



## CIENCIAS BIOMÉDICAS

### Artículo original de investigación

# Caracterización molecular del CVA24v aislado en Cuba durante 23 años, 1986-2003, revela hallazgos en la epidemiología y patogenicidad del virus

Magilé C Fonseca Quintana <sup>1\*</sup> <https://orcid.org/0000-0002-5419-5136>

Mario Pupo Meriño <sup>2</sup> <https://orcid.org/0000-0001-9130-0620>

Luis R. Sarmiento Pérez <sup>3</sup> <https://orcid.org/0000-0002-3694-1211>

Luis A. García González <sup>2</sup> <https://orcid.org/0000-0003-4021>

Sonia Resik <sup>1</sup> <https://orcid.org/0000-0001-7318-7206>

Lai Heng Hung <sup>1</sup> <https://orcid.org/0000-0001-7551-0775>

Mayra Muné <sup>1</sup> <https://orcid.org/0000-0002-1154-7568>

<sup>1</sup>Laboratorio Enterovirus, Departamento Virología, Instituto de Medicina Tropical Pedro Kourí. La Habana, Cuba

<sup>2</sup>Departamento de Bioinformática, Centro de Estudios de Matemática Computacional, Universidad de las Ciencias Informáticas. La Habana, Cuba

<sup>3</sup>Departamento de Ciencias Clínicas, Unidad de Inmunovirología, Universidad de Lund. Lund, Suecia

\*Autor para la correspondencia: [magile@ipk.sld.cu](mailto:magile@ipk.sld.cu); [mcfonseca@gmail.com](mailto:mcfonseca@gmail.com)

#### Revisores <sup>a</sup>

Enrique Rogelio Arús Soler  
Instituto Nacional de Gastroenterología.  
La Habana, Cuba

#### Editor

Lisset González Navarro  
Academia de Ciencias de Cuba.  
La Habana, Cuba

#### Traductor

Darwin A. Arduengo García  
Academia de Ciencias de Cuba.  
La Habana, Cuba

<sup>a</sup> N. del E: En este apartado figuran los nombres de los árbitros que accedieron a revelar su identidad, como expresión de apertura progresiva del proceso de revisión por pares. No aparecen aquellos que optaron por el anonimato.

## RESUMEN

**Introducción:** La variante antigénica del CVA24 constituye el agente causal de epidemias de conjuntivitis hemorrágica aguda que ha prevalecido hasta la actualidad. Para estudiar la dinámica de transmisión y la evolución de esta variante, caracterizamos molecularmente aislamientos cubanos obtenidos en 5 periodos epidémicos entre 1986 y 2009. **Métodos:** Mediante el programa BEAST v1.8.4 se realizó el análisis filogenético y filodinámico de las regiones genómicas parciales de 54 secuencias cubanas y 83 secuencias de 17 países para la región genómica 3C y 35 secuencias cubanas con 95 secuencias de 18 países para la región VP1. Se analizaron los cambios aminoacídicos de las secuencias cubanas y se compararon las secuencias obtenidas de exudados conjuntivales y heces. **Resultados:** Se identificó que cada periodo epidémico fue causado por variantes genéticas diferentes, y homólogas a variantes que circularon en Las Américas, África y Asia, y que pudieron circular hasta 2 años previos a los picos epidémicos. El virus mostró una población efectiva estable en el tiempo, aumentando en los periodos pandémicos, con una tasa de sustitución nucleotídica (sustituciones/sitio/año) de  $4,39 \times 10^{-3}$  para la región 3C y  $5,80 \times 10^{-3}$  para VP1. Se obtuvieron 19 rutas de transmisión viral para la región genómica 3C y 25 rutas para VP1. Las rutas de introducción del virus a Cuba en los periodos epidémicos de los años 1986, 1997, 2003 y 2008-2009 se infirieron por las relaciones de ancestralidad de las secuencias cubanas con secuencias de países destinos de algunas rutas, avaladas por redes de transmisión viral. Los cambios aminoacídicos en ambas regiones genómicas pudieran involucrarse en la evolución del CVA24v y se obtuvieron evidencias que apoyan el uso de las heces para identificar esta variante viral. Las conclusiones fueron nuevos conocimientos en la epidemiología molecular del CVA24v que circuló en Cuba y el mundo durante 23 años a partir de su emergencia global.

**Palabras clave:** variante del coxsackievirus a24; conjuntivitis hemorrágica aguda; proteasa 3c; vp1; filogenia; filodinámica

## Molecular characterization of CV A24v in Cuba over 23-years, 1986-2009, reveals findings in the epidemiology and pathogenesis of the virus

### ABSTRACT

**Introduction:** The CVA24 antigenic variant is the causal agent of epidemics of acute hemorrhagic conjunctivitis that has prevailed to date. To study the transmission dynamics and evolution of this variant, we molecularly characterized Cuban isolates obtained in 5 epidemic periods between 1986 and 2009. **Methods:** Using the BEAST v1.8.4 program, it was performed the phylogenetic and phylodynamic analysis of the partial genomic regions of 54 Cuban sequences and 83 sequences from 17 countries for the 3C genomic region and 35 Cuban sequences with 95 sequences from 18 countries for the VP1 region. They were analyzed the amino acid changes of the Cuban sequences and they were compared the sequences obtained from conjunctival exudates and feces. **Results:** It was identified that each epidemic period was caused by different genetic variants, and homologous to variants that circulated in the Americas, Africa, and Asia, and that could circulate up to 2 years prior to the epidemic peaks. The virus showed a stable effective population over time, increasing in pandemic periods, with a nucleotide substitution rate (substitutions/site/year) of  $4.39 \times 10^{-3}$  for the 3C region and  $5.80 \times 10^{-3}$  for VP1. They were obtained 19 viral transmission routes for the 3C genomic region and 25 routes for VP1. They were inferred the routes of introduction of the virus to Cuba in the epidemic periods of the years 1986, 1997, 2003 and 2008-2009 by the ancestral relationships of the Cuban sequences with sequences of destination countries of some routes, endorsed by viral transmission networks. Amino acid changes in both genomic regions could be involved in the evolution of CVA24v and it was obtained evidence that supports the use of feces to identify this viral variant. The conclusions were new knowledge in the molecular epidemiology of CVA24v that circulated in Cuba and the world for 23 years after its global emergence.

**Keywords:** Coxsackievirus A24 variant; acute hemorrhagic conjunctivitis; 3C protease; VP1; phylogeny; phylodynamic

## INTRODUCCIÓN

La conjuntivitis hemorrágica aguda figura entre las enfermedades emergentes y reemergentes causadas por los enterovirus con elevado índice de morbilidad y costo económico a nivel mundial. <sup>(1,2)</sup> La enfermedad es altamente contagiosa, con una tasa de ataque estimada entre el 70 % y 100 % en los miembros de una familia y el 45 %-58 % en la población. Las epidemias generalmente llevan a una congestión significativa de los servicios de atención médica y parálisis de algunos servicios públicos donde confluye un gran número de personas, como las escuelas, centros de trabajo, centros recreativos, productivos, entre otros. En ausencia de las terapias específicas, el único modo efectivo de control consiste en las medidas de higiene para mitigar la propagación de la

infección, que puede transmitirse por el contacto directo con las secreciones oculares, por aerosoles (vía respiratoria) y las heces (vía fecal-oral). <sup>(3,4)</sup>

