



Universitat Autònoma de Barcelona

ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi queda condicionat a l'acceptació de les condicions d'ús establertes per la següent llicència Creative Commons:  http://cat.creativecommons.org/?page_id=184

ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis queda condicionado a la aceptación de las condiciones de uso establecidas por la siguiente licencia Creative Commons:  <http://es.creativecommons.org/blog/licencias/>

WARNING. The access to the contents of this doctoral thesis it is limited to the acceptance of the use conditions set by the following Creative Commons license:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=en>



**Universitat Autònoma
de Barcelona**

**Universitat Autònoma de Barcelona
Departamento de Genética y Microbiología
Programa de Doctorado: Microbiología**

TESIS DOCTORAL

Los Picornavirus. De la levedad a la gravedad.

Presentada por Cristina Andrés Vergés

para optar al grado de Doctora

Dirigida por el Prof. Tomàs Pumarola Suñé y el Dr. Andrés Antón Pagarolas

Tutorizada por la Dra. Núria Rabella Garcia

Barcelona, 2019

Universitat Autònoma de Barcelona

Tomàs Pumarola Suñé, Catedrático del Departamento de Genética y Microbiología de la Universidad Autónoma de Barcelona y Jefe del Servicio de Microbiología del Hospital Universitario Vall d'Hebron de Barcelona, **Andrés Antón Pagarolas**, Facultativo Especialista responsable de la Unidad de Virus Respiratorios del Servicio de Microbiología del mismo hospital, y **Núria Rabella Garcia**, Jefa Clínica de la Unidad de Virología del Servicio de Microbiología del Hospital de la Santa Creu i Sant Pau.

Certificamos,

Que la memoria titulada "**Los Picornavirus. De la levedad a la gravedad**" presentada por **Cristina Andrés Vergés**, ha sido realizada bajo nuestra supervisión y cumple todos los requisitos necesarios que dicta la normativa vigente para ser defendida delante del tribunal correspondiente como tesis doctoral en formato clásico en la Universidad Autónoma de Barcelona.

Y para que así conste,

Firmamos este certificado en Barcelona, 22 de Julio de 2019

Prof. Tomàs Pumarola Dr. Andrés Antón Dra. Núria Rabella Cristina Andrés

UNIVERSITAT AUTONÒMA DE BARCELONA

Hospital Universitari Vall d'Hebron

Vall d'Hebron Institut de Recerca

Doctorado en Microbiología

Departamento de Genética y Microbiología

A l'Arnau i als meus fills, Laia i Carles

AGRADECIMIENTOS

Aquesta tesi doctoral no s'hauria dut a terme sense el recolzament, els ànims, l'ajuda de totes aquelles persones que finalment han format part d'aquest camí llarg i difícil, però entretingut, que ha permès finalment l'escriptura i realització d'aquest treball.

Primer de tot, voldria agrair la incorporació a aquest grup de recerca per part del Prof. Tomàs Pumarola i el Dr. Andrés Antón. Gràcies a ells i a la seva confiança s'ha pogut realitzar aquesta tesi, entre d'altres coses, durant aquest quasi cinc anys que porto treballant a Vall d'Hebron.

Tomàs només dir que des de l'entrevista amb el Juanjo i l'Andrés al teu despatx no m'esperava haver arribat tant lluny, ja que en un inici era difícil que ens concedissin la beca. Des d'aquell dia, que estava nerviosíssima, ja que a la vegada estava treballant en un altre lloc, i era com si estigués fent alguna cosa malament, la confiança i tranquil·litat que em va transmetre em va ajudar moltíssim a l'hora de l'entrevista i posteriorment a la integració al grup de recerca i a tota la segona planta. Tomàs sempre has estat allà per qualsevol consell i ajuda i per això voldria agrair-te tots aquests anys treballats, per la teva passió per la grip, que ens transmetes cada vegada que dones una xerrada i per tot el que he après i guanyat com a investigadora.

Andrés, no sé ni per on començar, ja que amb tu he viscut tots aquests cinc anys directament colze amb colze. Tu has estat la persona que m'ha ensenyat, transmès, aconsellat, advertit de tots els coneixements i els que encara em queden per aprendre durant aquest llarg camí. Ets una persona única i excepcional. Vas ser la primera persona que em va presentar tota la segona planta, que em va transmetre també aquella passió per la grip i altres virus respiratoris, que em va dir que ens havien concedit finalment la beca, que em va preparar una taula en el seu despatx abans de que m'incorporés i que m'ha acompanyat en tots els moments bons i no tan bons d'aquesta tesi. Vull agrair-te tota la confiança, que és molta, que has posat i cregut en mi, ja que sense això, possiblement no estaria on estic. Sense el teu esforç, valoracions i correccions constructives i paciència, aquesta tesi i altres projectes no s'haurien

Agradecimientos

pogut realitzar. Sempre estaré agraïda per la forma en què vaig entrar en aquest grup, pel tractament amable que he tingut sempre i que no voldria canviar. Andrés, gràcies per tot, per ser com ets, amb els teus acudits “bons”, que sempre arrenquen un somriure un dia que estàs trist, i la teva confiança, de la que estaré en deute.

Ara m'agradaria parlar de la meva tutora, la Dra. Núria Rabella. Voldria agrair-li tots aquests anys que hem estat fent col·laboracions, fent pinya en congressos, i també per transmetre'm la seva passió pel cultiu cel·lular. En un inici no m'esperava tenir la relació que compartim actualment, però la personalitat, la visió clínica i caràcter, fan de la Núria una persona excel·lent. Amb ella, la Marga i la Pili he après al màxim tot el que cal saber del cultiu cel·lular, entre d'altres coneixements més a nivell personal. Sempre les estaré agraïdes per acollir-me al seu laboratori durant uns dies per transmetre'm aquesta passió pel cultiu. A més, amb la Núria, també hem compartit bons moments a Atenes, entre cervesa i cervesa, que mai oblidaré. Espero mantenir aquesta relació magnífica en el futur.

De la Unitat de Virus Respiratoris que haig de dir. M'han acollit durant aquests cinc anys de la millor forma possible. Paquito que me has enseñado todo lo relativo a la rutina del lab, tus inmunofluorescencias tan bonitas, tu música de Pablo Alborán, que haríamos sin ti. Siempre cuidándonos al máximo con los crusantitos de chocolate, los almuerzos fuera del lab, un caballero de los que no quedan ya. Gracias por tu paciencia, tus buenos días y el trabajo codo con codo que hemos tenido, sobre todo este último año, no cambies. La Susana fa poquet que s'ha incorporat al grup, però ha estat de gran ajuda des de bon principi. El seu riure, les seves batalletes, les seves experiències sempre alegren el dia a dia i ara treballant conjuntament encara més. No canviïs mai. La Piliiii, ja la veig poquet perquè pertany més a un altre grup que el nostre, però també li vull agrair la seva companyia durant aquest camí, ja que també ha estat involucrada, tot i que més indirectament, alimentant-nos quan necessitàvem. Finalment, la Mariiii, no sabia ni per on començar tampoc. Al principi teníem una relació més cordial però ara ja és amiatat, amiatat. !Mari eres la mejor! No sé qué haríamos sin ella realmente, ya que me saca de cualquier apuro que tengo en algún momento. Nos compenetramos superbién, me encanta trabajar, hablar, discutir, llorar, reír, salir con ella. Mari es única en su especie, ya que te ayuda cuando lo necesitas y

sin que se lo pidas, se adelanta a tus pensamientos, te hace detallitos inesperados y te deja notas imprevistas que te hacen sonreír. Le quiero agradecer todos estos años aprendiendo juntas, que se han hecho más llevaderos, y todos sus consejos y ayudas. ¡No cambies nunca!

Ara hauria de parlar de les meves nenes, la Maria, la Candela i l'Aroa, que hem compartit tants moments i tan bons que no sé ni per on començar. Que haig de dir de la Maria, la meva nena, companya, amiga des de fa tant de temps. Ella és una persona detallista, excepcional, alegre al màxim, m'encanten les seves historietes, els seus drames, tot el que l'acompanya. Hem viscut tantes coses juntes, que això encara ens ha unit més, sobretot aquell congrés a Stresa, que va ser genial! Allà va ser on va començar la nostra relació més enllà de la feina, on vam compartir moments, algun durillo després de la presentació oral (jajaja), però bones estones en aquella preciosa ciutat. A partir de llavors, ja va començar aquesta amistat que s'ha anat enfortint amb els anys i amb el treball colze amb colze i que mai espero perdre. Encara recordo aquella nit a l'hotel d'Atenes, mirant 50 sombras i discutint la pel·lícula al llit, va ser genial! Maria, continua així, amb la teva personalitat graciosa, que sempre em treus un somriure quan arribes, la teva manera de ser i transmetre els sentiments (que a mi em costa), la teva sinceritat, tot en conjunt, con canviis mai! Ai la Candela, que al principi pensava que era una cosa i després em va sorprendre la seva personalitat amagada! També una persona excel·lent, animada, riallera, que junt amb la Maria, podrien fundar el club de les tardones (jajaja). Aquests anys juntes han estat genials, hem compartit al màxim els bons moments amb la Maria també, i els que no van ser tan bons. Això ens va ajudar a reforçar i millorar la nostra amistat, que no espero no es trenqui mai. Junt amb l'Aroa, que es va incorporar més tard, formen tàndem perfecte, els meus Zipi-Zape del lab. Tot i venir més endavant, l'Aroa es va integrar perfectament al nostre grup, per la seva personalitat "hater", que m'encanta, els seus cactus i els seus pantalons de ratlles, no canviis! Junt amb la Candela, formen les SexyTropis més guais de la planta! La relació amb l'Aroa ha estat més curta, però intensa des del principi, ja que va aparèixer just en el moment que tocava per ajudar-nos en un mal moment. Va marxar a Madrid, però això no va frenar la nostra amistat, encara es la va enfortir més. Els nostres esmorzars, dinars, xerrades amb te i cafè, això no s'oblida mai. Elles sempre estan allà quan les necessites, en bons i mals moments, per escoltar-

Agradecimientos

te, aconsellar-te, ajudar-te, animar-te, fer-te riure...i lo millor va ser aquest últim viatge a Amsterdam, que vam poder compartir les quatre juntes. Espero que aquesta amistat no s'acabi mai i continuï igual o millor juntament amb la Mari també. Us estimo!

També voldria agrair als altres grups de recerca de la planta, com el grup d'hepatitis dirigit per Dr. Francisco Rodríguez, Paco para los amigos. Sempre m'han agradat les seves converses matineres i el seu interès per la teva feina. També recalcar a la Marta, que m'ha ajudat molt amb el tema del Junior i ara amb el Misesq i en altres temes fora de la feina. També voldria agrair les batalletes que hem compartit amb el grup de Recerca, amb la Thais, l'Alba, l'Albert i l'Anna, dirigits pel Dr. Juanjo González.

Cal no oblidar els alumnes de màster i grau que han passat pel nostre grup i he dirigit personalment, com en Javi, l'Anna, la Paula, en Jordi, l'Alba i en Pau. Ells/es també han enriquit aquest camí cap a la tesi doctoral amb les seves preguntes i dubtes.

Per altra banda, m'agradaria anomenar a la meva família, Carme i Pere i me germana Gemma, que també han ajudat en aquest camí, no només en el curs de desenvolupament de la carrera universitària, sinó també posteriorment, en l'ajuda amb la nena quan ho necessitava. Els meus amics de tota la vida, en Pere, la Gemma, la Sandra, en Victor i l'Àlex, que han estat allà quan els he necessitat i també per fer-me desconnectar quan ho requeria amb els seus jocs de taula, rialles i converses. També les meves amigues de la Uni, l'Evuxii, l'Anna i la Carla, que m'han recolzar durant tots aquests anys i que hem compartit com cadascuna anava creant la seva vida investigadora, excepte la Carla jajajaj. Han estat un anys genials, de riures, dinars, festes, berenars amb les mamis, que no vull oblidar. Gràcies per tot wapes!

Finalment, voldria parlar de la meva família, creada durant aquests anys que he compartit amb tota la gent de Vall d'Hebron, el meu marit Arnau i els meus nens, Laia i Carles (a punt de sortir). L'Arnau sobretot ha hagut de suportar les meus estats d'ànim, bons i dolents, en aquests cinc anys de tesi doctoral, i per això li agraeixo el seu suport, ajuda i comprensió en tot moment. Llavors va aparèixer la Laia, la meva nena, que sense els seus somriures, rialles, tonteries no hauria desconnectat mai dels meus pensaments de la feina. A vegades crec que hauria d'haver estat més estones amb ella i l'Arnau, però les que hem compartit, han estat al màxim i encara ens queden moltes juntament amb en Carles. Us estimo!

