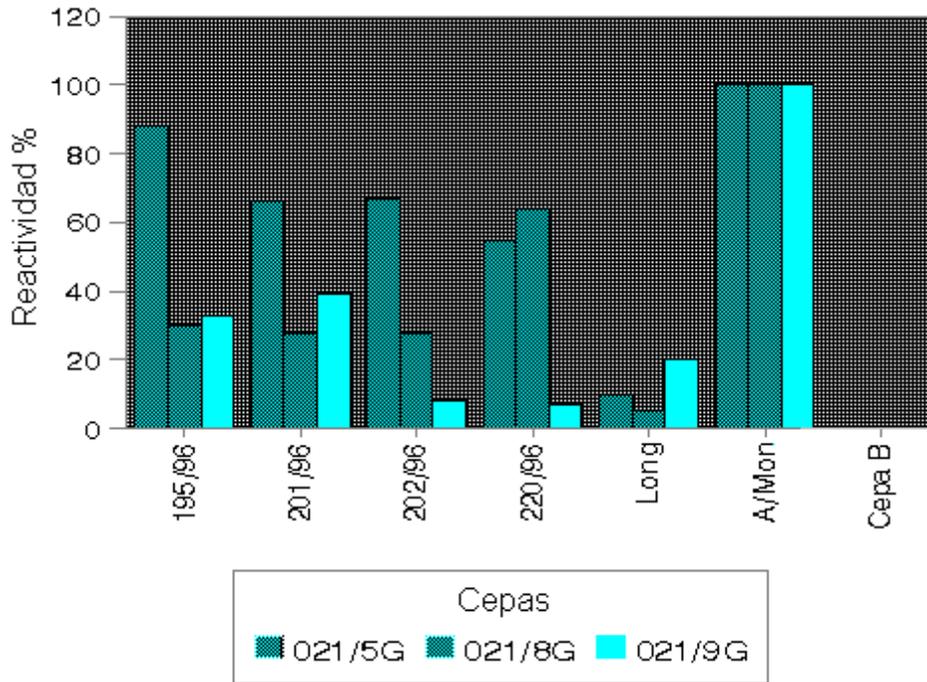


Figura 4.- Reactividad de las Cepas del brote 2 frente a AcM específicos a la Cepa A/Mon.

debe ser máxima para la Cepa frente a la cual fueron generados los AcM, el patrón reactivo en ambos brotes aunque variable se considera bajo (figuras 3 y 4). Obsérvense los altos valores de reactividad para las Cepas del brote 2 frente al AcM 021/ 5G.

Frente a un AcM específico de subgrupo B (2B/G).

Ninguna de las cepas mostró reactividad frente a este AcM, sólo la cepa B empleada como control del ensayo, cuyo porcentaje de actividad alcanzó el valor 100.

Cuando se enfrentó la cepa B a todos los AcM utilizados en este estudio a excepción del epítipo 1G y al AcM 2B/G, no se obtuvo reactividad en ningún caso.

DISCUSIÓN.

Con el desarrollo de paneles de AcM contra la glicoproteína G de VSR, se ha podido establecer la existencia de 2 subgrupos antigénicos A y B, sugiriendo la existencia de múltiples líneas evolutivas.

En este estudio se utilizaron un total de 10 AcM que reconocen diferentes epítipos lineales de la glicoproteína G. Para el epítipo que fue reconocido con un AcM específico de subgrupo A, todas las cepas de ambos brotes tuvieron una elevada reactividad (por encima del 50%) frente a este AcM poniendo de manifiesto que todos pertenecen al subgrupo antigénico A; lo cual había sido planteado por Chacón y col. (10) y Valdivia y col. (11), por diferentes técnicas tales como la IFI y RCP. El patrón de reactividad osciló del 70 al 100%.

Para la Cepa B no hubo reactividad, evidenciando la ausencia de este epítipo en dicha cepa.

El AcM que se utilizó para el estudio del epítipo conservado fue el 021/1G, como era de esperar, todas las cepas en ambos brotes mostraron una reactividad superior al 25%

incluyendo la Cepa B.

En la estructura de la glicoproteína G, existen sólo dos regiones altamente conservadas que se corresponden con las regiones hidrofóbicas entre los aminoácidos 38 y 66 que funciona como región de anclaje transmembrana y la otra región que presenta 4 residuos de cisteína agrupados entre las posiciones 176 y 186 de la molécula (14,15). Esta última está implicada en la interacción del virus con el receptor celular (16) y tiene escasos sitios de N-glicosilación que es uno de los argumentos planteados como causa de variabilidad antigénica (13,17,18).

En nuestro estudio, la reactividad para tres de los epítipos variables de la Cepa Long (25G, 68G y 78G) fue extensa y diversa (del 30 al 100%). estas diferencias podrían resultar de la organización estructural y genética de las glicoproteínas G de los diferentes virus aislados, la cual presenta características estructurales únicas (19). Un rasgo peculiar y conservado de la molécula G de VSR es el alto contenido de serina, treonina y prolina, las cuales determinan la extensiva glicosilación por cadenas de azúcares, además mucho de los epítipos reconocidos por AcM anti proteína G dependen precisamente de la incorporación de oligosacáridos en la proteína madura para su reactividad (13). Estos epítipos pueden estar presentes sólo en algunos virus del mismo subgrupo y están formando parte de áreas antigénicas solapantes que se localizan en el tercio C-terminal de la proteína G (16,20).