La conjuntivitis hemorrágica aguda causada por el virus CVA24v se caracterizó por brotes grandes y explosivos desde su aparición en el año 1970. En la epidemiología del CVA24v se describen 4 etapas: la primera, la emergente, en la década de los años 70 y restringida al sudeste asiático y la India; la segunda, de expansión mundial en la década de los años 80, donde prácticamente comenzó el comportamiento pandémico; la tercera etapa, en la década de los años 90, con pocos reportes pero, evidente el comportamiento epidémico al menos en la región del Caribe y en países asiáticos; y la cuarta etapa, que comenzó a inicios del año 2000 y que se extiende hasta

la actualidad con al menos 3 picos pandémicos (2000-2004, 2008-2010 y 2014-2017).<sup>(5,7)</sup>

Dichas etapas se hacen corresponder con los genotipos descritos en la epidemiología molecular de este agente, donde la región del genoma que codifica para la proteasa principal del virus (3C) es una de las regiones más estudiada por su conservación estructural y distintiva de las variantes circulantes. Sin embargo, en las últimas décadas, el análisis de la región (completa o parcial) de la proteína estructural VP1 ha tomado auge por su correspondencia taxonómica con los serotipos y genotipos (intra e inter serotipos) y contiene los sitios antigénicos principales de la cápside. Mediante estos estudios se describen 4 genotipos GI-GIV en base a la región del genoma 3C que se hacen corresponder con el análisis de la región estructural VP1, excepto el GII (posiblemente por la carencia de las secuencias de la región VP1 de este periodo).<sup>(8-10)</sup>

En la región de las Américas hasta el momento, solo investigadores brasileños han estudiado filogenéticamente las epidemias de conjuntivitis hemorrágica aguda, de forma similar que otros autores estudiaron las epidemias de los años 2003 y 2017 en Guyana Francesa y a nivel mundial solo se encuentra un estudio filodinámico desarrollado por investigadores de Taiwán en el 2016.<sup>(7,10,11)</sup>

En Cuba, la circulación del CVA24v coincide con sus etapas pandémicas. La primera epidemia causada por este agente ocurrió en el año 1986 y posteriormente ocurrieron otras epidemias significativas en los años 1987, 1992-1993, 1997, 2003, 2008-2009, y la última en los años 2016-2017.<sup>(12,13)</sup>

Teniendo en cuenta este escenario y la disponibilidad de un número considerable de secuencias nucleotídicas del CVA24v a partir de los aislamientos virales obtenidos durante los primeros 5 periodos epidémicos cubanos (1986-2003), nos propusimos realizar una caracterización molecular basada en los análisis filogenéticos, filodinámicos, cambios aminoacídicos y análisis de secuencias obtenidas de cepas de muestras de heces, de las 2 regiones del genoma viral del CVA24v: la proteasa 3C y la proteína estructural VP1.

## MÉTODOS

En esta investigación se realizaron 3 estudios descriptivos para identificar las variantes genéticas del CVA24v que circularon en Cuba durante los 5 periodos epidémicos de conjuntivitis hemorrágica aguda (1986-2009); inferir la filodinámica del CVA24v haciendo énfasis en las variantes que circularon en Cuba durante los 5 periodos epidémicos de conjuntivitis hemorrágica aguda (1986- 2009) y analizar a nivel molecular las cepas cubanas del CVA24v obtenidas a partir de muestras clínicas de heces.

Muestras: El universo de estudio consistió de 172 secuencias obtenidas para la región genómica de la proteasa 3C y 149 secuencias obtenidas para la región genómica VP1 de cepas del CVA24v, aisladas durante los 5 periodos epidémicos de conjuntivitis hemorrágica aguda que ocurrieron en Cuba entre los años 1986 y el año 2009.

## Análisis filogenético

Para los análisis filogenéticos y filodinámicos se seleccionó primeramente el modelo de sustitución nucleotídica a través del programa JModeltest v2.1.4.<sup>(14)</sup> Posteriormente, las inferencias filogenéticas, así como los análisis filodinámicos se realizaron con los métodos bayesianos mediante el programa BEAST v1.8.4.<sup>(15)</sup> En una primera etapa se generó el fichero de entrada al programa BEAST v1.8.4 a través del programa BEAUti incluido en el paquete de dicho programa.<sup>(15)</sup>

La selección de la combinación de los modelos de reloj molecular y los modelos epidemiológicos de los árboles a priori se realizó estimando la (log) verosimilitud marginal a través del método de path sampling (PS) descrito por Baele y colaboradores. El cálculo de la verosimilitud marginal (log likelihood) por PS se llevó a cabo en una primera etapa para modelos con reloj molecular estricto o relajado, empleando una distribución exponencial no correlacionada (UCED) o una distribución logarítmica normal no correlacionada (UCLD) combinados con el modelo de coalescencia no paramétrico Bayesian Skyride Plot (BSP).<sup>(16)</sup>

En todos los casos se llevaron a cabo 2 corridas de las cadenas de Markov y Monte Carlo (MCMC) del enfoque bayesiano, con 70 millones de generaciones para la región 3C y 100 millones para la región VP1, para lograr convergencia en los resultados y obtener un tamaño efectivo de la muestra superior a 200 en los parámetros de interés.<sup>(17)</sup> Cada corrida se analizó individualmente y se combinó empleando como "burn-in" el 10 %, mediante el programa Tracer v1.7.1.<sup>(18)</sup>

Para el análisis de la distribución posterior de los árboles y la selección del árbol de mayor credibilidad, del inglés Maximum Clade Credibility (MCC), se empleó el programa TreeAnnotator v1.8.4.<sup>(19)</sup> Todos los árboles obtenidos se visualizaron a través del programa Figtree v1.4 disponible en el sitio.<sup>(20)</sup>

Las tasas de sustituciones por sitio por año y el tiempo del ancestro común más reciente del inglés most recent common ancestor (TMRCA) se estimaron empleando un enfoque bayesiano de cadenas de Markov y Monte Carlo (MCMC), así como la reconstrucción de la población viral y de la historia dinámica espacio-temporal sin grupo externo, con el BSP disponible en el BEAST.<sup>(15)</sup>

Para la filogeografía se utilizó como modelo de sustitución un modelo de difusión discreta donde los estados fueron los

países usando una cadena de Markov continua tipo estándar. Para inferir la red social que indicó las rutas de propagación del virus se usó el método de selección de variables por búsqueda estocástica bayesiana, del inglés, Bayesian Stochastic Search Variable Selection, (BSSVS). Los resultados del análisis filogeográfico se visualizaron con el programa bayesiano SpreadD3, del inglés Spatial Phylogenetic Reconstruction of Evolutionary Dynamics. <sup>(21)</sup> Se realizó la prueba del Factor de Bayes (FB) para obtener los datos estadísticos que explicaran adecuadamente los procesos filogeográficos y se tomaron como significativos aquellos valores mayores que 3 ( $BF > 3$ ).

A partir de las rutas de transmisión con  $BF > 3$  se realizó además un estudio de redes de transmisión mediante el algoritmo Walktrap descrito por Pons y Lapaty. <sup>(22)</sup> Determinación de los cambios aminoacídicos de las secuencias cubanas respecto a la cepa prototipo EH24\_70\_Singapur 1970 en las regiones genómicas parciales 3C y VP1. Los cambios aminoacídicos de las secuencias cubanas respecto a la cepa prototipo EH24\_70\_Singapur 1970 en las 2 regiones del genoma estudiadas se determinaron mediante el uso del programa MEGA6. <sup>(23)</sup>

En una primera aproximación en la búsqueda de la relevancia estructural y funcional de las posiciones mutadas en la región genómica 3C, se realizó un análisis en el sitio de internet Prosite utilizando como base la estructura de la proteasa 3C del CVA16 disponible. <sup>(24)</sup> Teniendo en cuenta la disponibilidad de la estructura cristalina del CVA24v determinada por Zocher y colaboradores, se visualizaron esquemáticamente los cambios aminoacídicos encontrados en los 234 pb en la proteína VP1 mediante el programa DeepView 4.10. <sup>(25)</sup>

### **Análisis molecular de las cepas del CV-A24v cubanas obtenidas a partir de muestras clínicas de heces**

El objetivo fundamental de esta tarea fue analizar a nivel molecular las 34 secuencias del CVA24v cubanas que se obtuvieron a partir de aislamientos de heces de pacientes con sospecha clínica de conjuntivitis hemorrágica aguda de los periodos epidémicos 1997, 2003, 2008-2009.