ABREVIATURAS

AA: Aminoácido

ADN: Ácido desoxirribonucleico

ARN: Ácido Ribonucleico

CAP: Centro de Atención Primaria

CAR: *Coxsackievirus Adenovirus Receptor*

CCAA: Comunidades Autónomas

CDHR3: *Cadherine Human Receptor 3*

CEIm: Comité de Ética de Investigación con medicamentos

CMBD: Conjunto Mínimo de Base de Datos

CV: Coxsackievirus

DAF: *Decay-Accelerating Factor*

E: Echovirus

ECDC: *European Centre for Disease Control and Prevention*

EUA: Estados Unidos de América

ESCV: *European Society for Clinical Virology*

EV: Enterovirus

FMDV: *Food Mouth Disease Virus*

GPEI: *Global Poliomielitis Eradication Initiative*

HUVH: Hospital Universitari Vall d'Hebron

IBM: *International Business Machines*

ICAM-1: *Intercellular Adhesion Molecule 1*

IRES: *Internal Ribosome Entry Site*

ITRS: Infección del Tracto Respiratorio Superior

ITRI: Infección del Tracto Respiratorio Inferior

LCR: Líquido cefalorraquídeo

LDLR: *Low Density Lipoprotein Receptor*

MPB: Enfermedad Mano-Pie-Boca

MPBa: Enfermedad Mano-Pie-Boca atípica

NCBI: *National Centre for Biotechnology Information*

NJ: *neighbor-joining*

OMS: Organización Mundial de la Salud

PCR: *Polymerase Chain Reaction*

PFA: Parálisis Flácida Aguda

PV: Poliovirus

PVR: *Poliovirus Receptor*

RDRP: *RNA dependent RNA polymerase*

RF: *Recombination Form*

RIQ: Rango Inter-cuartílico

RT: Retrotranscripción

RV: Rinovirus

UCI: Unidad de Cuidados Intensivos

VG: Virus de la gripe

VPg: *Virus Genome-linked Protein*

VRS: Virus respiratorio sincitial

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS	6
ABREVIATURAS	11
RESUMEN	18
INTRODUCCIÓN	20
1. Familia <i>Picornaviridae</i>	20
1.1. Enterovirus y Rinovirus	21
1.1.1. Taxonomía y clasificación.....	21
1.1.2. Estructura y organización genómica	22
1.1.2.1. Proteínas estructurales	24
1.1.2.2. Proteínas no estructurales	25
1.2. Ciclo infeccioso (o ciclo replicativo viral)	26
1.3. Evolución de los picornavirus	28
1.4. Patogenia e Inmunidad	29
1.4.1. Enterovirus	29
1.4.2. Rinovirus.....	30
1.4.3. Manifestaciones clínicas de los picornavirus	31
1.4.3.1. Parálisis Flácida Aguda	32
1.4.3.2. Enfermedad mano-pie-boca y herpangina	32
1.5. Epidemiología de los picornavirus	33
1.5.1. Brotes mundiales por enterovirus.....	34
1.5.1.1. EV-D68	34
1.5.1.2. EV-A71	34
1.6. Diagnóstico virológico de los picornavirus	35
1.7. Prevención y tratamiento	35
1.7.1. Vacunas de enterovirus.....	36
1.8. Sistemas de vigilancia de los enterovirus	37
1.8.1. Estructura de la Red Mundial de Laboratorios Antipoliomielíticos.....	38
1.8.2. Sistema de Vigilancia de Poliomieltis en España	39
HIPÓTESIS	39
OBJETIVOS	41
MATERIAL Y MÉTODOS	43
1. Diseño general de la investigación	43

2. Estudio 1: Estudiar la prevalencia, estacionalidad, diversidad genética y características clínicas de los enterovirus en el Hospital Universitario Vall d’Hebron durante el periodo comprendido entre las temporadas 2014-2015 y 2016-2017.	43
2.1. Muestras y pacientes	43
2.2. Detección de los enterovirus	44
2.3. Caracterización de los enterovirus por análisis filogenético	44
2.4. Análisis estadístico de los datos demográficos y clínicos	47
2.5. Aspectos éticos	47
3. Estudio 2: Describir la prevalencia, estacionalidad, diversidad genética y características clínicas de los enterovirus causantes de MPB o herpangina en pacientes pediátricos atendidos en atención primaria durante una temporada de vigilancia (2017 – 2018).	49
3.1. Diseño del estudio	49
3.2. Pacientes y muestras	49
3.3. Detección y caracterización de los enterovirus	49
3.4. Caracterización de los CV-A6 en base a las secuencias completas de los genes VP1 y 3Dpol	50
3.5. Análisis estadístico de los datos demográficos y clínicos	50
3.6. Aspectos éticos	50
4. Estudio 3: Estudiar la prevalencia, estacionalidad y diversidad genética de los rinovirus en el Hospital Universitario Vall d’Hebron durante el periodo comprendido entre las temporadas 2014-2015 y 2016-2017.	52
4.1. Muestras, pacientes y detección de los rinovirus	52
4.2. Análisis filogenético y caracterización de los rinovirus	53
4.3. Análisis estadístico de los datos demográficos y clínicos	54
4.4. Aspectos éticos	55
5. Estudio 4: Estudiar la capacidad de discriminación de la técnica molecular de rutina para la detección de los virus respiratorios entre los diferentes picornavirus (enterovirus y rinovirus).	57
5.1. Muestras, pacientes, detección y caracterización de los picornavirus	57
5.2. Aspectos éticos	57
RESULTADOS	59
1. Estudio 1: Estudiar la prevalencia, estacionalidad, diversidad genética y características clínicas de los enterovirus en el Hospital Universitario Vall d’Hebron durante el periodo comprendido entre las temporadas 2014-2015 y 2016-2017.	59
1.1. Prevalencia de los enterovirus durante 2014-2017	59
1.2. Caracterización molecular de los enterovirus	60
1.3. Manifestaciones clínicas	63

2. Estudio 2: Describir la prevalencia, estacionalidad, diversidad genética y características clínicas de los enterovirus causantes de MPB o herpangina en pacientes pediátricos atendidos en atención primaria durante una temporada de vigilancia (2017-2018).	67
2.1. Prevalencia y diversidad genética de los enterovirus detectados	67
2.2. Diversidad genética y clínica de CV-A6	68
3. Estudio 3: Estudiar la prevalencia, estacionalidad y diversidad genética de los rinovirus en el Hospital Universitario Vall d’Hebron durante el periodo comprendido entre las temporadas 2014-2015 y 2016-2017.	74
3.1. Prevalencia de los rinovirus	74
3.2. Caracterización molecular de los rinovirus	74
3.3. Distribución por edades y datos clínicos	76
4. Estudio 4: Estudiar la capacidad de discriminación de la técnica molecular de rutina para la detección de los virus respiratorios entre los diferentes picornavirus (rinovirus y enterovirus).	79
DISCUSIÓN	81
CONCLUSIONES	97
REFERENCIAS	101
ANEXOS	114

RESUMEN

Los picornavirus son una familia muy amplia de distintos géneros de virus, entre ellos, el género *Enterovirus*, donde se encuentran las especies de enterovirus (EV) y rinovirus (RV) que infectan humanos y otros mamíferos. Dentro de cada especie, además, existe una gran variedad de tipos diferentes, hasta más de 200, que infectan a humanos. Los RV son los principales causantes de infecciones del tracto respiratorio superior, tanto en niños como adultos, mientras que los EV pueden causar un gran abanico de presentaciones clínicas diferentes, sobre todo en población pediátrica, desde las más leves como enfermedad mano-pie-boca, herpangina o enfermedad respiratoria, hasta formas más graves como miocarditis, meningitis o incluso parálisis flácida aguda. La diversidad genética de estos virus es muy amplia y el hecho que la inmunidad generada por estos picornavirus sea tipo-específica causa que a lo largo de la vida de una persona puedan ocurrir varias infecciones. Además, tampoco existe un tratamiento antiviral específico, sólo sintomatológico, aunque el impacto en la población sea importante, sobre todo por el hecho también de los distintos brotes asociados a enfermedad neurológica grave por infección por EV descritos. No se debe olvidar, asimismo, que estos virus ARN tienen una alta capacidad de cambio, a través de mutaciones puntuales y eventos de recombinación, hecho que dificulta su estudio, por la posible emergencia de nuevas cepas recombinantes que podrían estar relacionadas con formas clínicas más graves. Por esta razón, la vigilancia, no solo epidemiológica, sino también virológica y clínica, de estos virus debe ser constante y activa, ya que se trata de información valiosa para estar preparados frente a la aparición de brotes o nuevas cepas.

En esta tesis doctoral, se describe la prevalencia, la epidemiología, la diversidad genética y las características clínicas de estos dos picornavirus estudiados durante cuatro temporadas consecutivas. Además, no solo se detallan tipos de virus asociados a presentaciones clínicas más graves detectadas a nivel hospitalario, sino también a formas más leves (EV) estudiadas a nivel de atención primaria.

INTRODUCCIÓN

Los picornavirus forman parte de la familia *Picornaviridae*, nombre que se puso con la intención de transmitir el pequeño tamaño de estos virus (pico=pequeño) junto con el tipo de material genético que constituye su genoma (ARN). Estos virus han jugado un papel importante en la mejora de la virología moderna, como el inicio de la propagación de los virus en cultivo celular, el método de cuantificación de la infectividad viral (ensayo de placa), el desarrollo de las primeras vacunas, o bien por el descubrimiento de la primera ARN polimerasa ARN dependiente gracias al estudio de los poliovirus (PV), el virus animal causante de la enfermedad pie-boca (FMDV) o el virus de la hepatitis A (1).

Los picornavirus comprenden una gran variedad de virus distintos responsables de un amplio abanico de enfermedades, más o menos graves, que pueden afectar tanto a seres humanos como a animales (de la familia bovina, porcina, equina, aviar y también simios), como por ejemplo, la poliomiелitis (por PV), el resfriado común, hepatitis A o enfermedad pie-boca (por FMDV) (1, 2). El hecho que estos virus puedan ser la causa de enfermedades muy graves como la poliomiелitis es lo que ha conllevado a su estudio más profundo y exhaustivo por parte de los virólogos.

1. Familia *Picornaviridae*

La *Picornaviridae* es una gran familia de virus ARN perteneciente al orden de los *Picornavirales* que está actualmente compuesta por 110 especies agrupadas en 47 géneros distintos, entre ellos, el género *Enterovirus* donde se encuentran las especies de rinovirus (RV) y enterovirus (EV) (2, 3).

Los RV son los principales causantes de infecciones del tracto respiratorio superior (ITRS) en niños y adultos (4), mientras que los EV pueden causar un amplio espectro de manifestaciones clínicas, leves como enfermedad mano-pie-boca (MPB) o enfermedad respiratoria, hasta más graves como miocarditis, meningitis o parálisis flácida aguda (PFA) (5).

1.1. Enterovirus y Rinovirus

El estudio de los EV se remonta a inicios del siglo XX (1908) por el estudio del agente causal de la poliomielitis, enfermedad infecciosa de etiología viral causada por los PV, ocasionando una parálisis permanente de las extremidades. A partir de su aislamiento en cultivo celular y la utilización de métodos serológicos que evidenciaron distintos serotipos, se inició su estudio (6). Por otro lado, los RV no se descubrieron hasta 1956, como principales agentes causales del resfriado común, aunque posteriormente también se los ha asociado a neumonía o bronquiolitis, e incluso con la exacerbación de enfermedad respiratoria crónica de etiología inmunológica como el asma (7).

1.1.1. Taxonomía y clasificación

Los EV y RV pertenecen al género *Enterovirus*, formado por 15 especies, en las que se encuentran las 4 especies de EV (EV-A, -B, -C y -D) y las 3 especies de RV (RV-A, -B y -C) que infectan a humanos, además de otras especies de EV que infectan a animales (**Tabla 1**) (8). Inicialmente y hasta 2009 en una clasificación previa, los RV se consideraron un género distinto al de los EV, por sus diferencias respecto a su tropismo celular y manifestaciones clínicas. Sin embargo, fueron reclasificados dentro de un mismo género (*Enterovirus*) por la gran similitud a nivel de organización genómica y estructural.

Tabla 1. Clasificación actual de las distintas especies que conforman el género *Enterovirus* (8).

Nomenclatura actual	Nomenclatura anterior
<i>Enterovirus A</i>	<i>Enterovirus humano A</i>
<i>Enterovirus B</i>	<i>Enterovirus humano B</i>
<i>Enterovirus C</i>	<i>Enterovirus humano C</i>
<i>Enterovirus D</i>	<i>Enterovirus humano D</i>
<i>Enterovirus E</i>	<i>Enterovirus bovino (grupo A)</i>
<i>Enterovirus F</i>	<i>Enterovirus bovino (grupo B)</i>
<i>Enterovirus G</i>	<i>Enterovirus porcino B</i>
<i>Enterovirus H</i>	<i>Enterovirus simio A</i>
<i>Enterovirus I</i>	-
<i>Enterovirus J</i>	<i>Virus simios no clasificados</i>
<i>Enterovirus K</i>	-
<i>Enterovirus L</i>	-
<i>Rinovirus A</i>	<i>Rinovirus humano A</i>
<i>Rinovirus B</i>	<i>Rinovirus humano B</i>
<i>Rinovirus C</i>	<i>Rinovirus humano C</i>

Dentro de cada especie de EV y RV, se han descrito un gran número de serotipos (ya que la clasificación tradicional estaba basada en estudios serológicos), que actualmente denominamos como tipos por su clasificación en base a la secuencia parcial del genoma. Según la clasificación actual, en el caso de los EV, 25 tipos completan la especie EV-A, 63 la EV-B, 23 la EV-C y 5 la EV-D, mientras entre los RV, 80 tipos pertenecen a la especie RV-A, 32 la RV-B y 55 la RV-C (**Tabla 2**) (3, 8).

Tabla 2. Clasificación actual de todos los tipos de cada una de las especies de EV y RV (3).

ESPECIES	TIPOS
EV-A (25 tipos)	Coxsackievirus A2 (CV-A2), CV-A3-A8, CV-A10, CV-A12, CV-A14, CV-A16, EV-A71, EV-A76, EVA89-92, EV-A114, EV-A119-121 y los enterovirus de simios SV19, SV43, SV46 y enterovirus del babuino A13(BA13)
EV-B (63 tipos)	Coxsackievirus B1 (CV-B1), CV-B2-6, CV-A9, Echovirus 1 (E-1; incl. -8), E-2-7, E-9 (incl. CV-23), E-11-21, E24-27, E-29-33, enterovirus B69 (EV-B69), EV-B73-75, EV-B77-88; EV-B93, EV-B97-98, EV-B100-101, EV-B106-107, EV-B110-113, y el enterovirus de simios SA5
EV-C (23 tipos)	Poliovirus (PV) 1-3, Coxsackievirus A1 (CV-A1), CV-A11, CV-A13, CV-A17, CV-A19-22, Av-A24, EV-C95-96, EV-C99, EV-C102, EV-104-105, EV-C109, EV-C113 y EV-C116-118.
EV-D (5 tipos)	EV-D68, EV-D70, EV-D94, EV-D111 y EV-D120
RV-A (80 tipos)	A1, A2, A7-A13, A15, A16, A18-A25, A28-A34, A36, A38-A41, A43, A45-A47, A49-A51, A53-A68, A71, A73-A78, A80-A82, A85, A88-A90, A94, A96, A100-A109
RV-B (32 tipos)	B3-B6, B14, B17, B26, B27, B35, B37, B42, B48, B52, B69, B70, B72, B79, B83, B84, B86, B91-B93, B97, B99, B100-B106
RV-C (55 tipos)	C1-C55

1.1.2. Estructura y organización genómica

Los EV y RV son virus con un genoma constituido por una molécula de ARN monocatenaria, lineal y polaridad positiva de aproximadamente unas 7,500 y 7,200 bases, respectivamente. Esta molécula de ARN está compuesta por una región 5' no traducida (5'UTR, *untranslated region*) unida a un péptido (VPg: *virus genome-linked protein*), cuya función es la de actuar como iniciador en la replicación viral al carecer de estructura *cap*, seguida de un único marco abierto de lectura (ORF, *Open Reading Frame*), y acabando con una cola 3' poliadenilada o poli(A). Dentro de la región 5'UTR,

Introducción

se encuentran diferentes estructuras secundarias importantes para la replicación como el sitio interno de entrada al ribosoma (IRES, *Internal Ribosome Entry Site*).