Como observamos en los resultados, la reactividad frente al epítipo 63G no rebasa el 10% en el brote 1, y no es muy elevada en el caso del brote 2 debido probablemente a la pérdida o modificación de este epítipo. Al hacer un análisis molecular en todas las cepas del brote 1 quedó esclarecido efectivamente había una mutación que impedía el acceso del AcM a esta región y por consiguiente su reactividad (García-Barreno,1996, datos no publicados).

En otros virus, como por ejemplo el de la Influenza, vemos que existen variantes resistentes

Ultramicro-ELISA para virus sincitial respiratorio.

al reconocimiento de Ac que contienen pequeñas mutaciones que afectan el reconocimiento de epítopes por Ac selectivos (21). Si este fuera el caso de estas cepas, podría implicar que pequeñas mutaciones pueden cambiar la antigenicidad de la proteína G debido a la estructura química de la molécula G madura en la cual cadenas específicas de oligosacáridos bloquean la unión al AcM como es el caso de la hemaglutinina en el virus de la Influenza (22). En cualquier caso parece que pequeñas mutaciones pueden producir alteraciones significativas en la antigenicidad de la proteína G.

En cuanto al patrón de reactividad uniforme para las cepas del brote 2, podemos argumentar que estas cepas fueron aisladas todas en el mismo mes (octubre 1996), en localidades cercanas, de lo que se pudiera deducir que era la misma cepa que circuló en diferentes individuos, mientras que las cepas del brote 1 fueron aisladas de octubre a febrero, o sea, tuvieron una circulación más amplia y por ello un patrón de reactividad más variado.

Con el objetivo de comparar la variación antigénica entre las cepas aisladas en los brotes referidos y una cepa aislada en otra región del mismo continente, se utilizó la cepa A/Mon/3/88 como cepa adicional de referencia, de la cual se había hecho un estudio completo de caracterización genética y secuenciación del gen G (9).

Respecto a la reactividad frente a este grupo de AcM, para las cepas del brote 1 no superó el 30%, en cuanto al brote 2 para uno de los tres AcM utilizados la reactividad fue variada pero elevada en todos los casos. Para este AcM en específico los ensayos fueron repetidos obteniéndose resultados similares; realmente en la literatura consultada no encontramos una respuesta a este fenómeno, consideramos que pudiera deberse a cambios estructurales en estas cepas que conllevan a este tipo de reactividad.

No se observó reactividad cruzada de ninguna de las cepas contra el AcM de grupo B, ni la cepa B fue reconocida por ninguno de los AcM de A, obviamente era lo esperado al pertenecer a subgrupos antigénicamente diferentes.

Si analizamos los patrones de reactividad de forma conjunta podemos afirmar que las cepas de ambos brotes están antigenicamente relacionadas con la cepa Long a pesar de la variación que éstas presentan, es decir, son similares pero no idénticas, esta similitud ha sido reportada también por ensayos de restricción enzimática (11).

Muchos estudios han reflejado la semejanza de diferentes aislamientos con la cepa prototipo Long (19,23), este hallazgo ha sugerido pequeñas divergencias en la evolución representada por pequeños cambios antigénicos (tipo drift) que ocurren por algún tiempo en la estructura de la proteína G entre y dentro de los subgrupos (23).

El significado biológico de la variabilidad dentro del subgrupo en todos los estudios hasta la fecha es desconocido. Es posible que la respuesta inmune a la glicoproteína G no sea sólo específica entre los dos subgrupos (24), sino a cepas dentro del mismo subgrupo. Si esto sucede, esta especificidad pudiera explicar el fenómeno de infecciones a repetición y tendría además una implicación importante para el desarrollo de vacunas. Igualmente si la inmunidad responde a cepas que están dentro del mismo subgrupo esto podría ser un factor determinante de los patrones de ocurrencia para las epidemias de VSR que ya no solamente pudieran diferir en la severidad entre subgrupos A y B, sino entre cepas del mismo subgrupo (19).

REFERENCIAS.

- 1.- McIntosh K, Chanock R M. Respiratory syncytial virus, En Fields BN ed. Virology. New York: Raven Press, 1985. p.1285 - 304.
- 2.- Cane PA, Pringle CR. Molecular epidemiology of respiratory syncytial virus: rapid identification of subgroup A lineages. J Virol Methods 1992; 40:297-306.
- 3.- Anderson LJ, Hierholzer JC, Tsou C, Hendry RM, Fernie BF, Stone Y, et al. Antigenic characterization of respiratory syncytial virus strains with monoclonal antibodies. J Infect Dis 1985; 151:626-33.
- 4.- Mufson MA, Orvell C, Rafnak B, Norrby E. Two distinct

G González, CE Savón, R Cancio, A Valdivia, D Chacón, J Míguez, A Goyenechea.