Las mismas se distribuyeron en los periodos epidémicos de la siguiente manera: 16 aislamientos del año 1997 obtenidos de 7 pacientes; 16 del año 2003 logrados de 16 pacientes y 2 del periodo 2008-2009, cada uno correspondiente a un paciente diferente en cada año. Los aislamientos a partir de las muestras clínicas de heces formaron parte de la muestra objeto de estudio según lo descrito en el acápite análisis filogenético. Es decir, que no hubo distinción en cuanto al tipo de muestra de la cual procedió la cepa viral para la realización de los análisis.

Mediante el programa Bioedit v7.0.5.3 <sup>(26)</sup> se determinaron los porcentajes de identidad nucleotídica entre las secuencias obtenidas a partir de heces y las obtenidas a partir de los exudados, de diferentes pacientes y de un mismo paciente, en cada uno de los 3 periodos epidémicos analizados.

### **Consideraciones éticas de la investigación**

La presente investigación se desarrolló de acuerdo a las normas establecidas en la Declaración de Helsinki (Asociación Médica Mundial, 2013). <sup>(27)</sup> El protocolo de investigación se analizó por la Comisión Científica Especializada de Microbiología y por el Comité de Ética Institucional del IPK (CEI-IPK 06-17).

La presente investigación utilizó las secuencias obtenidas de los aislamientos virales conservados en congelación y obtenidos de muestras clínicas para diagnóstico tomadas de pacientes (niños y adultos) cubanos con cuadros clínicos de conjuntivitis hemorrágica aguda que se enviaron al laboratorio de Referencia de Enterovirus del IPK. Por lo tanto, el estudio no ofreció ningún riesgo ni daño ético para dichos individuos. En ningún momento se develó ningún dato identitario de los pacientes de los que procedían las muestras.

## **RESULTADOS**

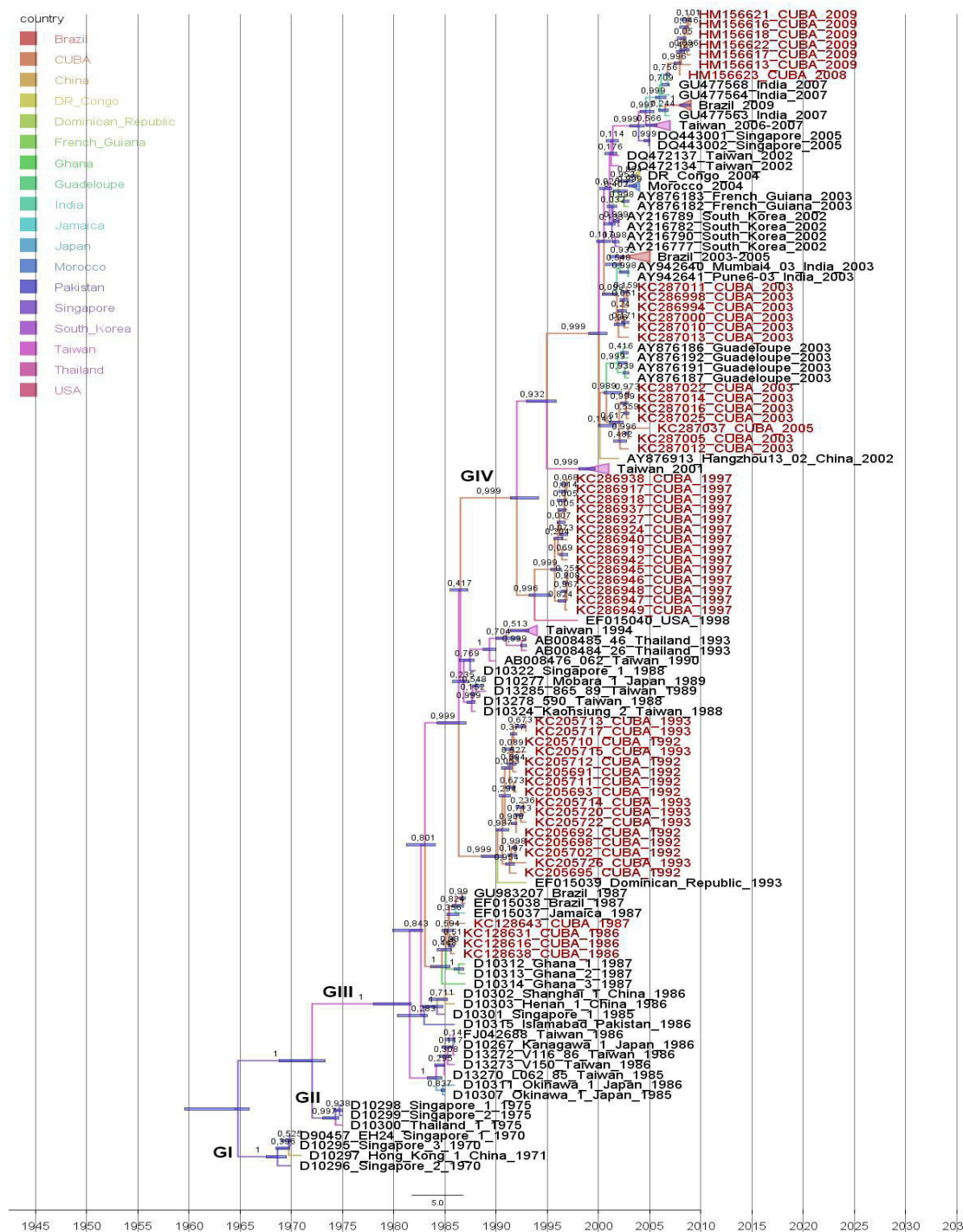
### **Conjuntos de alineamientos**

En el presente trabajo los conjuntos de alineamientos sin secuencias dúplex, incluyeron 54 secuencias cubanas y 83 secuencias de 17 países para la región genómica 3C y 35 secuencias cubanas con 95 secuencias de 18 países para la región VP1. Las secuencias de los otros países se escogieron, de forma tal, que representaran tanto en tiempo como en regiones geográficas los periodos epidémicos en estudio.