Este único ORF codifica para una poliproteína, la cual primero se escindirá en 3 subunidades (P1, P2 y P3), y que posteriormente se escinden en las 11 proteínas virales, por acción de las proteasas virales. A partir de la subunidad P1 se obtienen las 4 proteínas estructurales que conforman la cápside viral (VP1, VP2, VP3 y VP4), mientras que las subunidades P2 y P3 dan lugar a las 7 proteínas no estructurales (2A, 2B, 2C, 3A, 3B, 3C y 3D), que están implicadas en la replicación viral o el procesamiento de la poliproteína, al sintetizar la VPg, la proteasa y la ARN polimerasa ARN dependiente (RDRP, *RNA-dependent RNA polymerase*) (**Figura 1**) (9, 10).

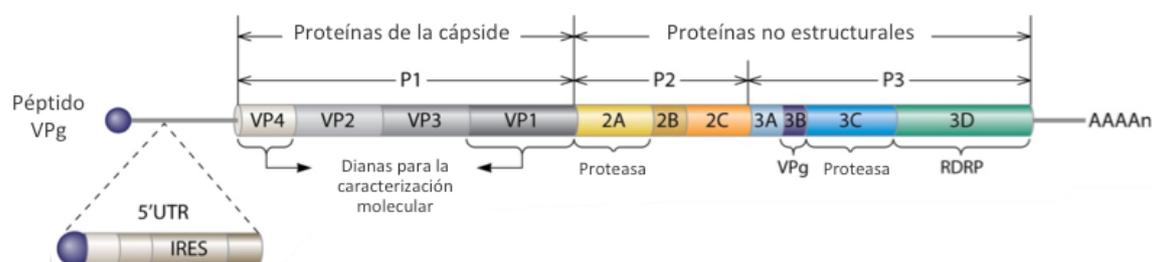


Figura 1. Organización del genoma de los EV y RV. Un único marco abierto de lectura codifica para la poliproteína que se dividirá en las subunidades P1 (proteínas estructurales), P2 y P3 (proteínas no estructurales). Imagen adaptada de Jacobs *et al.* 2013 (11).

La partícula vírica de ambos picornavirus es de pequeño tamaño (30nm de diámetro), esférica y sin envoltura lipídica. Su estructura está compuesta por agrupamientos de cinco unidades protoméricas dispuestas en 12 pentámeros, formando una estructura pseudoesférica rígida con una simetría icosaédrica. Cada uno de estos protómeros está compuesto por las proteínas VP1, VP2 y VP3, que se encuentran en la parte externa del virión conformando la capa proteica y definen las características antigénicas del virus, mientras la proteína VP4 reside dentro de la capa proteica para la unión de la cápside con el núcleo (12) (**Figura 2**).

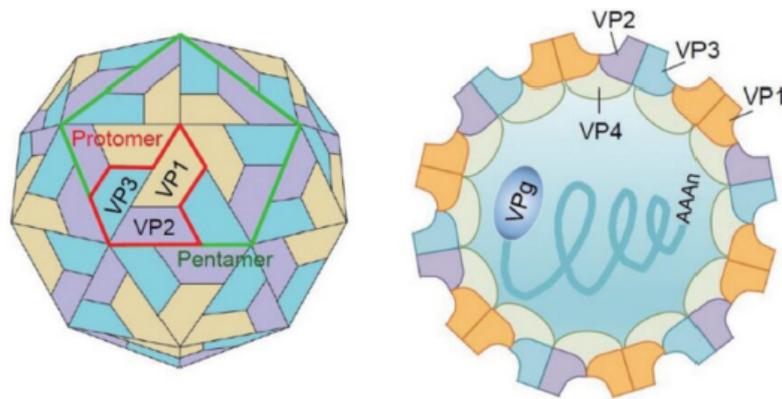


Figura 2. Estructura externa de la partícula viral. Presenta una morfología icosaédrica formada por 60 protómeros, en la que cada uno está constituido por las cuatro proteínas estructurales (VP1-VP4). Imagen procedente Yuan J *et al.* 2018 (13).

1.1.2.1. Proteínas estructurales

La VP1, compuesta por 297 aminoácidos (aa), es la proteína encargada de iniciar la infección. Es la proteína más externa, el principal determinante del tropismo viral, ya que, en su superficie a modo de depresiones encontramos el sitio de unión al receptor celular, además de ser el principal determinante antigénico. En la superficie de la VP1 encontramos, también, los diferentes epítopos antigénicos. Al ser una proteína externa, se encuentra bajo la presión selectiva del sistema inmunitario del huésped y de la población, y por eso, la proteína VP1 es altamente variable. Esta elevada variabilidad le confiere diferentes características antigénicas, y que identificadas mediante sueros tipo-específicos (método fenotípico) permite su clasificación en diferentes serotipos dentro del género *Enterovirus* (13).

La VP2 es una proteína de 254aa que tiene varios epítopos neutralizantes (14), siendo considerada como una diana potencial para el diseño de nuevas vacunas, mientras la VP3 con 245aa contiene un epítipo altamente conservado, que la convierte en una diana ideal para el uso de terapias basadas en anticuerpos monoclonales (15).

Finalmente, la proteína VP4 (69aa) es la proteína más conservada entre las proteínas estructurales, al encontrarse en el interior de la partícula viral, por lo que está considerada también como una de las principales dianas para el desarrollo de anticuerpos monoclonales (16).

1.1.2.2. Proteínas no estructurales

La proteína 2A es una cisteína proteasa de 150aa aproximadamente, que tiene un papel importante en la replicación viral al ser la encargada de una primera escisión de la poliproteína en las subunidades P1 (proteínas estructurales) y P2/P3 (proteínas no estructurales) (**Figura 3**), además de participar en la apoptosis celular, la patogénesis y la evasión del sistema inmune (17, 18).

La proteína 2B es una proteína pequeña, hidrofóbica, de unos 100aa, encargada de formar un canal iónico que actúa como bomba de iones cloruro. Los picornavirus son virus citolíticos, que liberan la progenie de viriones a partir de la lisis de la célula huésped. Mediante el bombeo de iones cloruro, la permeabilidad de la membrana se ve afectada, incrementando así la liberación de partículas virales e induciendo además la apoptosis celular (19, 20).

La proteína 2C es una proteína altamente conservada de 329aa involucrada en la síntesis del ARN viral (1). El extremo N-terminal contiene una zona rica en aminoácidos hidrofóbicos con actividad de unión a membrana, que actúan en el reclutamiento de proteínas del huésped para la formación del complejo de replicación viral. Además, tiene un dominio de unión al ARN que le permite anclarlo a las membranas para su replicación (1, 18, 20).

La proteína 3A se trata también de una proteína de unión a membrana de 86aa y está involucrada en las interacciones proteína-proteína durante la replicación. Se encarga de reclutar distintos factores del huésped para la formación del complejo de replicación junto a la proteína 2C (1, 20-22).

La proteína 3B (22aa), es la que se conoce también como VPg, y es la que se encarga de actuar como iniciador de la replicación viral tanto en la síntesis del ARN de polaridad positiva como el de polaridad negativa (18, 22).

La proteína 3C es la otra cisteína proteasa de 184aa, que tiene actividad proteolítica y de unión al ARN, además de inducir apoptosis. Tienen un papel vital en la segunda escisión de la poliproteína para dar lugar a las proteínas estructurales y no estructurales a partir de las P1, P2 y P3 (**Figura 3**) (18). Además, también tiene un

papel crítico en la evasión del sistema inmune y en la regulación de la apoptosis a través de varios mecanismos como la activación de caspasas (23, 24).

Finalmente, la proteína 3D es una polimerasa de 462aa que actúa como la ARN polimerasa ARN dependiente durante la replicación del virus (13, 18), además de contribuir a la evasión de la respuesta inmunitaria mediada por interferón (IFN) (25).

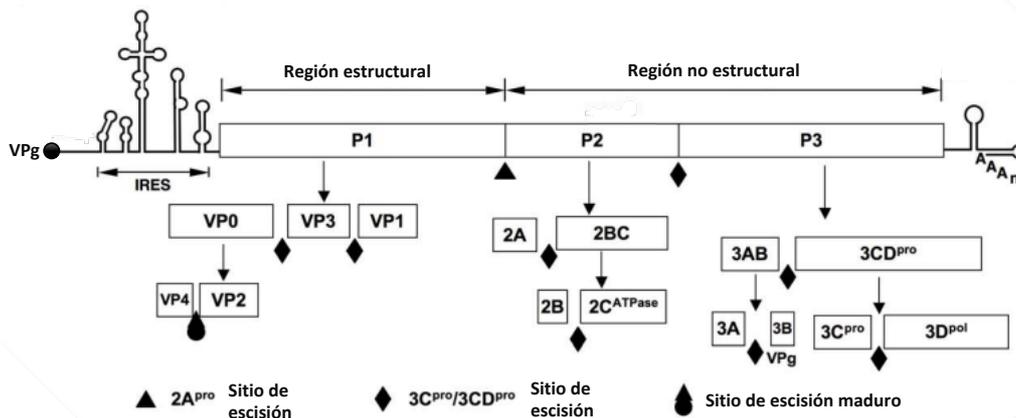


Figura 3. Sitios de escisión de la poliproteína precursora por las proteasas 2A (triángulo) y 3C (rombo). Organización de la poliproteína precursora viral en las distintas regiones y subregiones precursoras a las proteínas finales maduras, tanto estructurales como no estructurales. Imagen adaptada de Liu Y *et al.* 2010 (26).

1.2. Ciclo infeccioso (o ciclo replicativo viral)

El proceso de infección se inicia con la unión de la proteína viral VP1, mediada por el sitio de unión al receptor, con la molécula de la superficie celular del huésped que actúa como receptor. Estos receptores celulares pueden variar según la especie y el tipo de virus, aunque un mismo virus también puede utilizar el receptor de forma aislada, o bien junto a un correceptor, para su entrada. Algunos de estos receptores son compartidos por varios picornavirus, pero también con miembros de otras familias virales (**Figura 4**). Por ejemplo, los miembros de la familia de las inmunoglobulinas, como la molécula de adhesión intercelular (ICAM-1) son utilizados por la mayoría de los RV-A (91 tipos), por todos los RV-B y también algunos tipos de EV (CV-A13, CV-A18 o CV-A21); el receptor de PV (PVR), es exclusivo de este tipo de EV; el receptor de adenovirus y coxsackievirus (CAR), para los CV-B1 al CV-B6; el receptor de lipoproteína de baja densidad (LDLR), por otros tipos de RV-A (10 tipos restantes); el factor de

Introducción

decaída acelerada (DAF) es utilizado por una gran variedad de tipos de EV, como los coxsackievirus (CV-B1, CV-B3 o CV-B5) y la mayoría de echovirus (E-3, E-6, E-7, E-11-13, E-20, E-24 o E-30); las integrinas, en el caso de algunos echovirus (E-1, E-8 y E-9); la familia de las mucinas, como el ligando 1 de la glicoproteína P-selectina, en el caso de CV-A16 y EV-A71; y, finalmente, los miembros de la familia de la cadherina humana 3 (CDHR3), exclusivos de los RV-C (1, 2, 27) (**Figura 4**).

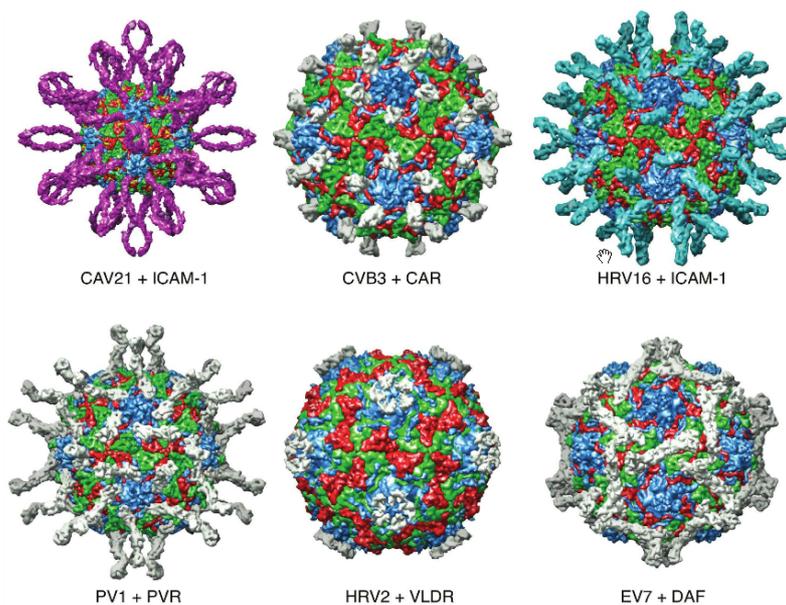


Figura 4. Interacciones de varios Picornavirus con sus respectivos receptores celulares. Receptor tipo inmunoglobulina como ICAM-1, el CAR, PVR, lipoproteína de baja densidad (VLDL) o el DAF (1).