- subtypes of human respiratory syncytial virus. *J Gen Virol* 1985; 66:2111-24.
- 5.- Tsutsumi H, Onuma M, Suga K. Occurrence of respiratory syncytial virus subgroup A and B strains in Japan 1980 to 1987. *J Clin Microbiol* 1988 ; 26:1171-4.
- 6.- García-Barreno B, Portela A, Delgado T, López JA, Melero JA. Frame shift mutations as a novel mechanism for the generation of neutralization resistant mutants of human respiratory syncytial virus. *EMBO J* 1990; 12:4181-7.
- 7.- Storch GA, Anderson LJ, Park CS, Tsou C, Dohner DE. Antigenic and genomic diversity within group A respiratory syncytial virus. *J Infect Dis* 1991; 163:358-61.
- 8.- Sullender WM, Britt W. Antigenic and immunogenic analysis of group A and group B respiratory syncytial virus G proteins expressed from recombinant Baculoviruses. *J Gen Virol* 1996; 77:641-8.
- 9.- García O, Martín M, Dopazo J, Arbiza J, Frabasile F, Russi J, et al. Evolutionary Pattern of Human Respiratory Syncytial Virus (Subgroup A): Cocirculating Lineages and Correlation of Genetic and Antigenic Changes in the G Glycoprotein. *J Virol*. 1994; 68:1-12.
- 10.- Chacón D, Valdivia A, Goyenechea A, Oropesa, I, Savón C. Clasificación en subgrupos de cepas del virus sincitial respiratorio aisladas de un brote en Ciudad de la Habana. *Rev Cub Med Trop* 1996; 48:81-2.
- 11.- Valdivia A, Savón C, Chacón D, Sarmiento L, Otero A, Oropesa S, et al. Analysis of respiratory syncytial virus in clinical samples by Reverse Transcriptase - Polymerase Chain Reaction. Restriction Mapping. *Rev Mem do Instituto Oswaldo Cruz* 1997; 92:386-93.
- 12.- Lowry O, Rosebrowgh NJ, Randall RJ. Protein measurement with Folin Cioccateau reagent. *J Biol Chem* 1951; 8:193-265.
- 13.- Palomo C, Albar JP, García-Barreno B, Melero JA. Induction of a neutralizing immune response to human respiratory syncytial virus with anti-idiotypic antibodies. 1990; 64:4199-206.
- 14.- Wertz GW, Collins PL, Huang Y, Gruber C, Levine S, Ball LA. Nucleotide sequence of the G protein gene of human respiratory syncytial virus reveals an unusual type of viral membrane protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985; 82:4075-9.
- 15.- Satake M, Coligan JE, Elango N, Norrby E, Venkatesan S. Respiratory Syncytial Virus envelope glycoprotein (G) has a novel structure. *Nucleic Acids Res* 1985; 13: 7795-812.
- 16.- Johnson PR, Spriggs MK, Olmsted RA, Collins PL. The G glycoprotein of human respiratory syncytial viruses of subgroups A and B: extensive sequence divergence between antigenically related proteins. *Proc Nat Acad Sci USA* 1987b; 84:5625-9.
- 17.- García-Barreno B, Palomo C, Penas C, Delgado T, Pérez-Breña P, Melero JA. Marked differences in the antigenic structure of human respiratory syncytial virus F and G glycoproteins. *J Virol* 1989; 63:925-30.
- 18.- Melero JA, García-Barreno B, Portela A, Rueda P, López JA, Penas C, et al. En : Meignier B, Murphy B, Ogra P, eds. "Animal Models of Respiratory Syncytial Virus Infections". 1990. p. 15-24.
- 19.- Storch GA y Park CS. Monoclonal antibodies demonstrate heterogeneity in the G glycoprotein of prototype strains and clinical isolates of respiratory syncytial virus. *J Med Virol* 1987; 22:345-56.
- 20.- Rueda P, Delgado T, Portela A, Melero JA, García-Barreno B. Premature stop codons in the G glycoprotein of human respiratory syncytial viruses resistant to neutralization by monoclonal antibodies. *J Virol* 1991; 65:3374-8.
- 21.- Caton AJ, Brownlee GG, Yewdell JW. The antigenic structure of the influenza virus A/PR/3/84 hemagglutinin (H1 subtype). *Cell* 1982; 31: 417- 27.
- 22.- Shekel JJ, Stevens DJ, Daniels RS, Douglas AR, Knossow IA. A carbohydrate side chain on hemagglutinins of Hong Kong influenza viruses inhibit recognition by a monoclonal antibody. *Proc Natl Acad Sci USA* 1984; 81: 1779-83.
- 23.- Morgan LA, Routledge EG, Willcocks MM, Samson ACR. Strains variation of respiratory syncytial virus. *J Gen Virol* 1987; 68:27-81.
- 24.- Stott EJ, Taylor G, Ball LA, Anderson K, Young KKY, King AMQ, Wertz, GW. Immune and histopathological responses in animals vaccinated with recombinant vaccinia viruses that express individual genes of human respiratory syncytial virus. *J Virol* 1987; 61:3855-61.