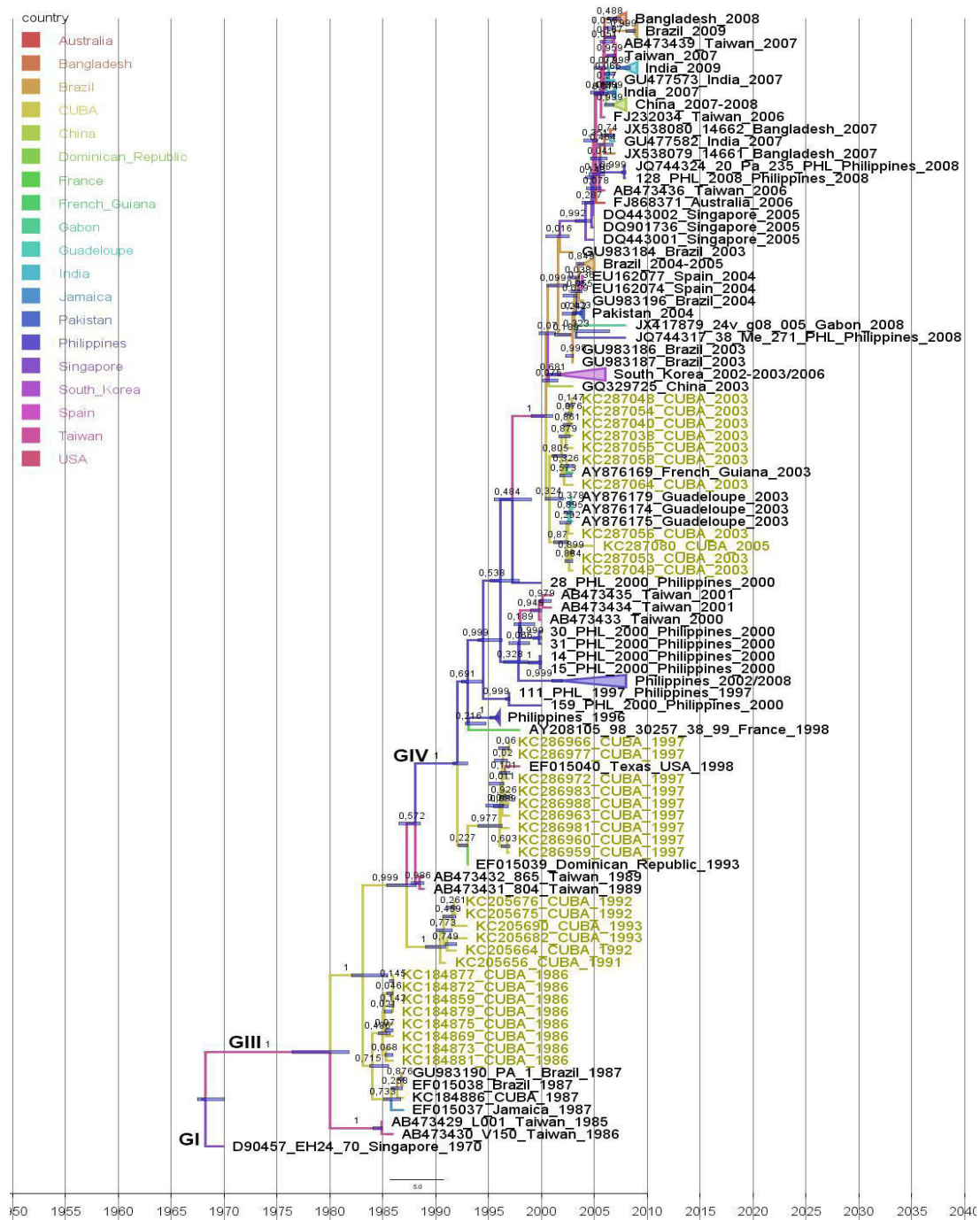
En los conjuntos no se identificaron eventos de recombinación entre las secuencias seleccionadas, ni con los diversos serotipos de la especie C de los enterovirus en dichas regiones genómicas, a la que pertenece esta variante antigénica causante de la conjuntivitis hemorrágica aguda.

### **Caracterización filogenética**

En el periodo epidémico de los años 1986-1987 las secuencias cubanas se agruparon con secuencias de Jamaica (1987), Brasil (1987) y África (1987) (figura 1 y 2). En el periodo epidémico de los años 1992 y 1993 en la región genómica 3C, las secuencias cubanas mostraron homología con la única secuencia de la República Dominicana, en la región VP1 formaron una rama independiente. Ambos periodos epidémicos se incluyeron dentro del genotipo III (figura 1 y 2). Para el periodo epidémico del año 1997 las secuencias cuba-



**Fig. 1.** Análisis filogenético de la región 3C (507 pb) de 54 secuencias de las epidemias cubanas de conjuntivitis hemorrágica aguda (1986-2009) y 82 secuencias de 17 países. Las barras azules en los nodos indican el 95 % HPD de los TMRCA. Los valores numéricos en los nodos indican la probabilidad posterior de la inferencia Bayesiana mayores de 0,700 (70,0 %). La longitud de las ramas indica el tiempo de evolución y la barra de la escala indica el tiempo calendario. Sobre las ramas principales se indican los genotipos para la región 3C (GI- GIV) según este estudio. Las secuencias se identificaron por su número de acceso al banco de genes GenBank, nombre, país y año de la cepa correspondiente. Resaltados en rojo los periodos epidémicos cubanos estudiados. Fuente: Sci Rep 2020, 10, 13761. <sup>(28)</sup>



**Fig. 2.** Análisis filogenético de la región VP1 (234 pb) de 35 secuencias de las epidemias cubanas de conjuntivitis hemorrágica aguda (1986-2009) y 96 secuencias de 19 países. Las barras azules en los nodos indican el 95 % HPD de los TMRCA. Los valores numéricos en los nodos indican la probabilidad posterior de la inferencia Bayesiana mayores de 0,700. La longitud de las ramas indica el tiempo de evolución y la barra de la escala indica el tiempo calendario. Sobre las ramas principales se indican los genotipos para la región VP1 (GI, GIII, GIV) según este estudio. Las secuencias se identificaron por su número de acceso al banco de genes GenBank, nombre, país y año de la cepa correspondiente. Resultados en colores los periodos epidémicos cubanos estudiados. Fuente: Sci Rep 2020, 10, 13761. (28)

nas mostraron relaciones de ancestralidad con una secuencia de los Estados Unidos en ambas filogenias. Sin embargo, en la región genómica VP1, se unió, además, a esta rama la secuencia dominicana del año 1993. Estas secuencias mostraron relaciones ancestrales más cercanas con las secuencias clasificadas dentro del genotipo GIV respecto al genotipo III (ver figura 1 y 2). En el periodo epidémico del año 2003, las secuencias cubanas se dividieron en 2 grupos, uno mostró homología con las secuencias de Guadalupe en ambas inferencias, y el otro grupo con las secuencias de la India (2003) y Brasil (2003- 2005) en la región del genoma 3C y con una secuencia de Guyana Francesa en la región genómica VP1 (ver figura 1 y 2). El último periodo epidémico cubano (años 2008-2009) aparece solamente en el análisis de la región 3C y las secuencias cubanas mostraron relaciones de ancestralidad con secuencias de la India del año 2007 y un grupo de secuencias de Brasil del año 2009 (ver figura 1 y 2).

### **Análisis filodinámico**

El análisis filodinámico de las variantes del CVA24v corroboró el origen monofilético de esta variante a partir de las que circularon en la primera epidemia en 1970. Se observó para ambas regiones genómicas, una topología poco equilibrada o no balanceada (similar a una escalera) lo que implica que ocurren cuellos de botella en la transmisión viral bajo la continua selección, dirigida por la inmunidad de rebaño, de forma que los linajes virales prevalentes existentes se reemplazan secuencialmente por nuevos grupos emergentes.

Este hecho se correspondió con los resultados del análisis mediante Skyride Bayesiano donde el virus mostró una población efectiva estable en el tiempo, solo con fluctuaciones (aumentos) correspondientes a los diferentes periodos pandémicos, con una tasa de sustitución nucleotídica (sustituciones/sitio/año) para la región 3C de  $4,39 \times 10^{-3}$  y para la región estructural VP1 de  $5,80 \times 10^{-3}$ .