Una vez la VP1 se ha unido al receptor celular, se inicia el proceso de adsorción del virus en el interior del citoplasma por endocitosis. Dentro de las endosomas y con un pH ácido, los viriones se someten a cambios conformacionales que acaban con la disociación de las proteínas de la cápside viral. Esta disociación permite la liberación de la VP4 que abre un poro en la membrana del endosoma liberando el ARN viral en el citoplasma de la célula huésped (1). Una vez libre en el interior celular, el genoma viral recluta la maquinaria celular a través del motivo IRES para la traducción de la poliproteína gracias al péptido VPg, que actúa como iniciador. A partir de las proteasas virales (2A y 3C), se escinde la poliproteína de forma autocatalítica, primero en las subunidades P1, P2 y P3, y más tarde en las diferentes proteínas estructurales y no estructurales. Cuando hay suficiente cantidad de proteínas virales para la replicación, la polimerasa 3D sintetiza una copia completa del ARN genómico (de polaridad negativa) que servirá de molde para la síntesis de la una nueva molécula de ARN, pero

de polaridad positiva, que formará parte de las nuevas partículas virales, como paso previo a su liberación por lisis celular de la célula huésped (**Figura 5**) (1).

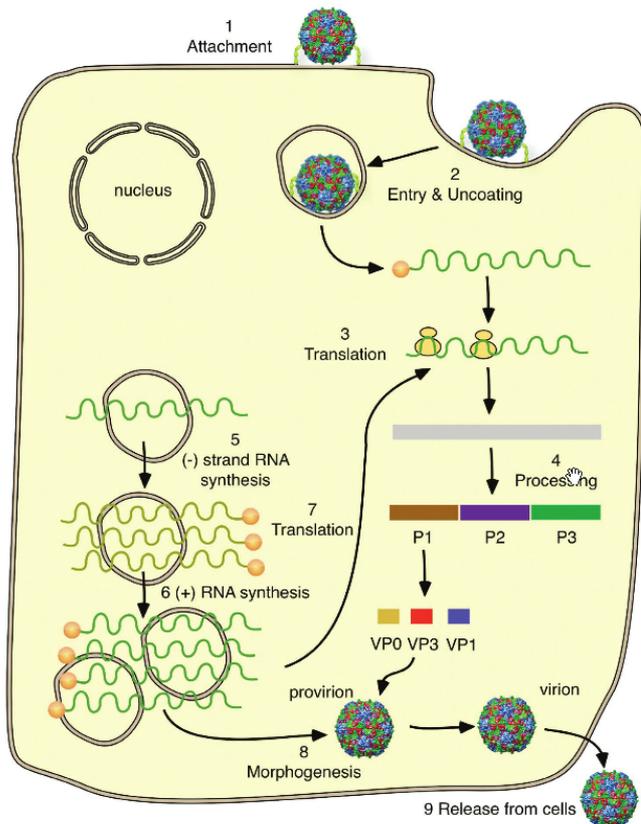


Figura 5. Esquema general del ciclo de replicación de los Picornavirus. El virus se une al receptor celular (1) y el genoma se desencapsida (2). La VPg se separa del ARN viral, para que se traduzca posteriormente (3). La poliproteína se escinde para producir las distintas proteínas virales (4). La síntesis del ARN se lleva a cabo en las vesículas de la membrana. El ARN (+) se replica para formar el ARN (-) (5), que después se utiliza para generar más ARN (+) (6). Los ARN (+) de nueva síntesis se traducen para producir suficientes proteínas virales adicionales al inicio de la infección (7). Posteriormente, estos ARN (+) entran en fase morfogénica (8) y las nuevas partículas virales se liberan de la célula huésped a través de la lisis celular (9) (1).

1.3. Evolución de los picornavirus

Como la mayoría de los virus ARN, los picornavirus se caracterizan por su gran diversidad genética que han adquirido gracias a dos mecanismos: mutaciones al azar en su genoma y eventos de recombinación homóloga. En el caso de los EV, estos mecanismos evolutivos permiten su mejor adaptación a presiones selectivas y un mayor tropismo para un amplio rango de tejidos donde poder replicar, lo que acaba dando lugar a diferentes cuadros clínicos (28).

Los errores producidos por la polimerasa viral 3Dpol, ya que carece de actividad correctora, son la fuente de estas mutaciones puntuales en estos virus ARN, con una tasa de mutación entre 10^{-3} y 10^{-4} nucleótidos. Aunque esta tasa de mutación es variable según la región del genoma, la selección de estos cambios y, por tanto, de estas variantes virales, será dependiente de las presiones selectivas a las que se exponen. Esto explica una mayor tasa de cambio en las proteínas de la cápside, donde se localizan los epítomos que determinan sus características antigénicas, debido a la

gran presión selectiva ejercida por una respuesta del sistema inmune en continua “actualización” (29).

Por otro lado, los eventos de recombinación homóloga ocurren cuando dos cepas en cocirculación coinfectan una misma célula huésped. Es, entonces, en el momento de la replicación, cuando los virus intercambian entre sí diferentes regiones de su genoma, creando así nuevas variantes genéticas (recombinantes). Estos eventos de recombinación homóloga son causados por saltos de la polimerasa de una región a otra, los cuales son más frecuentes en la región codificante de las proteínas no estructurales (30). La recombinación es un fenómeno frecuente entre los RV, pero sobre todo entre los EV, incluso entre cepas pertenecientes a diferentes especies, aunque lo típico es entre tipos de la misma especie (31, 32).

1.4. Patogenia e Inmunidad

El ser humano es el principal huésped natural de estos dos picornavirus, aunque algunos mamíferos como los primates también pueden ser susceptibles a la infección. La población pediátrica menor de 5 años es la más susceptible a la infección, pero también se describen casos en adultos, sobre todo de infecciones por RV.

1.4.1. Enterovirus

El principal mecanismo de transmisión de los EV es por vía feco-oral, además del contacto directo o indirecto con secreciones de la nasofaringe, de la conjuntiva, heces o por fómites (33). Los EV infectan las células epiteliales de la mucosa de la nasofaringe y posteriormente las células del tejido linfoide del intestino (Placas de Peyer). Los EV son estables a pH ácido, ya que mantienen la infectividad a valores de pH 3 o inferior, lo que permite que mantengan su viabilidad a su paso por el tracto digestivo (1).

Después de este primer contacto, cursa una primera viremia, que acostumbra a ser controlada por la respuesta inmunitaria del huésped. Esta primera viremia es en muchos casos asintomática. Sin embargo, en el caso de no poder controlar la infección, esta da lugar a una segunda viremia con posterior diseminación a otros tejidos u órganos periféricos a través del torrente sanguíneo, como el sistema nervioso central (SNC), causando los diferentes síndromes clínicos que se asocian a la infección por EV. Esta diseminación dependerá del tropismo de cada uno de los tipos de EV (**Figura 6**)

(33). Esta primera viremia suele ocurrir a los 2-3 días post-infección, pero los signos y síntomas asociados a una segunda viremia, sobre todo si hay diseminación al SNC, se pueden manifestar hasta 5-16 días después del inicio de la infección (34).

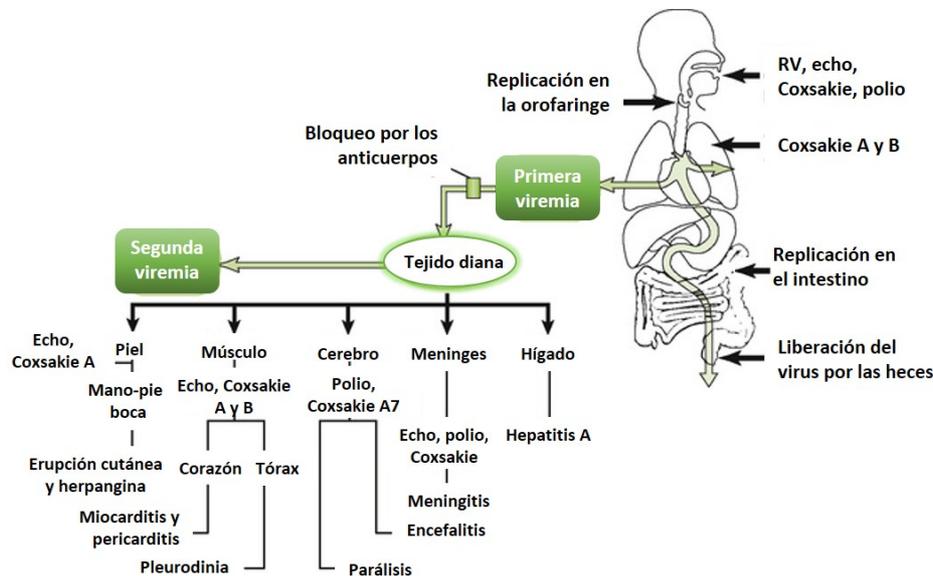


Figura 6. Esquema de la patogénesis de la infección por EV. Imagen adaptada de Murray *et al.* 2009 (35).

A diferencia de otras infecciones virales, en que la inmunidad celular es la primera barrera de defensa del huésped, en el caso de los EV la respuesta es humoral, principalmente mediante la producción de anticuerpos del tipo IgG, IgM e IgA a partir de los 7-10 días del inicio de la infección. Esta respuesta humoral suele ser tipo-específica. Además, la edad es un factor determinante para la infección de EV y la mayoría de las primoinfecciones se producen en la infancia. No obstante, a lo largo de la vida de una persona, es posible que ocurran infecciones causadas por distintos tipos de EV (34, 36), ya que se ha comentado que esta inmunoprotección es tipo-específica.

1.4.2. Rinovirus

Para los RV, la transmisión es oral, a través de gotas, por contacto directo con las secreciones respiratorias o también indirecto por fómites (11, 33). Los RV replican mayormente en las células epiteliales del tracto respiratorio superior (TRS), aunque también lo pueden hacer en el tracto respiratorio inferior (TRI). Inicialmente se había descrito que replicaban de forma óptima a 33°C, aunque se han observado pocas diferencias en la capacidad de replicación a 33°C y a 37°C. A diferencia de los EV, los

RV son lábiles en medios con pH ácido, motivo por el cual su replicación se limita al tracto respiratorio.

Una vez iniciada la infección, se activan las vías de señalización que conducen a la excreción de citoquinas (IL-1 β , TNF, IL-8, IL-6, IL-11), quimiocinas, péptidos vasodilatadores y factores de crecimiento típicos de la respuesta inmunitaria innata. Estos mediadores son los responsables de la vasodilatación, permeabilidad capilar y del proceso inflamatorio (37). Posteriormente, la respuesta inmunitaria innata junto a la adaptativa son las que controlan finalmente la infección, con la producción final de anticuerpos específicos IgA e IgG para cada tipo de RV. Por eso, al igual que los EV, un mismo huésped puede infectarse por distintos RV a lo largo de su vida (37). La concentración de RV en las secreciones nasales, además, es muy elevada y dura de 5-7 días, aunque los RV pueden persistir en nasofaringe hasta 2-3 semanas (11).

1.4.3. Manifestaciones clínicas de los picornavirus

Las manifestaciones clínicas de la infección por ambos virus son muy distintas. La mayor parte de las infecciones por EV son asintomáticas o leves, pero un 10% de estas se pueden asociar a complicaciones graves o incluso fatales. Ya que los EV tienen tropismo por diferentes tejidos, se han asociado diferentes síndromes clínicos para cada tipo de EV, y viceversa, un mismo síndrome clínico puede estar causados por diferentes EV, tal como se resume en la **Tabla 3** (36).

Tabla 3. Síndromes clínicos y los enterovirus asociados. Tabla adaptada de la presentación del Dr. Santiago Echevarría Vierna sobre Enfermedades Infecciosas.

ENFERMEDAD	TIPOS PREDOMINANTES
Parálisis flácidas	Polio (1-3); CV-A (7, 9, 10); CV-B (1-5); EV-A71
Meningitis asépticas	CV-A9; CV-B (2, 3, 5, 6); E- (4-7, 9, 11, 19,30)
Meningoencefalitis	CV-A (4, 9, 11, 15); CV-B (2, 3, 5, 6); E- (6, 9); EV-A71
Herpangina	CV-A (1-10, 16, 22); CV-B (1-5); E- (3, 6, 9, 16, 17, 25, 30)
Pleurodinia	CV-A (4, 6, 9, 10); CV-B (1-6); E- (1, 6, 9, 16, 19)
Miocarditis	CV-A (4, 16); CV-B (2-5); E- (9, 22)
Mano-pie-boca	CV-A (5, 6 , 7, 9, 10, 16); CV-B (2-5); EV-A71
Exantemas	CV-A y B (múltiples); E- (9, 16)
Insuficiencia neonatal	CV-B (1-5); E- (11, 18)
Conjuntivitis hemorrágica	CV-A24; EV-A70
Insuficiencia respiratoria alta	CV-A (10, 21, 24); CV-B2; E- (múltiples)
Fiebre sin foco	CV-A y B; E- (múltiples)

Por contra, las infecciones por RV suelen ser leves o asintomáticas y la mayoría de los síntomas se asocian a los efectos de la respuesta inmunitaria del huésped que la infección desencadena, ya que los RV no suelen producir cambios citopáticos importantes. La principal afectación es el TRS, por lo que los principales síntomas son rinorrea y obstrucción nasal, aunque también pueden llegar a causar bronquitis, bronquiolitis y neumonía en niños e inmunodeprimidos. La infección crónica por RV también se ha asociado a exacerbaciones de asma (38, 39). Aunque en muchas ocasiones lo detectamos de forma aislada, en muchos casos los RV se detectan en codetección con otros virus respiratorios y bacterias. Debido a su elevada prevalencia y, sobre todo, a que también se detecta en paciente asintomático, su papel en la enfermedad respiratoria se ha cuestionado, considerándolo en muchos casos un agente colonizador de las vías respiratorias (40, 41).