Las estimaciones del TMRCA mostraron que la evolución de nuevos genotipos ocurrió entre 4 a 5 años antes de su expansión global, y específicamente en Cuba las variantes pudieron estar circulando previamente entre 1 y hasta 2 años antes del desarrollo de los picos epidémicos. (tabla 1)

Predominaron las rutas de transmisión con origen en el continente asiático. China se destacó como una importante fuente de propagación de las variantes genéticas en Asia y Brasil en el continente americano

Cuba no se identificó como el destino final de ninguna ruta de transmisión viral positiva ( $BF > 3$ ) directa, pero basados en las relaciones filogenéticas de las secuencias cubanas con países destinos en algunas rutas obtenidas y el estudio mediante el programa Waltrap, se propusieron posibles rutas

de introducción del virus al país (figura 3). Se identificó la ruta China-Jamaica para el periodo epidémico 1986-1987 obtenida en ambas regiones genómicas (3C y VP1). Para el periodo epidémico del año 1997 se identificaron varios países de origen (basados en la región 3C): China, Corea del Sur, Tailandia y Taiwán, todas con destino en los Estados Unidos. Para el periodo epidémico del año 2003 se identificaron dos rutas de transmisión viral en ambas regiones genómicas: desde China hasta Guadalupe y Guyana Francesa. En el periodo 2008-2009 se obtuvo una ruta desde China a la India en la región 3C.

### **Cambios amonoacídicos**

La representación estructural de los cambios aminoacídicos en la proteasa 3C de las secuencias cubanas los situó mayoritariamente, dentro o cercanos, al sitio catalítico de la enzima o al sitio de unión al oriL (vital en el inicio de la replicación viral) (figura 4 A y B).

Por otro lado, se observó la composición conservada de determinadas posiciones en la región 3C, claves en el funcionamiento de esta proteasa y que han sido objetivos para la búsqueda y el diseño de nuevos antivirales enterovirales. <sup>(29,30)</sup>

Los cambios aminoacídicos de las cepas cubanas en la proteína VP1 se localizaron su mayoría, en la región del cañón (figura 4 C).

### **Análisis de las secuencias obtenidas de aislamientos de heces**

Las secuencias obtenidas de los aislamientos de las heces mostraron porcentajes de identidad nucleotídica de 97,7 %-100 % y 97,3 %-100 %, respecto a las secuencias de los aislamientos obtenidos de los exudados en las regiones genómicas 3C y VP1 respectivamente.

Se observaron, además 3 cambios aminoacídicos en la región 3C y 1 en la región VP1 en las secuencias de 7 cepas seriadas de un paciente aisladas en 1 periodo de 20 días.

Por otra parte, en los diferentes análisis tanto filogenéticos como filodinámicos, las secuencias nucleotídicas de los virus obtenidos a partir de las heces se comportaron tal cual las de los exudados conjuntivales en el grupo de secuencias de un mismo periodo epidémico.

## **DISCUSIÓN**

Cuba ha sido un área activa de circulación del CVA24v en las Américas desde mediados de la década de 1980. <sup>(12,13)</sup> La caracterización filogenética de ambas regiones del genoma viral mediante el programa BEAST, determinó que cada periodo epidémico cubano ocurrió cíclicamente entre 5 a 6 años resultado de una nueva introducción del virus al país y no de la circulación o emergencia endémica de una variante genética

**Tabla 1.** Rutas de conexiones epidemiológicas del CV-A24v durante el periodo 1986-2009 con BF > 3,0 en base a las regiones del genoma viral 3C y VP1

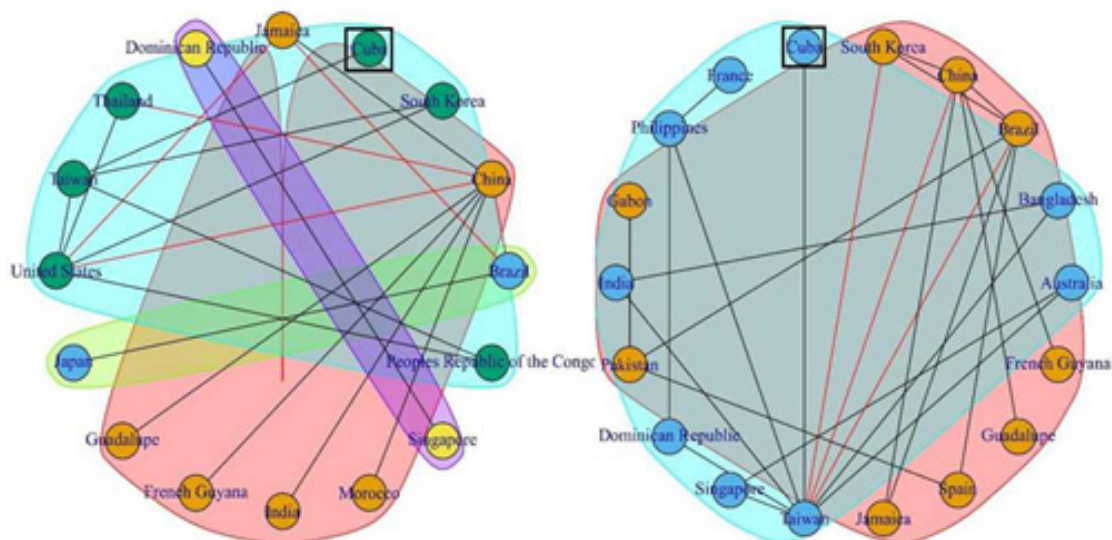
Región 3C Rutas de transmisión			Región VP1 Rutas de transmisión		
Desde	Hasta	BF	Desde	Hasta	BF
Brasil	China	11,1	Australia	Singapur	5,5
Brasil	Jamaica	11,4	Australia	Taiwán	5,9
Brasil	Japón	8,7	Bangladesh	India	17,6
China	Estados Unidos	43,9	Bangladesh	Taiwán	9,8
China	Guadalupe	28,3	Brasil	China	23,0
China	Guyana Francesa	7,9	Brasil	Jamaica	4,8
China	India	32,9	Brasil	Pakistán	16,4
China	Jamaica	23,6	Brasil	Corea del Sur	3,8
China	Marruecos	4,9	Brasil	España	7,8
China	Tailandia	3,5	Brasil	Taiwán	11,9
Corea del Sur	Estados Unidos	3,4	China	Guadalupe	38,6
Corea del Sur	Taiwán	3,0	China	Guyana Francesa	49,2
Cuba	Taiwán	161,7	China	Jamaica	8,8
Estados Unidos	República Popular del Congo	3,6	China China	Corea del Sur Taiwán	3,0
Jamaica	Estados Unidos	6,6			14,5
República Dominicana	Singapur	29,4	Corea del Sur	Taiwán	3,2
Tailandia	Estados Unidos	5,62	Cuba	Taiwán	19,4
Taiwán	Estados Unidos	432	Francia	Filipinas	7,2
Taiwán	República Popular del Congo	23,7	Filipinas	Taiwán	39,7
			Gabón	Pakistán	3,3
			India	Taiwán	13,7
			Pakistán	España	9,7
			República Dominicana	Filipinas	4,7
			República Dominicana	Taiwán	3,1
			Singapur	Taiwán	44,1

Fuente: Sci Rep 2020, 10, 13761. <sup>(28)</sup>

y en los años epidémicos continuos (generalmente 2 años) circuló la misma variante genética. Los brotes cubanos de conjuntivitis hemorrágica aguda en los periodos estudiados, fueron causados por variantes genéticas del CV-A24v homólogas a las que circularon en la región de las Américas en cada uno de ellos. En algunos periodos epidémicos (1986-1987, 2003 y 2008-2009), se pudo evidenciar las relaciones de ancestralidad con secuencias de otros continentes (África y Asia), lo que avala también el alto potencial epidémico de esta variante antigénica.

Los resultados indicaron, además, que para cada periodo epidémico el CVA24v pudo estar circulando de 1 año a 2 años previos, a que ocurrieran los picos epidémicos. Estos resultados apoyan las observaciones epidemiológicas y del laboratorio donde en algunos de estos periodos epidémicos cubanos previos a los años epidémicos se reportaron y diagnosticaron casos con conjuntivitis hemorrágica aguda. Este hallazgo pudiera tenerse en cuenta para futuros eventos epidémicos de esta variante antigénica, lo cual tributaría en una alerta oportuna al sistema nacional de salud.