1.4.3.1. Parálisis Flácida Aguda

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), la PFA se describe como el episodio repentino de parálisis en una o más extremidades en menores de 15 años, con la ausencia o disminución de los reflejos miotáticos. Se la considera una enfermedad tipo poliomielitis causada por los tres tipos de PV (PV1-3), además de por algunos EV no polio (EV-D68 o EV-A71). Por ello, el plan global de erradicación mundial de la poliomielitis (GPEI) coordinado por la OMS se lleva a cabo con la vigilancia de los casos de PFA, y que en el apartado de sistemas de vigilancia (1.8) de los EV se describirá más extensamente (42).

1.4.3.2. Enfermedad mano-pie-boca y herpangina

La enfermedad MPB es un síndrome causado por EV, mayoritariamente leve, muy común en población pediátrica, que se describió por primera vez en 1948 (43). Los síntomas clínicos distintivos (típicos) incluyen una erupción vesicular, lesiones papulares y maculares en la mucosa oral y la piel, y odinofagia (44). Con menor frecuencia, sin embargo, puede presentarse de forma más grave, como una erupción cutánea grave, edema pulmonar, desórdenes circulatorios, meningoencefalitis, encefalitis aséptica, o incluso la muerte. A causa de los brotes a gran escala que ocurren frecuentemente en países de la región Asia-Pacífico (incluyendo Taiwán,

China, Singapur, Hong Kong, Malasia, Vietnam y Tailandia) desde 1998, y las complicaciones graves en que pueden derivar, la enfermedad MPB se ha convertido en un importante problema de salud pública en todo el mundo, motivo por el cual merece reforzarse la vigilancia a nivel clínico y virológico (45).

El 90% de los casos de enfermedad MPB están causados por EV pertenecientes a la especie EV-A, pero también se han descrito casos causados por EV-B, como el CV-B2, el CV-B5 o el CV-B3 (43). Los principales agentes causales de MPB son el EV-A71 y el CV-A16 (46), pero a partir del 2008, el CV-A6 ha adquirido una mayor importancia como causa de brotes de enfermedad MPB (47). La infección por CV-A6 se caracteriza, sin embargo, por causar presentaciones clínicas de MPB atípicas (MPBa), con lesiones en otras áreas anatómicas, como el tronco, las extremidades o las nalgas (47, 48).

Otra enfermedad causada por EV es la herpangina, cuyo agente etiológico principal son los CV-A (49). Suele afectar también a niños entre 3 y 10 años de edad, y los síntomas más comunes son vesículas en el paladar y en la faringe (5).

1.5. Epidemiología de los picornavirus

Los picornavirus pueden detectarse en circulación a lo largo de todo el año en todo el mundo, sobre todo los RV. Los RV no presentan un patrón epidémico como otros virus respiratorios (virus de la gripe, VG, o virus respiratorio sincitial, VRS), pero sí que, en zonas templadas, como es el caso de España, a pesar de poder detectarse durante todo el año, sí tienen picos de mayor detección a principios de otoño (septiembre-noviembre) y primavera (marzo-mayo). Durante estos picos de detección, los RV son la principal causa de enfermedad respiratoria de etiología viral, ya que el 80% de los resfriados comunes están asociados a su infección (4).

Por el contrario, la circulación de EV sí que presenta un patrón de estacionalidad en climas templados, con una circulación principalmente restringida a finales de verano y principios de otoño, y no siempre con un segundo periodo de circulación durante la primavera (50). Los diferentes tipos de EV no polio circulan de forma variable, mientras en algunas regiones geográficas un EV puede ser endémico, en otras regiones puede ser el agente causal sólo de casos esporádicos o brotes locales limitados (36, 51).

1.5.1. Brotos mundiales por enterovirus

Diversos brotes causados por EV se han reportado recientemente alrededor del mundo, pero los más relevantes por su impacto clínico fueron los ocurridos en Norteamérica desde 2014 por EV-D68, y en Europa en 2016 por EV-A71, y que a continuación serán brevemente descritos (52, 53).

1.5.1.1. **EV-D68**

El EV-D68 se identificó por primera vez en 1962 en California en muestras de pacientes con ITRI, como bronquiolitis o neumonía (54). Además, comparte características tanto clínicas como biológicas con los RV, como una mejor replicación a 33°C o la labilidad al ácido, motivos por los cuales previamente había sido clasificado como RV-87 (55).

Antes de 2014, la circulación de EV-D68 había sido esporádica y sólo se había descrito como agente causal de pequeños brotes localizados alrededor del mundo (56). Sin embargo, en 2014, en Estados Unidos (EUA) se reportó una mayor detección de EV-D68, asociado a brotes de gran tamaño, donde algunos de los casos se relacionaron con clínica respiratoria grave (neumonía), especialmente en niños que presentaban patología respiratoria crónica como principal antecedente (57). Además, en comparación a temporadas anteriores, también se observó un mayor porcentaje de casos con complicaciones neurológicas graves, e incluso fallecimientos. Durante ese mismo período, un estudio a nivel europeo describió la circulación de EV-D68 en Europa, aunque con una menor prevalencia, y asociados a una menor gravedad (51).

1.5.1.2. **EV-A71**

El EV-A71 es bien conocido como uno de los principales agentes causales de enfermedad MPB (32). Se reportan anualmente brotes de MPB a gran escala asociados a infección por EV-A71, sobre todo en la región Asia-Pacífico, en los que un porcentaje importante de los casos evolucionan a formas más graves (58). Así por ejemplo, en 2011 se declaró un brote en Vietnam con más de 25.000 casos y 70 fallecidos, y al año siguiente otro en Camboya con más de 60 muertes (59). Recientemente, un brote de rombencefalitis asociado a la infección por EV-A71 ocurrió en Cataluña durante los meses de primavera y verano de 2016, afectando a más de 100 niños, 87 de los cuales presentaban complicaciones neurológicas (53). En ese mismo periodo, también se

reportaron casos similares en otras CCAA españolas y en otros países europeos (Francia, Holanda, Dinamarca, Suecia o Portugal) (60).

1.6. Diagnóstico virológico de los picornavirus

Los primeros métodos de diagnóstico de picornavirus se basaban en su aislamiento en cultivo celular utilizando distintas líneas celulares (61), o bien eran serológicos, como los ensayos de seroneutralización (62). Sin embargo, estos métodos no son adecuados para el diagnóstico microbiológico por diferentes motivos. Estos métodos exigen una gran cantidad de recursos materiales y humanos, de una gran experiencia, con un tiempo de respuesta demasiado largo como para poder tener un impacto en el manejo del paciente. Algunos de estos picornavirus tampoco se pueden aislar *in vitro*, como el RV-C. Y también, entre diferentes tipos existen reactividad cruzada utilizando métodos serológicos. Todos estos inconvenientes, limitan su utilización en el diagnóstico microbiológico, y ha restringido su uso principalmente a los laboratorios de referencia (62, 63). Así, los métodos moleculares, aunque no exentos de desventajas, se han impuesto en la detección de EV y RV en muestras clínicas para el diagnóstico y la caracterización genética. Los métodos moleculares para su detección se basan principalmente en la amplificación y detección de la región no codificante 5'UTR, la cual está altamente conservada entre los miembros del género *Enterovirus* (63, 64), mientras los métodos moleculares para su caracterización no utilizan esta región ya que este grado de conservación no permite discriminar entre ellos. Así, para esta caracterización genética se utilizan regiones con una mayor variabilidad, como las que codifican para las proteínas de la cápside, VP1 para EV y VP4/2 para RV, según recomienda la OMS (63).

1.7. Prevención y tratamiento

La mayor parte de las infecciones causadas por picornavirus suele ser asintomáticas o leves, por lo que el tratamiento se limita a paliar los efectos de los síntomas, en el caso que los hubieran (tratamiento de soporte). Por eso, la principal profilaxis para este tipo de infecciones es la implementación de medidas de control y prevención de la transmisión del virus por gotas, mediante el uso de mascarillas, la correcta higiene de

manos, limpieza y desinfección de superficies y evitar el contacto con personas enfermas, sobre todo de aquellos pacientes con mayor riesgo de infección (11, 36).

Además, no existe un tratamiento antiviral específico para alguno de los virus, aunque existen opciones de tratamiento adicionales en caso de pacientes con complicaciones graves, sobre todo para EV, como la administración de inmunoglobulinas como apoyo al sistema inmunitario (65).

Si bien, sí están disponibles algunas vacunas frente a algunos EV en particular, como la vacuna frente a los virus de la polio, o frente al EV-A71, en las zonas donde tiene un carácter endémico (Asia-Pacífico), aunque todavía no ha sido posible el diseño de una vacuna “universal” como profilaxis de la infección por cualquier EV a causa de la dificultad para poder desarrollar una vacuna frente a un virus con tal diversidad genética y antigénica (11).

1.7.1. Vacunas de enterovirus

Como se ha comentado anteriormente, la poliomielitis es una enfermedad infecciosa, principalmente causada por PV, en la que el virus infecta el sistema nervioso del huésped causándole una parálisis irreversible de forma casi inmediata (66). Como principal prevención de estas complicaciones derivadas de la infección, la principal herramienta de prevención es la vacunación. A finales de los años 50, se desarrollaron dos vacunas frente a estos virus, que con su administración masiva y sistemática en la población ha permitido diseñar un plan de erradicación, basándose en una elevada cobertura vacunal y llevando a cabo una vigilancia continuada (67). Sin embargo, su erradicación sólo ha sido posible en Europa, el Pacífico Occidental y América y todavía en algunos países subdesarrollados africanos y asiáticos se siguen detectando casos en la población.

Para los PV, existen dos opciones de vacuna: una vacuna de virus inactivado (Salk) de administración parenteral trivalente (incluye PV-1, PV-2 y PV-3), y una vacuna de virus atenuado (Sabin) también trivalente o monovalente de administración oral. Esta segunda opción (oral), además de ser altamente inmunogénica, ha permitido su administración masiva a la población a nivel mundial alcanzando mejores resultados de inmunización poblacional. No obstante, esta vacuna de administración oral tiene como

contrapartida la posible reversión de la cepa vacunal (atenuada) a la cepa salvaje, pudiendo así causar la enfermedad. Por ello, en las regiones donde se ha conseguido la completa erradicación de los virus, se recomienda el uso de la vacuna inactivada en el calendario vacunal en su lugar, como ya se hizo en España en 2004, para evitar estos casos de poliomielitis a consecuencia del virus vacunal (66, 68).

En el caso de los EV no polio, existen vacunas tipo-específicas para EV-A71 y CV-A16, unas aprobadas y otras en diferentes fases de ensayo clínico (**Tabla 4**), para aquellas regiones geográficas con una elevada prevalencia o donde son frecuentes brotes de la enfermedad MPB. Así por ejemplo, a principios de 2016, se aprobaron dos vacunas inactivadas frente a EV-A71 en China, pero existen 7 vacunas más (inactivadas, atenuadas o basadas en partículas virales) que están en fases clínicas iniciales o preclínicas (69).

Tabla 4. Vacunas en desarrollo para EV-A71 y CV-A16 (69)

Vacuna EV	Tipo	Cepa	Subgenotipo	Línea celular	Estado	Organización (Región)
EV-A71 monovalente	Inactivada	FY-23	C4	KMB17	Aprovada	CAMS (China)
	Inactivada	H07	C4	Vero	Aprovada	Sinovac (China)
	Inactivada	FY7VP5	C4	Vero	Fase III completa	Beijing Vigoo (China)
	Inactivada	E59	B4	Vero	Fase I completa	NHRI (Taiwán)
	Inactivada	-	B3	Vero	Fase I completa	Inviragen (Singapur)
	Inactivada	E59	B4	Vero	Preclínica	Adimmune (Japón)
	Atenuada	BrCr	A	Vero	Preclínica	NIID (Japón)
	VLP	neu	C2	Sf9	Preclínica	Universidad de Taiwán
	VLP	G082	C4	Sf10	Preclínica	IPS-CAS (China)
CV-A16 monovalente	Inactivada	SZ05	B1b	Vero	Preclínica	IPS-CAS (China)
	Inactivada	CC024	B	Vero	Preclínica	Hospital de Jilín (China)
	Péptidos	SZ05	B1b	Sintéticas	Preclínica	IPS-CAS (China)
	VLP	GD09/119	B	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Preclínica	Instituto de Microbiología (China)
EV-A71/CV-A16 bivalente	Inactivada	FY573&G08	C4&B	Vero	Preclínica	IPS-CAS (China)
	VLP	FY&09-7	C4&B	Sf9	Preclínica	IB-CAS (China)
	VLP	SB12736-SAR-03&SB3512/SAR/00	-	Sf9	Preclínica	Universidad de Queensland (Australia)
	VLP	G082&SZ05	C4&B1b	Sf9	Preclínica	HuaLan (China)

CAMS: Chinese Academy of Medical Sciences; IB-CAS: Institute of Biophysics, Chinese Academy of Sciences; IPS-CAS: Institute Pasteur of Shanghai, Chinese Academy of Sciences; NHRI: National Health Research Institute; NIID: National Institute of Infectious Diseases; and VLP: virus-like particles.

1.8. Sistemas de vigilancia de los enterovirus

En 1988, con el fin de erradicar la poliomielitis se diseñó la “Iniciativa Global de Erradicación de la Poliomielitis (GPEI)” basada principalmente en campañas de vacunación intensiva con el fin de reforzar la inmunización de la población. Fue mediante esta estrategia que las zonas de América (1994), del Pacífico Oeste (2000), Europa (2002) y Asia Sud-oriental (2014) pudieron ser declaradas libres de la enfermedad, y reduciendo considerablemente las áreas geográficas con PV endémicos, persistiendo su circulación en países como Afganistán y Pakistán (70, 71). Sin embargo,

todavía hoy se siguen identificando casos importados de PV salvaje, sobre todo de los tipos 1 y 3 en países donde el virus ha sido erradicado (42). Además de los PV salvajes, en el mundo también se detectan casos por virus vacunales, principalmente en zonas donde la vacuna oral (atenuada) todavía se sigue administrando. Estos casos de poliomielitis por virus vacunal suelen ser por PV-2, siendo la eliminación de este tipo un objetivo prioritario para la OMS. Actualmente, se dispone de vacuna monovalente del tipo 2 sólo para el control de brotes (72).

1.8.1. Estructura de la Red Mundial de Laboratorios Antipoliomielíticos

La Red Mundial de Laboratorios Antipoliomielíticos fue creada en 1990 por la OMS y los gobiernos nacionales y está integrada por 145 laboratorios. Su estructura y responsabilidades se dividen en tres niveles institucionales: los laboratorios de referencia nacionales, los laboratorios de referencia regionales, y los laboratorios de referencia globales especializados. Además, en algunos países se han establecido laboratorios subnacionales que llevan a cabo algunas o las mismas actividades que los nacionales, esperando que actúen con los mismos estándares. Todos estos laboratorios son acreditados anualmente y tienen que demostrar su capacidad, fundamental para desempeñar su papel en la erradicación de los PV (71).

Las responsabilidades de los laboratorios nacionales son: (i) aislar e identificar el tipo de PV de muestras fecales; (ii) enviar los aislados a los laboratorios regionales y aportar los resultados, (iii) coordinarse con los investigadores del programa de inmunización, y (iv) coordinar e implementar medidas de contención.

Las tareas de los laboratorios de referencia regionales son: (i) actuar como un laboratorio nacional en países donde no existen; (ii) desarrollar la diferenciación intratípica de los aislados de PV de la región; (iii) distribuir reactivos de referencia como líneas celulares o antisueros; (iv) dar cursos de formación de laboratorio; (v) coordinar los controles de calidad y validación de los centros nacionales; (vi) enviar una selección de aislados de PV para el análisis genómico a los laboratorios globales especializados; y (vii) reportar resultados de forma eficaz, coordinarse con los

investigadores del programa de inmunización y coordinar e implementar medidas de contención.

Finalmente, las obligaciones de los laboratorios especializados globales son: (i) hacer una identificación definitiva de los aislados de virus utilizando todas las tecnologías disponibles (caracterización genética); (ii) preparar y distribuir los estándares, paneles, reactivos y materiales de referencia; (iii) tener consultores de evaluación y asesoría para los laboratorios y aportar formación especializada; (iv) participar en estudios colaborativos y de investigación para la mejora de las técnicas de diagnóstico de PV; y (v) reportar resultados de forma eficaz, coordinarse con los investigadores del programa de inmunización y coordinar e implementar medidas de contención.

1.8.2. Sistema de Vigilancia de Poliomiелitis en España

La vigilancia de PV en España se realiza a través del Sistema de “Vigilancia de la Poliomiелitis”, instaurado en 1998, con la notificación e investigación de cualquier sospecha de poliomiелitis o cuadros de PFA en menores de 15 años. Además, esta vigilancia se complementa (i) con la Vigilancia de los EV, con el objetivo de demostrar la ausencia de PV circulantes entre los EV caracterizados en muestras de pacientes con cuadros clínicos distintos a la PFA, y (ii) con la Vigilancia Medioambiental de aguas residuales para demostrar la ausencia de PV circulantes. Sin embargo, esta última todavía no está instaurada, pero existen las infraestructuras y metodologías necesarias ante posibles alertas de detección o circulación de PV (72).

La vigilancia se inicia con la notificación urgente de todo caso sospechoso de PFA en menores de 15 años. Esta notificación conlleva la investigación epidemiológica, clínica y virológica con el fin de descartar o confirmar el caso de poliomiелitis, para instaurar de forma rápida las medidas de intervención. Se considera caso de PFA prioritario para ser investigado según la OMS aquel cuadro con fiebre en un niño que ha recibido menos de tres dosis de vacuna, que procede de un área endémica, o bien pertenece a un grupo de alto riesgo, como los inmunodeprimidos. También lo son esos casos de PFA de cualquier edad clínicamente sospechosos de poliomiелitis (72).

El Laboratorio Nacional de PV del Centro Nacional de Microbiología (Instituto de Salud Carlos III, Majadahonda, Madrid) coordina el estudio virológico de la PFA. Además, hay

tres laboratorios nacionales más (Cataluña, Andalucía y Canarias) que también realizan esta tarea a través de muestras de heces de pacientes con sospecha de PFA. La técnica de elección para el estudio virológico de estos casos, y la única aceptada por la OMS-Europa, es el aislamiento del virus en cultivo celular, aunque se está avanzando en la estandarización de las técnicas de PCR (72).

El plan de actuación frente a un caso menor de 15 años con sospecha clínica de PFA es, primeramente, declararlo de forma urgente al Servicio de Vigilancia Epidemiológica coordinada por el Centro Nacional de Epidemiología. Una vez recibida la notificación, se cumplimentará una encuesta epidemiológica con todos los datos disponibles y se informará al médico declarante del procedimiento de recogida de las muestras del paciente. Las muestras de elección son heces, 1-2 muestras con un intervalo de 24-48 horas entre ellas, dentro de las dos primeras semanas desde el inicio de los síntomas, además de muestras de suero, aunque de forma opcional (73). En caso de sospechar de un caso importado de PV vacunal o salvaje, se hace una investigación en 5 contactos del caso sospechoso que no certifiquen estar correctamente vacunados. Una vez recogidas las muestras, estas son enviadas al laboratorio de referencia (según la comunidad) junto con la encuesta epidemiológica debidamente cumplimentada (73).

La calidad de la vigilancia de PFA se realiza mediante la notificación mensual a la OMS-Europa de Zero-casos a través del muestreo por parte de los epidemiólogos de los servicios de pediatría, neurología y unidades de curas intensivas (UCI) de los hospitales cuyos laboratorios participan en la red. Además, paralelamente al sistema activo de vigilancia, existe un sistema pasivo de recopilación de datos a partir del Conjunto Mínimo Básico de Datos (CMBD) de Altas Hospitalarias, para asegurar la no pérdida de casos no declarados (72).

A parte de la vigilancia de la poliomielitis, también se realiza una vigilancia de EV que es voluntaria y no está establecida en todo el territorio español. La Red de Laboratorios de Vigilancia de EV está constituida por el Laboratorio Nacional de PV y nueve laboratorios más de Andalucía, Cataluña, Canarias, Navarra, Murcia, Vigo, Zaragoza y Madrid. El laboratorio nacional coordina toda la red de laboratorios con el objetivo de recoger información sobre los EV detectados en muestras clínicas de pacientes de cualquier edad ingresados por cuadros clínicos distintos a la PFA, como la

Introducción

meningitis, encefalitis, infecciones respiratorias, y otros como fiebre, enfermedad MPB, exantema, miocarditis y sepsis neonatal (72).

HIPÓTESIS

Las infecciones causadas por picornavirus suelen ser mayoritariamente asintomáticas o leves, aunque en algunos casos, pueden evolucionar a cuadros clínicos más graves, como miocarditis, encefalitis o PFA, especialmente en el caso de la infección por EV.

La gran diversidad genética descrita para los picornavirus puede ser responsable de un amplio espectro en la presentación clínica de la infección. Si bien la bibliografía hace una asociación entre especies y síndromes, una vigilancia virológica continuada nos permitirá tener un mayor conocimiento de su prevalencia y su circulación en nuestro medio, pero sobre todo describir su diversidad genética para establecer una asociación en relación a la enfermedad, especialmente para las formas más graves. Si, además, se complementa este estudio de los EV detectados en la población hospitalizada con la caracterización de los EV asociados a las formas leves más frecuentes en la comunidad, como son MPB o herpangina, generará un conocimiento que a largo plazo podría ayudar a predecir de forma precoz posibles brotes, y sus complicaciones, que principalmente afectan a la población pediátrica.

Siendo conscientes que la enfermedad por RV o EV tienen una morbilidad asociada diferente, el diagnóstico microbiológico debe ser lo más preciso posible. El desarrollo de métodos de diagnóstico se ha visto comprometido por la gran similitud entre los diferentes picornavirus, y a pesar del avance en las técnicas moleculares no se dispone de las herramientas que permitan discriminar correctamente entre EV y RV. La caracterización molecular de estos picornavirus por secuenciación ayudará a evaluar el rendimiento de las técnicas moleculares de rutina utilizadas en el diagnóstico microbiológico.

OBJETIVOS

1. Estudiar la prevalencia, estacionalidad, diversidad genética y características clínicas de los EV en el Hospital Universitario Vall d'Hebron durante el periodo comprendido entre las temporadas 2014-2015 y 2016-2017 (**Estudio 1**)
2. Describir la prevalencia, estacionalidad, diversidad genética y características clínicas de los EV causantes de MPB o herpangina en pacientes atendidos en atención primaria durante una temporada de vigilancia (2017-2018) (**Estudio 2**)
3. Estudiar la prevalencia, estacionalidad y diversidad genética de los RV en el Hospital Universitario Vall d'Hebron durante el periodo comprendido entre las temporadas 2014-2015 y 2016-2017 (**Estudio 3**)
4. Estudiar la capacidad de discriminación de la técnica molecular de rutina para la detección de los virus respiratorios entre los diferentes picornavirus (enterovirus y rinovirus) (**Estudio 4**)

MATERIAL Y MÉTODOS

1. Diseño general de la investigación

Esta tesis doctoral se compone de cuatro estudios para alcanzar los objetivos propuestos, los cuales se realizaron en la Unidad de Virus Respiratorios del Servicio de Microbiología del Hospital Universitario Vall d'Hebron (Barcelona, Cataluña), el hospital terciario más grande de Cataluña y el segundo a nivel estatal.

2. Estudio 1: Estudiar la prevalencia, estacionalidad, diversidad genética y características clínicas de los enterovirus en el Hospital Universitario Vall d'Hebron durante el periodo comprendido entre las temporadas 2014-2015 y 2016-2017.

2.1. Muestras y pacientes

Desde octubre de 2014 (semana 40/2014) hasta mayo de 2017 (semana 20/2017), fueron recibidas en la Unidad de Virus Respiratorios del HUVH muestras del TRS (aspirados nasofaríngeos o frotis nasal/faríngeos) y del TRI (lavados broncoalveolares, aspirados traqueales o broncoaspirados) para la confirmación virológica de virus respiratorios procedentes de pacientes < 18 años con sospecha de infección respiratoria aguda atendidos o ingresados en este hospital. De aquellos casos confirmados de infección por EV, los datos demográficos (sexo y edad) y la información clínica fue recogida de forma retrospectiva. Las variables clínicas recogidas fueron: enfermedad de base, sintomatología, ingreso hospitalario, días de ingreso, ingreso en la Unidad de Cuidados Intensivos (UCI), días de ingreso en la UCI, motivo de ingreso, requerimiento de soporte respiratorio y diagnóstico final.

Según los protocolos clínicos del hospital se realiza la detección de virus respiratorios en muestras respiratorias cuando existe sospecha de infección respiratoria y el

paciente requiere ingreso hospitalario, o bien se puede beneficiar de un tratamiento antiviral si lo hubiera.

2.2. Detección de los enterovirus

La detección de EV y de otros virus respiratorios se realizó mediante dos versiones de un método comercial basado en una RT-PCR multiplex a tiempo real (Anyplex II RV16 Detection Kit, desde octubre de 2014 hasta noviembre de 2016, o Allplex Respiratory Pannel Assay, desde diciembre de 2016 hasta mayo de 2017, Seegene, Corea). Para ello, primero se realizó una extracción de ácidos nucleicos (ARN y ADN) a partir de 400 µl de muestra respiratoria utilizando NucliSens easyMAG (bioMérieux, Marcy l'Etoile, Francia) y eluyendo en un volumen final de 100 µl, siguiendo las instrucciones del fabricante. Estos eluidos de ácidos nucleicos se utilizaron inmediatamente, o en el caso de demorarse su uso, se mantuvieron congelados a -20°C. Para las muestras recibidas entre octubre de 2014 y noviembre del 2016, se realizó una RT-PCR a tiempo real adicional (Seegene, Corea) que permitía la detección de los diferentes EV como complemento del sistema Anyplex II RV16 Detection Kit, después de haberse demostrado la no detección de algunos de los tipos de EV, tal como se describió anteriormente (74).

Sin embargo, es importante remarcar en este estudio una limitación. Por algoritmo de diagnóstico microbiológico en el Servicio de Microbiología, aquellas muestras previamente confirmadas para VG o VRS mediante sistemas de detección rápido o de *point-of-care* en el laboratorio de urgencias del Servicio de Microbiología durante la epidemia fueron excluidas del análisis, ya que estas no fueron analizadas para la detección de otros virus respiratorios (codetecciones) mediante la RT-PCR multiplex, entre ellos los EV o RV.

2.3. Caracterización de los enterovirus por análisis filogenético

La caracterización de los EV detectados durante el periodo de estudio se realizó mediante la amplificación y secuenciación de la región parcial codificante de la proteína viral VP1. La amplificación de la VP1 se realizó mediante una PCR anidada (GoTaq Green Master Mix, Promega, Wisconsin, EUA) con un paso previo de

retrotranscripción (RT) (First Strand cDNA Synthesis Kit for RT-PCR, Roche Diagnostics, Basilea, Suiza) del ARN y cebadores específicos (**Tabla 5**) según una adaptación del protocolo recomendado por la OMS (59).

Tabla 5. Cebadores utilizados en cada uno de los pasos para la amplificación parcial de la región codificante de la proteína viral VP1 (59). La posición de los cebadores es relativa a la secuencia de VP1 con número de acceso GenBank J02281.