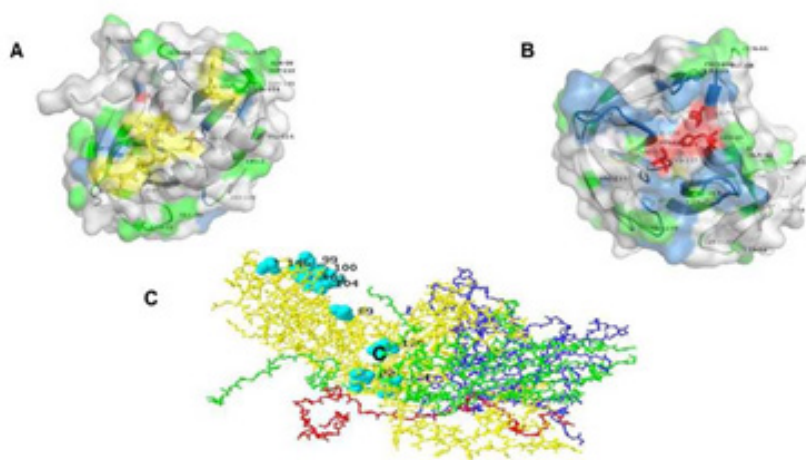


**Fig. 3.** Redes de transmisión viral obtenidas mediante el análisis Walktrap a partir de los valores de BF > 3 para las regiones del genoma 3C (izquierda) y VP1 (derecha). Enmarcada en cuadrado verde la posición de Cuba. Fuente: Sci Rep 2020, 10, 13761. <sup>(28)</sup>

En los últimos años ha existido mucha controversia sobre qué región del genoma es más informativa desde el punto de vista filogenético. <sup>(6,31,32)</sup> Los primeros estudios filogenéticos del CVA24v se basaron en la región 3C no estructural, sin embargo, el análisis reciente de esta región genómica ha sido reemplazado por el análisis de la región estructural VP1. <sup>(11,8,31)</sup> En este trabajo, ambas regiones se mostraron igualmente informativas para los análisis filogenéticos y filodinámicos, de

modo que es necesario llegar a un consenso respecto a qué región genómica analizar y qué secuencias de referencia se pueden elegir por períodos y origen geográfico para obtener una mejor clasificación y análisis de la epidemiología molecular del CVA24v.

El análisis filogenético reveló un desarrollo secuencial de los genotipos, con cepas pertenecientes al genotipo IV aisladas durante el brote de AHC en Cuba en 1997. Comporta-



**Fig. 4.** A y B: Representación estructural del centro catalítico (A) y el sitio de unión al orfL(B) con los cambios aminoácidos de las secuencias cubanas del CVA24v en la proteasa 3C, en la estructura de la proteasa 3C del CVA16 (entrada PDB 3SJ1). Se resaltan en rojo el sitio catalítico, en amarillo el sitio de unión al orfL, en verde las posiciones mutantes, y en azul las posiciones potencialmente relevantes desde el punto de vista funcional. C: Cambios aminoácidos en la región genómica VP1 de las secuencias cubanas (círculos azules) representados en la vista lateral de un protómero, VP1 (amarillo), VP2 (azul), VP3 (verde), VP4 (rojo) proteínas estructurales de la cápside.

miento semejante lo mostraron las cepas aisladas en 1996 en Filipinas y en Francia y los Estados Unidos en 1998, lo que indica una ocurrencia anterior a mediados de la década de 1990 y no a principios del 2000 del genotipo IV. Otros estudios mostraron una topología similar a los árboles filogenéticos obtenidos, incluso con modelos menos robustos. <sup>(5,10,25,33-38)</sup> La definición de genotipo o subgenotipo del CVA24v no se ha establecido claramente. Varios estudios han demostrado diferencias espacio-temporal entre las cepas de diferentes países mediante el uso de las regiones genómicas 3C y VP1 o del genoma completo. <sup>(11,33,34-36)</sup>

Los estudios filogenéticos mostraron un reemplazo cronológico alternativo de secuencias latinoamericanas y europeas, con secuencias asiáticas al igual que las encontradas por otros autores. <sup>(6,11,22,37)</sup> Además, en los estudios filogeográficos mostraron a Asia como el principal generador de rutas de transmisión así la existencia de numerosas rutas hacia ese continente. Cabría preguntarse la posibilidad de que, a partir de la primera oleada pandémica, las variantes genéticas en su recorrido por el mundo evolucionan de forma tal que cuando retornan al sudeste asiático, constituyen nuevas variantes que, en medio de poblaciones susceptibles, encuentran todas las condiciones para originar otra oleada pandémica.

A partir del estudio de los cambios aminoacídicos de las cepas cubanas se encontró que la mayoría de los mismos en la proteína VP1, se localizaron en la región del cañón. En esta región se encuentran los sitios antigénicos y, por ende, dichos cambios pudieran permitir el escape a la acción neutralizante de los anticuerpos generados por variantes virales que circularon en las epidemias previas. En la región 3C, los cambios aminoacídicos se localizaron cerca del sitio catalítico de la enzima o de unión al oriL de forma que pudiera estar involucrados en la evolución de las variantes virales cubanas. Por otro lado, se observó la composición conservada de determinadas posiciones, claves en el funcionamiento de esta proteasa, lo que contribuye a la inclusión de esta variante viral en el diseño y búsqueda de nuevos antivirales dirigidos contra esta proteína viral en los enterovirus. <sup>(29,30)</sup>

También se demostró a nivel molecular, que, en efecto, la variante genética del CVA24v circulante causante de la conjuntivitis hemorrágica aguda es capaz de replicarse en la conjuntiva y el intestino de los pacientes y excretarse en sus heces. En los diferentes análisis tanto filogenéticos como filodinámicos, las secuencias nucleotídicas de los virus obtenidos a partir de las heces se comportaron tal cual las de los exudados conjuntivales en el grupo de secuencias de un mismo periodo epidémico. Precisamente, este hecho nos permitió argumentar algunos aspectos epidemiológicos y de la patogenicidad de esta variante viral que han sido poco difundidos

y estudiados en la comunidad científica y que parten del hecho de analizar secuencias del CVA24v obtenidas de aislamientos de heces. En consecuencia, se incluyeron secuencias de CVA24v obtenidas de heces de casos de parálisis flácida aguda (PFA) en Filipinas (n = 13), India (n = 4), Bangladesh (n = 9) y Gabón (n = 1), de primates no humanos (n = 3, Bangladesh) y de muestras ambientales (n = 5, Filipinas). <sup>(37-42)</sup> Todas las secuencias de CVA24v se agruparon en los 3 genotipos principales dentro de la región VP1, independientemente del tipo de muestra de la que se obtuvieron los aislamientos.

De modo que estos resultados argumentan: a) el tropismo neurológico del CVA24v, a tener en cuenta por su alto potencial epidémico y pandémico; b) el rango de hospederos de esta variante antigénica, desde los individuos asintomáticos, con PFA y primates no humanos que pueden servir de reservorios temporales; y c) la permanencia en el medio ambiente (aguas albañales, ríos y afluentes) que sirven de vehículos para la diseminación viral, ya sea, entre, durante y años posteriores al desarrollo de las epidemias.