	Cebadores	Secuencia 5'-3'	Programa	Posición
RT	AN32	GTY TGC CA		
	AN33	GAY TGC CA	25 ^o x10'-42 ^o Cx60'- 99 ^o Cx5'-4 ^o C	
	AN34	CCR TCR TA		
	AN35	RCT YTG CCA		
PCR 1	AN224	GCI ATG YTI GGI ACI CAY RT	95 ^o Cx3'- 45c:(95 ^o Cx30''- 42 ^o Cx50''- 60 ^o Cx50')	[2162-2181]
	AN222	C ICC IGG IGG IAY RWA CAT	72 ^o Cx5'	[2915-2897]
PCR 2	AN88	CCA GCA CTG ACA GCA GYN GAR AYN GG	95 ^o Cx3'- 45c:(95 ^o Cx30''- 60 ^o Cx50''- 72 ^o Cx30')	[2573-2598]
	AN89	TAC TGG ACC ACC TGG NGG NAY RWA CAT	72 ^o Cx5'	[2923-2897]

La correcta amplificación se comprobó mediante una electroforesis de ADN en gel de agarosa al 2% utilizando un marcador de peso molecular de 100 pb (NIPPON Genetics Europe, Dueren, Alemania). En el caso de obtener el producto de amplificación esperado, con un tamaño aproximado de 350 pb, este fue posteriormente purificado mediante un tratamiento con nucleasas (Exo-SAP-IT, USB, Affymetrix Inc. Cleveland, Ohio, EUA). Si se observaba la banda esperada junto a otras amplificaciones inespecíficas, ésta era recortada del gel de agarosa y purificada mediante un sistema de columnas (Genelute Gel Extraction Kit, Sigma-Aldrich, Merck, California, EUA). Después de la purificación, ya fuera por un método u otro, se procedió a la reacción de secuenciación con el kit ABI Prism Big Dye Terminator cycle sequencing kit v3.1 (Applied Biosystems, Carlsbad, EUA) para su posterior electroforesis capilar en la plataforma ABI PRISM 3130XL Genetic Analyzer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, EUA), con los cebadores de secuenciación AN88 y AN89 recomendados por la OMS (59). Las secuencias fueron editadas y ensambladas con el programa bioinformático MEGA v5.2 (75). Las secuencias ensambladas se analizaron de forma preliminar utilizando la herramienta “*Enterovirus Genotyping Tool*” disponible en el siguiente enlace: <https://www.rivm.nl/mpf/typingtool/enterovirus/> (76). Sin embargo, para la

caracterización definitiva de los EV, se realizó un estudio filogenético de las secuencias obtenidas en el estudio junto a secuencias de referencia para cada uno de los tipos de cada una de las especies (EV-A, -B, -C y -D) procedentes de estudios epidemiológicos anteriores y disponibles en Genbank (National Centre for Biotechnology Information, NCBI) (**Tabla 6**). Para ello, las secuencias fueron alineadas con la aplicación MUSCLE disponible en MEGA v5.2 (77), y los árboles filogenéticos se construyeron a partir de un método basado en distancias *neighbor-joining* (NJ), tal como implementa MEGA v5.2, utilizando el modelo evolutivo seleccionado (menor puntuación de información Bayesiana y disponible para NJ) (75). La precisión topológica de las ramas internas del árbol se evaluó utilizando el método *Bootstrap* (1000 réplicas). El tipo de EV se escogió cuando el valor de *Bootstrap* de la rama fuera superior al 70%, o bien con aquella secuencia de referencia con la que presentara una mayor similitud.

Tabla 6. Secuencias de referencia del NCBI Genbank utilizadas para el análisis filogenético.

Especie	Tipo de EV	Números de acceso	
EV-A	EV-A71	AB482183	U22521
	CV-A6	JN655886	AB649286
		HE572908	AY421764
	CV-A2	JN203517	
		AY421760	JN203499
	CV-A10	JN255588	AY421767
		HQ728262	GQ214176
	CV-A4	GQ214174	HE572948
		AB457644	AY421762
	CV-A14	AY421769	
CV-A16	AM292442	U05876	
CV-A5	AY421763	GQ253378	
EV-B	E-30	AJ295178	AF152869
	E-5	AF083069	FJ868339
	CV-B3	AY896762	M16572
	CV-A9	D00627	AY466223
		AY573577	
	E-3	AY302553	AY919580
	CV-B4	D00149	S76772
		X05690	
	CV-B5	AY875692	AF114383
	E-6	AY896760	AY302558
	E-18	AF317694	AM236918
	E-11	AJ276224	X80059
	E-9	EF127250	X84981
CV-B2	AF085363	EF174469	

	E-20	AJ241443	AY302546
	E-7	AY302559	DQ227458
	E-21	AM711041	AY302547
	E-16	AY302542	FJ868346
	E-25	AM711079	AY302549
EV-C	EV-C109	GQ865517	JN900470
EV-D	EV-D68	EF107098	AY426531

2.4. Análisis estadístico de los datos demográficos y clínicos

El análisis estadístico se realizó utilizando el paquete estadístico SPSS v22 (IBM, EUA). Las variables categóricas se describieron con frecuencias y proporciones, y las asociaciones entre estas variables se calcularon con el test Chi-cuadrado. Se consideraron estadísticamente significativas aquellas variables con un valor inferior a 0,05.

2.5. Aspectos éticos

Este proyecto fue aprobado por el Comité de Ética de Investigación con medicamentos (CEIm) del HUVH (PR(AG)173/2017).

3. Estudio 2: Describir la prevalencia, estacionalidad, diversidad genética y características clínicas de los enterovirus causantes de MPB o herpangina en pacientes pediátricos atendidos en atención primaria durante una temporada de vigilancia (2017 – 2018).

3.1. Diseño del estudio

Estudio descriptivo, multicéntrico y prospectivo realizado en la Unidad de Virus Respiratorios del HUVH en colaboración con las líneas pediátricas de cinco centros de atención primaria (CAP) (Trinitat Vella, Roquetes, Rio de Janeiro, Chafarinas y Horta 7D) del Servicio de Atención Primaria Muntanya (Barcelona, Cataluña, España), localizados dentro del área de referencia del HUVH.

3.2. Pacientes y muestras

Desde octubre de 2017 (40/2017) hasta junio de 2018 (25/2018), se recogieron frotis de exudado faríngeo en un medio de transporte viral (3 mL) para su confirmación virológica de pacientes pediátricos menores de 15 años con diagnóstico clínico de MPB o herpangina que fueron atendidos en estos CAPs. Las características demográficas (sexo y edad) y clínicas, tales como los síntomas (fiebre, odinofagia, sialorrea, anorexia o decaimiento) o la localización anatómica de la erupción vesicular (lesión orofaríngea, cutánea, peribucal, palma de las manos, planta de los pies, extremidad superior, extremidad inferior, tronco, genital, nalgas u otras localizaciones), también fueron recogidas. Según Gaunt *et al.* 2015 (48), dependiendo de la localización y del tipo de erupción se describieron tres categorías: MPB, cuando se observa erupción cutánea en manos, pies y boca; MPBa, cuando se observa erupción cutánea en áreas distintas a MPB; y herpangina cuando se observan vesículas en la orofaringe.

3.3. Detección y caracterización de los enterovirus

Se utilizaron los métodos de detección y de caracterización por secuenciación ya descritos previamente en los apartados 2.2 y 2.3 del primer estudio.

3.4. Caracterización de los CV-A6 en base a las secuencias completas de los genes VP1 y 3Dpol

Para determinar el linaje (A-D) de CV-A6 , tal como describió Song *et al.* 2017 (78), se secuenció de forma completa la región codificante de la proteína VP1 (915 nt) para su posterior análisis filogenético. Además, con el fin de poder hacer un estudio de eventos de recombinación se secuenció de forma completa la región no estructural 3Dpol (1.383 nt) de CV-A6, comparando los resultados obtenidos para ambas secuencias, de acuerdo a la clasificación en las diferentes formas recombinantes (RF-A a RF-H) descrita por Gaunt *et al.* 2015 (48). Para la secuenciación de las regiones codificantes de VP1 y 3Dpol se utilizaron los cebadores y protocolos previamente descritos por Kanbayashi *et al.* 2017 (44) y Feng *et al.* 2015 (45), respectivamente. La reacción de secuenciación y el análisis filogenético de las secuencias se realizó según lo descrito en los apartados 2.2 y 2.3 del primer estudio. La divergencia evolutiva de las secuencias de la VP1 de las cepas de CV-A6 del presente estudio se determinó utilizando MEGA v5.2 (75).

3.5. Análisis estadístico de los datos demográficos y clínicos

El análisis estadístico se realizó con el paquete estadístico SPSS v22 (IBM, EUA). Se llevó a cabo un análisis descriptivo, con el cálculo de la mediana como medida de tendencia central, así como el rango intercuartílico (RIQ) como medida de dispersión. Las variables categóricas se describieron con frecuencias y proporciones, y las asociaciones entre estas variables se calcularon con los test Chi-cuadrado y Fisher. Se consideraron estadísticamente significativas aquellas variables con un valor inferior a 0,05.

3.6. Aspectos éticos

Este estudio fue aprobado por el Comité de Ética de Investigación con medicamentos (CEIm) del HUVH (PR_AG_145/2017) y la Fundación del Instituto Universitario de Investigación en la Atención Primaria Jordi Gol y Gurina (P17/130).

4. Estudio 3: Estudiar la prevalencia, estacionalidad y diversidad genética de los rinovirus en el Hospital Universitario Vall d'Hebron durante el periodo comprendido entre las temporadas 2014-2015 y 2016-2017.

4.1. Muestras, pacientes y detección de los rinovirus

Para la realización de este estudio se utilizaron las mismas muestras que las empleadas en el primer estudio, así como los mismos sistemas de diagnóstico microbiológico para la detección de virus respiratorios (apartado 2.1 y 2.2 del primer estudio). Adicionalmente, se realizó una RT-PCR a tiempo real cuantitativa y adaptada de Granados *et al.* 2012 (79) (**Tabla 7**) para conocer el valor de Ct para RV (*cycle threshold*), que es indicativo de la carga viral en la muestra respiratoria. Se seleccionaron todas las muestras respiratorias que mediante esta RT-PCR a tiempo real presentaran un valor de Ct inferior a 35 ciclos para así realizar la caracterización por secuenciación y su posterior análisis filogenético. De este modo, así se limitaba un consumo excesivo de material y reactivos para la realización de este estudio, rechazando aquellas muestras que por su baja carga viral en la muestra respiratoria no habría sido posible obtener secuencias para su posterior análisis. Sin embargo, se considera que esta selección no actuaba como sesgo para tener una buena representatividad de secuencias teniendo en cuenta la elevada prevalencia de este virus en la población general según lo descrito en la bibliografía. Además, para el estudio de pacientes longitudinales, solo se tuvo en cuenta la primera muestra positiva de cada paciente correspondiente a cada episodio clínico cuando se recibían varias muestras en un mismo periodo.

Tabla 7. Cebadores, sonda y condiciones modificadas de la RT-PCR a tiempo real de Granados *et al.* 2012 para determinar el umbral de corte (Ct) de las muestras positivas para RV. Posición de relativa a la región 5'UTR (79).

Cebador	Secuencia 5'- 3'	Programa	Posición
386	GCC TGC GTG GCK G	50°Cx30'-95°Cx15'-	[370-386]
552	CAC GGA CAC CCA AAG TAG T	45c:(95°Cx15''-58°Cx20''lectura-	[570-552]
455	TCC TCC GGC CCC TGA ATG YG	72°Cx30'')-4°Cx30''	[455-478]

Sin embargo, es importante remarcar en este estudio la limitación inicialmente comentada en el estudio de los EV. Por algoritmo de diagnóstico microbiológico en el Servicio de Microbiología, aquellas muestras previamente confirmadas para VG o VRS mediante sistemas de detección rápido o de *point-of-care* en el laboratorio de urgencias del Servicio de Microbiología durante la epidemia fueron excluidas del análisis, ya que estas no fueron analizadas para la detección de otros virus respiratorios (codetecciones) mediante la RT-PCR multiplex.

Las características demográficas (sexo y edad) y los datos clínicos se recogieron de forma retrospectiva. Las variables clínicas recogidas fueron: el ingreso hospitalario, exitus y las comorbilidades de los pacientes (diabetes, obesidad, trasplantados, neoplasias, infectados por el virus de la inmunodeficiencia humana, enfermedad renal crónica, prematuridad, enfermedad cardiovascular, enfermedad pulmonar o neumonía). Estos datos de hospitalización y las comorbilidades de los pacientes se extrajeron del CMBD. Un paciente se consideraba hospitalizado por RV si esta infección ocurría durante la estancia hospitalaria (nosocomial) o bien dos días antes de la fecha de ingreso. Las comorbilidades se definieron usando los códigos internacionales de clasificación de enfermedades (CIE-9-CM) basados en la 9ª revisión de la OMS disponible en: <http://www.cie9.com/cie9.pdf>.

4.2. Análisis filogenético y caracterización de los rinovirus

La caracterización de los RV seleccionados durante el periodo de estudio con un valor de Ct < 35 se llevó a cabo mediante la secuenciación y posterior análisis filogenético de la región parcial codificante de la proteína viral VP4/2. La amplificación se realizó mediante el sistema de RT-PCR a un solo paso One-Step RT-PCR Kit (Qiagen, Hilden, Alemania), con los cebadores y protocolo de Savolainen *et al.* 2002b (80) (**Tabla 8**).

Tabla 8. Cebadores, posición relativa y protocolo de amplificación de la región parcial codificante de las proteínas VP4/2 según lo descrito por Savolainen *et al.* 2002b (80).