## Conclusiones

Este estudio es uno de los estudios más completos realizados en las Américas sobre el origen, evolución y rutas de transmisión de CVA24v en la región. Los hallazgos resuelven una pregunta de larga data sobre cuándo y dónde podrían originarse las epidemias CVA24v en Cuba. La detección inesperada de cepas de CVA24v pertenecientes al genotipo IV a mediados de la década de 1990 destaca la necesidad de revisar el origen del genotipo IV. Además, subrayan la importancia de comprender la evolución global de CVA24 y su amenaza pandémica. Por otro lado, el estudio enfatiza la importancia de las heces como una ruta adicional de transmisión del CVA24v y argumenta el espectro diverso de síndromes clínicos causados por la infección por CVA24v y de otros reservorios no humanos.

Los resultados del estudio no solo arrojan luz sobre la diversidad genética, la evolución y la transmisión global de CVA24v, sino que también pueden ayudar a identificar nuevas estrategias de control para futuras epidemias a nivel nacional, regional y mundial.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Finger C. Brazil faces worst outbreak of conjunctivitis in 20 years. *Lancet Infect Dis.* 2003;361:1714.
2. Medina NH, Haro-Muñoz E, Pellini AC, Machado BC, Russo DH, Timenetsky MC, et al. Acute hemorrhagic conjunctivitis epidemic in São Paulo State, Brazil, 2011. *Rev Panam Salud Publica.* 2016;39(2):137-41.
3. Onorato IM Patriarca PA, Sklar VE, Schonberger LB, Kaminski RM, Hatch MH et al. Acute hemorrhagic conjunctivitis Investigation of

- a large-scale community outbreak in Dade County, Florida. *JAMA*. 1983;249(10):1283-9.
4. Mistry N, Zocher G, Frank M, Hanlein-Schick I, Ekstrom J-O, *et al*. A Sialic Acid Binding Site in a Human Picornavirus. *PLoS Pathog*. 2014;10(10):e1004401.
  5. Yin-Murphy M. The picornaviruses of acute haemorrhagic conjunctivitis: a comparative study. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*. 1973;4(3):305-10.
  6. Chu PY, Ke GM, Chang CH, Lin JC, Sun CY, Huang WL, *et al*. Molecular epidemiology of coxsackie A type 24 variant in Taiwan, 2000-2007. *J Clin Virol*. 2009;45(4):285-91.
  7. Dussart P, Cartet G, Huguet P, Leveque N, Hajjar C, Morvan J *et al*. Outbreak of acute hemorrhagic conjunctivitis in French Guiana and West Indies caused by coxsackievirus A24 variant: phylogenetic analysis reveals Asian import. *J Med Virol*. 2005;75(4):559-65.
  8. Lin KH, Wang HL, Sheu MM, Huang WL, Chen CW, Yang CS, *et al*. Molecular epidemiology of a variant of coxsackievirus A24 in Taiwan: two epidemics caused by phylogenetically distinct viruses from 1985 to 1989. *J Clin Microbiol*. 1993;31(5):1160-6.
  9. De W, Huanying Z, Hui L, Corina M, Xue G, Leng L, *et al*. Phylogenetic and molecular characterization of coxsackievirus A24 variant isolates from a 2010 acute hemorrhagic conjunctivitis outbreak in Guangdong, China. *Virology*. 2012;9:41.
  10. Burlandy Fernanda M, Sousa Ivanildo PJr, Ferreira James L, Alves Jainara CS, Sousa-Júnior EC, Tavares Fernando N. *et al*. Re-emergence of a coxsackievirus A24 variant causing acute hemorrhagic conjunctivitis in Brazil from 2017 to 2018. *Archives of Virology*. 2019;164:1181-5.
  11. Yen YC. *et al*. Phylodynamic characterization of an ocular-tropism coxsackievirus A24 variant. *PLoS ONE*. 2016;11:e0160672. Disponible en: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0160672>
  12. González CR, Morales PI, Quintana JI. Conjuntivitis Hemorrágica Epidémica Aguda en Cuba: Caracterización epidemiológica. *Reporte Técnico de Vigilancia*. 2004;9(1).
  13. Fonseca MC, Sarmiento L, Resik S, Pereda N, Rodríguez H, Kourí V, Martínez PA, Piñón A, Limonta D, Más P, Hung LH. Isolation of Coxsackievirus A24 variant from patients with hemorrhagic conjunctivitis in Cuba, 2008-2009. *J Clin Virol* 2012;(53):77-81. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2011.10.006>
  14. Darriba D, Taboada GL, Doallo R, Posada D. jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nat Meth*. 2012;9(8):772.
  15. Drummond AJ, Rambaut A & Suchard MA. Bayesian Evolutionary Analysis Sampling Trees BEAST v1.8.4, 2002-2016. Disponible en: <http://beastcommunity/>
  16. Minin VN, Bloomquist EW, Suchard MA. Smooth skyride through a rough skyline: Bayesian coalescent-based inference of population dynamics. *Mol Biol Evol*. 2008;25:1459-71.
  17. Baele G, Lemey P, Bedford T, Rambaut A, Suchard MA, Alekseyenko AV. Improving the Accuracy of Demographic and Molecular Clock Model Comparison While Accommodating Phylogenetic Uncertainty. *Mol Biol Evol*. 2012;29(9):2157-67.
  18. Rambaut A, Drummond AJ, Xie W, Baele G and Suchard MA. MCMC Trace Analysis Tool Version v1.7.1.2018 Disponible en: <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/tracer/>
  19. Rambaut A and Drummond AJ. TreeAnnotator v1.8.3, 2002-2016, MCMC Output analysis 2016. Disponible en: <http://beast.bio.ed.ac.uk/>
  20. Rambaut A. Figtree v1.4.3, Tree Figure Drawing Tool. 2016. A Disponible en: <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>
  21. Bielejec F, Baele G, Rambaut A, Suchard MA, Lemey P. SpreadD3: interactive visualization of spatial-temporal history and trait evolutionary processes. *Mol Biol Evol*. 2016;33(8):2167-9.
  22. Pons P and Latapy M. Computing Communities in Large Networks Using Random Walks. *JGAA*. 2006;10(2):191-218.
  23. Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, and Kumar S. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Mol Biol Evol*. 2013;30:2725-9.
  24. Sigrist CJA, De Castro E, Cerutti L, Cuche BA, Hulo N, Bridge A, Bougueleret L, Xenarios. New and continuing developments at PROSITE. *Nucleic Acids Res*. 2013; 41(Database issue): D344-7.
  25. Guex N and Peitsch MC. SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: An environment for comparative protein modeling. *Electrophoresis*. 1997;18:2714-23.
  26. Hall T. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl Acids Symp Ser*. 1999;41:95-8.
  27. Grupo de investigaciones ETICES. Declaración de Helsinki Boletín de Bioética. 2013;5(4).
  28. Fonseca MC, Pupo-Meriño M, García-González LA, Resik S, Hung L, Muné M. *et al*. Molecular evolution of coxsackievirus A24v in Cuba over 23-years, 1986-2009. *Sci Rep*. 2020;10:13761. Disponible en: [doi.org/10.1038/s41598-020-70436-w](https://doi.org/10.1038/s41598-020-70436-w)
  29. Binford SL. Conservation of amino acids in human rhinovirus 3C protease correlates with broad-spectrum antiviral activity of rupintrivir, a novel human rhinovirus 3C protease inhibitor. *Antimicrob Agents Chemother*. 2005;49:619-26.
  30. Costenaro L, Kaczmarek Z, Arnan C *et al*. Structural Basis for Antiviral Inhibition of the Main Protease, 3C, from Human Enterovirus 93. *J Virol*. 2011;85(20):10764-73.
  31. Cabrerizo M, Echevarria JE, Otero A, Lucas P & Trallero G. Molecular characterization of a coxsackievirus A24 variant that caused an outbreak of acute haemorrhagic conjunctivitis in Spain, 2004. *J. Clin. Virol*. 2008;43(3):323-7. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2008.07.017>
  32. Nidaira M. *et al*. Molecular evolution of VP3, VP1, 3C(pro) and 3D(pol) coding regions in coxsackievirus group A type 24 variant isolates from acute hemorrhagic conjunctivitis in 2011 Okinawa, Japan. *Microbiol. Immunol*. 2014;58:227-38. Disponible en: <https://doi.org/10.1111/1348-0421.12141>
  33. Kuo PC *et al*. Molecular and immunocytochemical identification of coxsackievirus A-24 variant from the acute haemorrhagic conjunctivitis outbreak in Taiwan in 2007. *Eye*. 2010;24:131-6. Disponible en: <https://doi.org/10.1038/eye.2009>
  34. Nidaira M. *et al*. Molecular evolution of VP3, VP1, 3C(pro) and 3D(pol) coding regions in coxsackievirus group A type 24 variant isolates from acute hemorrhagic conjunctivitis in 2011 Okinawa, Japan. *Microbiol. Immunol*. 2014;58:227-38. Disponible en: <https://doi.org/10.1111/1348-0421.12141>
  35. Yan D. *et al*. Molecular identification and phylogenetic analyses of coxsackievirus A24v causing an outbreak of acute hemorrhagic conjunctivitis in Jiangxi, China, in 2010. *Bing Du Xue Bao*. 2015;31(3):251-7.
  36. Zhang L. *et al*. Molecular epidemiology of acute hemorrhagic conjunctivitis caused by coxsackie A type 24 variant in China,

- 2004-2014. Sci. Rep. 2017;7:45202. Disponible en: <https://doi.org/10.1038/srep45202>
37. Leveque N, Amine IL, Cartet G, Hammani AB, Khazraji YC, Lina B, *et al.* Two outbreaks of acute hemorrhagic conjunctivitis in Africa due to genotype III coxsackievirus A24 variant. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2007;26(3):199-202.
38. Apostol LN, Suzuki A, Bautista A, Galang H, Paladin FJ, Fuji N, Lupisan S, Olveda R, Oshitani H. Detection of non-polio enteroviruses from 17 years of virological surveillance of acute flaccid paralysis in the philippines. *J. Med. Virol.* 2012;84:624-31.
39. Sadeuh Mba, SA, Bessaud, M, Massenet D, Joffret ML, Endegue MC, Njouom R, Reynes, JM, Rousset D, Delpeyroux F. High Frequency and Diversity of Species C Enteroviruses in Cameroon and Neighboring Countries. *J. Clin. Microbiol.* 2013;51:759-70.
40. Laxmivandana R, Yergolkar P, Rajeshwari M, Chitambar SD. Genomic characterization of coxsackievirus type A24 strains associated with acute flaccid paralysis and rarely identified Hopkins syndrome. *Arch. Virol.* 2014;159:3125-9.
41. Apostol LNG, Imagawa T, Suzuki A, Masago Y, Lupisan S, Olveda R, Saito M, Omura T, Oshitani H. Genetic diversity and molecular characterization of enteroviruses from sewage-polluted urban and rural rivers in the Philippines. *Virus Genes.* 2012;45:207-17.
42. Oberste MS, Feeroz MM, Maher K, Nix WA, Engel GA, Hasan KM, Begum S, Oh G, Chowdhury AH, Pallansch MA *et al.* Characterizing the picornavirus landscape among synanthropic nonhuman primates in Bangladesh, 2007 to 2008. *J. Virol.* 2013;87:558-571.

Recibido: 06/10/2022

Aprobado: 13/01/2023

### Agradecimientos

Los autores agradecen a todos los investigadores que formaron parte del colectivo de investigadores del laboratorio Enterovirus. Se reconoce también a la Prof. Helene Norder, del Departamento de Enfermedades Infecciosas/Virología, Instituto de Biomedicina de la Academia Sahlgrenska de la Universidad de Gotemburgo, Suecia, la Dra. María Caridad Montalvo y la Lic. Hermis Rodríguez del CIDR. IPK y el Prof. Luis Morier. Departamento de Microbiología y Virología, Facultad de Biología, Universidad de la Habana, Cuba.

### Conflictos de intereses

Los autores no declaran conflictos de intereses en relación con la investigación presentada.

### Contribuciones de los autores

Conceptualización: Magilé C Fonseca Quintana, Mario Pupo-Meriño, Luis R. Sarmiento Pérez, Sonia Resik, Mayra Muné  
Curación de datos: Magilé C Fonseca Quintana, Mario Pupo-Meriño, Luis R. Sarmiento Pérez, Luis A. García-González, Sonia Resik, Lai Heng Hung, Mayra Muné

Análisis formal: Magilé C Fonseca Quintana, Mario Pupo-Meriño, Luis R. Sarmiento Pérez, Luis A. García-González  
Adquisición de fondos: Magilé C Fonseca Quintana, Luis R. Sarmiento Pérez  
Investigación: Magilé C Fonseca Quintana, Mario Pupo-Meriño, Luis R. Sarmiento Pérez, Luis A. García-González  
Metodología: Magilé C Fonseca Quintana, Mario Pupo-Meriño, Luis A. García-González  
Administración del proyecto: Magilé C Fonseca Quintana  
Recursos: Mario Pupo-Meriño, Luis A. García-González  
Software: Mario Pupo-Meriño, Luis A. García-González  
Supervisión: Magilé C Fonseca Quintana, Mario Pupo-Meriño, Luis R. Sarmiento Pérez  
Validación: Magilé C Fonseca Quintana, Mario Pupo-Meriño, Luis R. Sarmiento Pérez, Luis A. García-González, Sonia Resik, Lai Heng Hung, Mayra Muné  
Visualización: Magilé C Fonseca Quintana, Mario Pupo-Meriño, Luis R. Sarmiento Pérez, Luis A. García-González, Sonia Resik, Lai Heng Hung, Mayra Muné  
Redacción-borrador original: Magilé C Fonseca Quintana, Mario Pupo-Meriño, Luis R. Sarmiento Pérez, Luis A. García-González, Sonia Resik, Lai Heng Hung, Mayra Muné  
Redacción-revisión y edición: Magilé C Fonseca Quintana, Mario Pupo-Meriño, Luis R. Sarmiento Pérez, Luis A. García-González, Sonia Resik, Lai Heng Hung, Mayra Muné

### Financiamiento

Para el desarrollo de este trabajo se dispuso del financiamiento del Wood-Whelan Research Fellowships 2007 de la International Union of Biochemistry and Molecular Biology (IUBMB). La infraestructura computacional en la cual se realizaron los análisis resultó del proyecto VLIR-UOS "High Performance Computing Software for Bioinformatics Applications" (code ZEIN2014-Z152), coordinado por el Departamento de ciencias Computacionales de Luven, KU Leuven, Bélgica y la UCI.

### Cómo citar este artículo

Fonseca Quintana M, Pupo Meriño M, Sarmiento Pérez LR, García González LA *et al.* Caracterización molecular del CVA24v aislado en Cuba durante 23 años, 1986-2003, revela hallazgos en la epidemiología y patogenia del virus. *An Acad Cienc Cuba* [internet] 2023 [citado en día, mes y año];13(3):e1345. Disponible en: <http://www.revistaccuba.cu/index.php/revacc/article/view/1345>

El artículo se difunde en acceso abierto según los términos de una licencia Creative Commons de Atribución/Reconocimiento-NoComercial 4.0 Internacional (CC BY-NC-SA 4.0), que le atribuye la libertad de copiar, compartir, distribuir, exhibir o implementar sin permiso, salvo con las siguientes condiciones: reconocer a sus autores (atribución), indicar los cambios que haya realizado y no usar el material con fines comerciales (no comercial).

© Los autores, 2023.