Cebador	Secuencia 5'- 3'	Programa	Posición
9895	GGG ACC AAC TAC TTT GGG TGT CCG TGT	50°Cx30'-95°Cx15'-	[534-560]
9565	GCA TCI GGY ARY TTC CAC CAC CAN CC	45c:(95°Cx15''-60°Cx')-72°Cx10'	[1083-1058]

La correcta amplificación de la región parcial codificante VP4/2 (tamaño esperado aproximadamente de 500 pb) se confirmó mediante una electroforesis de ADN en gel de agarosa al 1.5%, utilizando un marcador de peso molecular de 100 pb (NIPPON Genetics Europe, Dueren, Alemania). Los productos de amplificación obtenidos se purificaron mediante un tratamiento con nucleasas (Ex-SAP-IT, USB, Affymetrix Inc. Cleveland, Ohio, EUA) antes de proceder a preparar la reacción de secuenciación mediante el kit de secuenciación ABI Prism Big Dye Terminator cycle (Applied Biosystems, Carlsbad, EUA) y los cebadores de secuenciación de la **Tabla 8**. La electroforesis capilar se realizó en un secuenciador ABI PRISM 3130XL Genetic Analyzer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA). Las secuencias fueron editadas y ensambladas con el programa informático SeqScape v2.6 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, EUA). La determinación de la especie y tipo de RV se realizó mediante el análisis filogenético de las secuencias junto con secuencias de referencia de cada uno de los tipos de cada una de las especies (RV-A, -B y -C) obtenidos en estudios epidemiológicos anteriores, y disponibles en Genbank. Para ello, las secuencias fueron alineadas con la aplicación MUSCLE disponible en MEGA v5.2 (77), y los árboles filogenéticos se construyeron a partir de un método basado en distancias *neighbor-joining* (NJ), tal como implementa MEGA v5.2, utilizando el modelo evolutivo seleccionado (menor puntuación de información Bayesiana y disponible para NJ) (75). La precisión topológica de las ramas internas del árbol se evaluó en base del método *Bootstrap* (1000 réplicas). El tipo de RV se escogió cuando el valor de *Bootstrap* de la rama fuera superior al 70% o bien presentara una mayor similitud.

4.3. Análisis estadístico de los datos demográficos y clínicos

El análisis estadístico se realizó con los paquetes estadísticos SPSS v22 (IBM, EUA) y STATA v14 (StataCorp. 2015 Stata Statistical Software: Release 14. College Station, TX: StataCorp LP). Se llevó a cabo un análisis descriptivo, con el cálculo de la mediana como medida de tendencia central, así como el RIQ como medida de dispersión. Las variables categóricas se describieron con frecuencias y proporciones, y las asociaciones entre estas variables fueron calculadas con los test Chi-cuadrado, Mann-Whitney, Odds Ratio y test de la mediana. Se consideraron estadísticamente significativas aquellas variables con un valor inferior a 0,05.

4.4. Aspectos éticos

Este estudio fue aprobado por el Comité de Ética de Investigación con medicamentos (CEIm) del HUVH (PR(AG)201/2015).

5. Estudio 4: Estudiar la capacidad de discriminación de la técnica molecular de rutina para la detección de los virus respiratorios entre los diferentes picornavirus (enterovirus y rinovirus).

5.1. Muestras, pacientes, detección y caracterización de los picornavirus

Para la realización de este último estudio se utilizaron los resultados de detección y caracterización del primer y tercer estudio, así como los mismos sistemas de diagnóstico microbiológico para la detección de virus respiratorios (apartados 2.1, 2.2 del estudio 1; apartado 4.1 del estudio 3). La caracterización de los picornavirus se llevó a cabo mediante la secuenciación de la región codificante parcial de las proteínas VP1 y VP4/2, de los EV y RV, respectivamente (apartados 2.3 del estudio 1 y 4.2 del 3).

5.2. Aspectos éticos

Este proyecto fue aprobado por el Comité de Ética de Investigación con medicamentos (CEIm) del HUVH (PR(AG)173/2017; PR(AG)201/2015).

RESULTADOS

1. Estudio 1: Estudiar la prevalencia, estacionalidad, diversidad genética y características clínicas de los enterovirus en el Hospital Universitario Vall d'Hebron durante el periodo comprendido entre las temporadas 2014-2015 y 2016-2017.

1.1. Prevalencia de los enterovirus durante 2014-2017

Durante el periodo de estudio, en la Unidad de Virus Respiratorios del Servicio de Microbiología del HUVH, se estudiaron 10.260 muestras procedentes de 5.703 pacientes pediátricos (menores de 18 años) para confirmar la presencia de virus respiratorios. Un total de 397 (4%) muestras de 376 (7%) pacientes fueron confirmadas para EV (**Figura 7**).

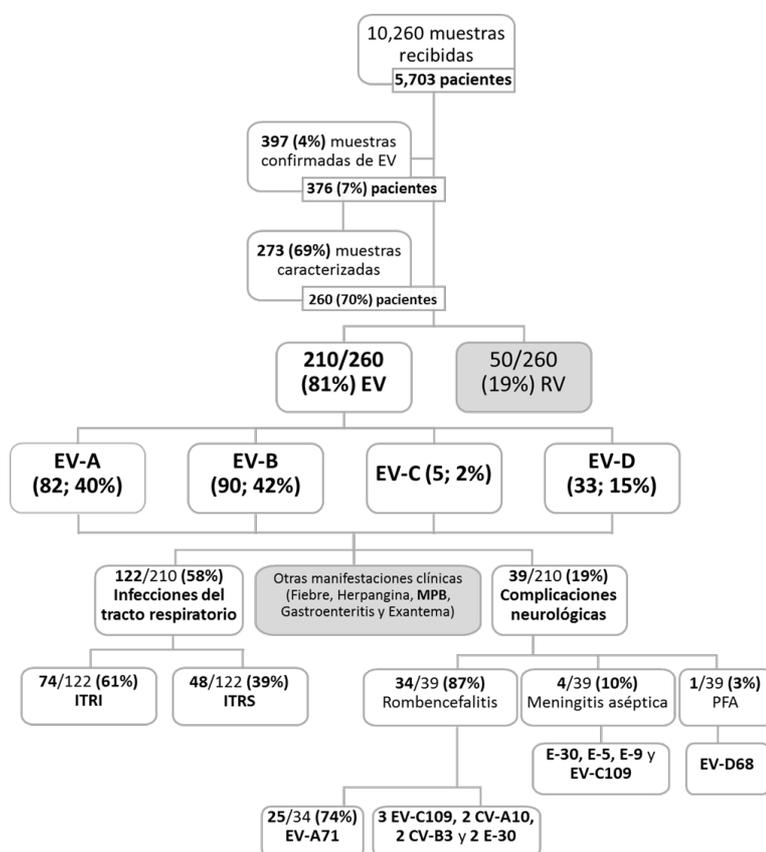


Figura 7. Diagrama de flujo del estudio al completo de los casos confirmados para EV a partir de las muestras estudiadas en el laboratorio: detección, caracterización y características clínicas. EV, enterovirus; E, echovirus; CV, coxsackievirus; y, PFA, parálisis flácida aguda.

Tal como se puede ver en la **Tabla 9**, el 86% (179/210) de las confirmaciones de infección por EV fueron en menores de 5 años, y se pudo observar que el número de casos confirmados disminuía a medida que aumentaba la edad. Además, para estas detecciones no se observaron diferencias ($p=0,198$) entre las diferentes especies respecto a su distribución entre los diferentes grupos de edad (**Tabla 9**).

Tabla 9. Distribución por grupos de edad de las detecciones observadas para las distintas especies de EV.

Grupos de edad	Especie de EV* N (%)				TOTAL
	EV-A	EV-B	EV-C	EV-D	
<2 años	47 (57)	42 (47)	1 (20)	12 (36)	102 (49)
2-4 años	25 (30)	31 (34)	4 (80)	17 (52)	77 (37)
5-14 años	9 (11)	16 (18)	0 (0)	3 (9)	28 (13)
15-64 años	1 (2)	1 (1)	0 (0)	1 (3)	3 (1)
TOTAL	82 (39)	90 (43)	5 (2)	33 (16)	210

*EV: Enterovirus; $p=0,198$

Por otro lado, se pudo observar como las detecciones de EV confirmados por secuenciación se distribuyeron de forma variable a lo largo del periodo de estudio, aunque con picos de detección durante los meses de primavera y de otoño tal como se describe en la **Figura 9**.

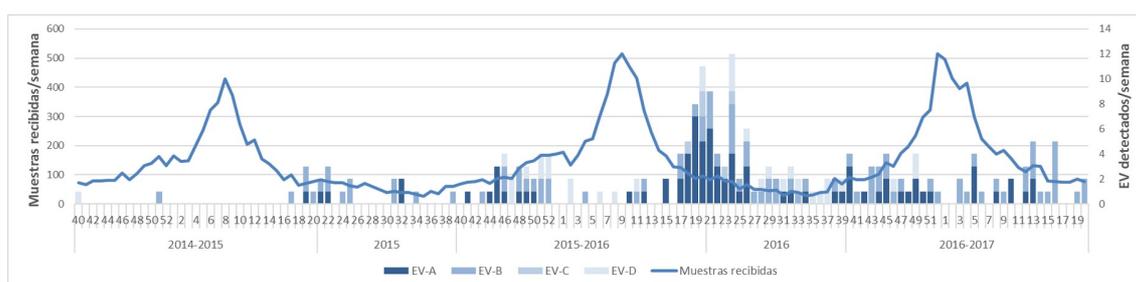


Figura 9. Distribución semanal de los EV detectados (por especie) desde la semana 40/2014 hasta la semana 20/2017.

Sin embargo, mientras algunos tipos de EV se detectaron de forma esporádica, como E-25 o CV-A5, para las diferentes especies otros tipos se observaron de forma más frecuente, tales como EV-A71, en contexto de brote, (35 de los cuales pertenecían al

subgenogrupo C1, y 2 al C2) (**Figura 10A**) y CV-A6 (11/210; 5%) entre los EV-A; E-30 (13/210; 6) y CV-B3 (10/210; 5%) entre los EV-B; el EV-C109 entre los EV-C, sin observar detecciones de PV salvaje, vacunal o derivado de la vacuna; y EV-D68 (29 pertenecientes al subgenogrupo B3, y 3 al B2) (**Figura 10B**) entre los EV-D, tal como se muestra en la **Figura 11**.

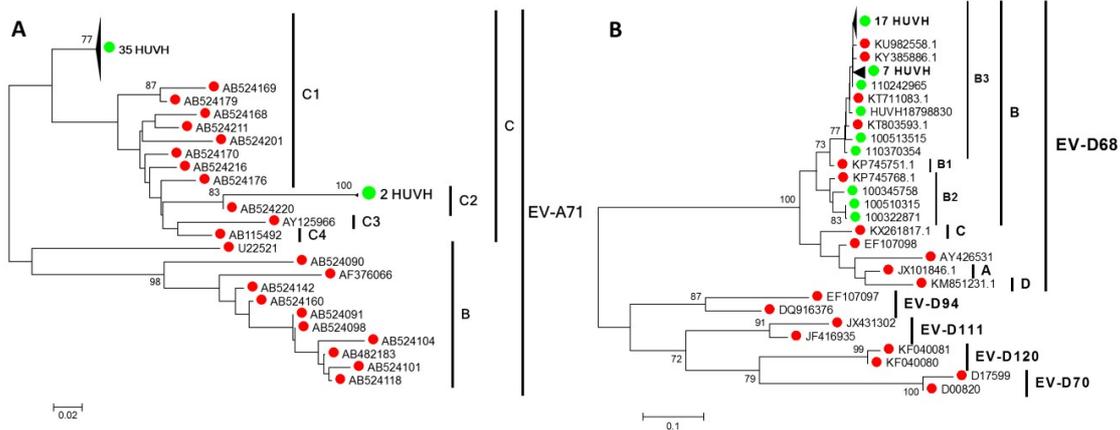


Figura 10. Clasificación filogenética (en subgenogrupos) de EV-A71 (A) y EV-D68 (B) en base a las secuencias parciales de la región codificante de la VP1. Las secuencias del estudio están marcadas en verde, y las secuencias de referencias en rojo.

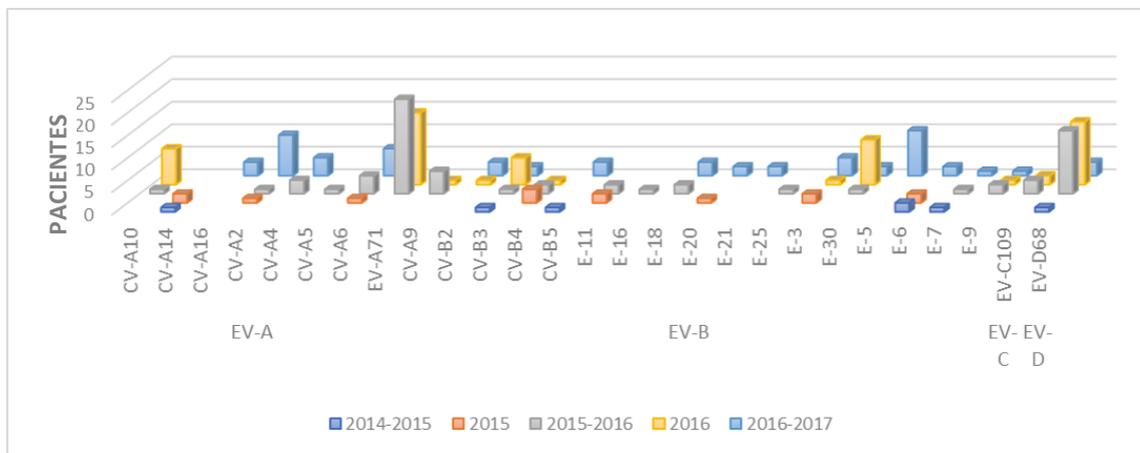


Figura 11. Distribución de los diferentes tipos de enterovirus (EV) detectados durante diferentes periodos de tiempo a lo largo del estudio. Las temporadas de vigilancia (2014-2015, 2015-2016 y 2016-2017) están comprendidas entre octubre y mayo, mientras los periodos intertemporada (2015 y 2016) entre junio y septiembre, aproximadamente. E, echovirus; CV, coxsackievirus.

1.3. Manifestaciones clínicas

Respecto a los síndromes clínicos asociados a infección por EV (**Figura 12**), 151 (72%) pacientes presentaron fiebre, seguido de ITRS o ITRI (122; 58%) con tos, disnea o sibilancias (**Tabla 10**). También se observaron un total de 39 (19%) casos con complicaciones neurológicas y, de forma menos frecuente, los pacientes presentaron exantema (18; 9%), gastroenteritis (13; 6%), herpangina (11; 5%) y MPB (10; 5%).

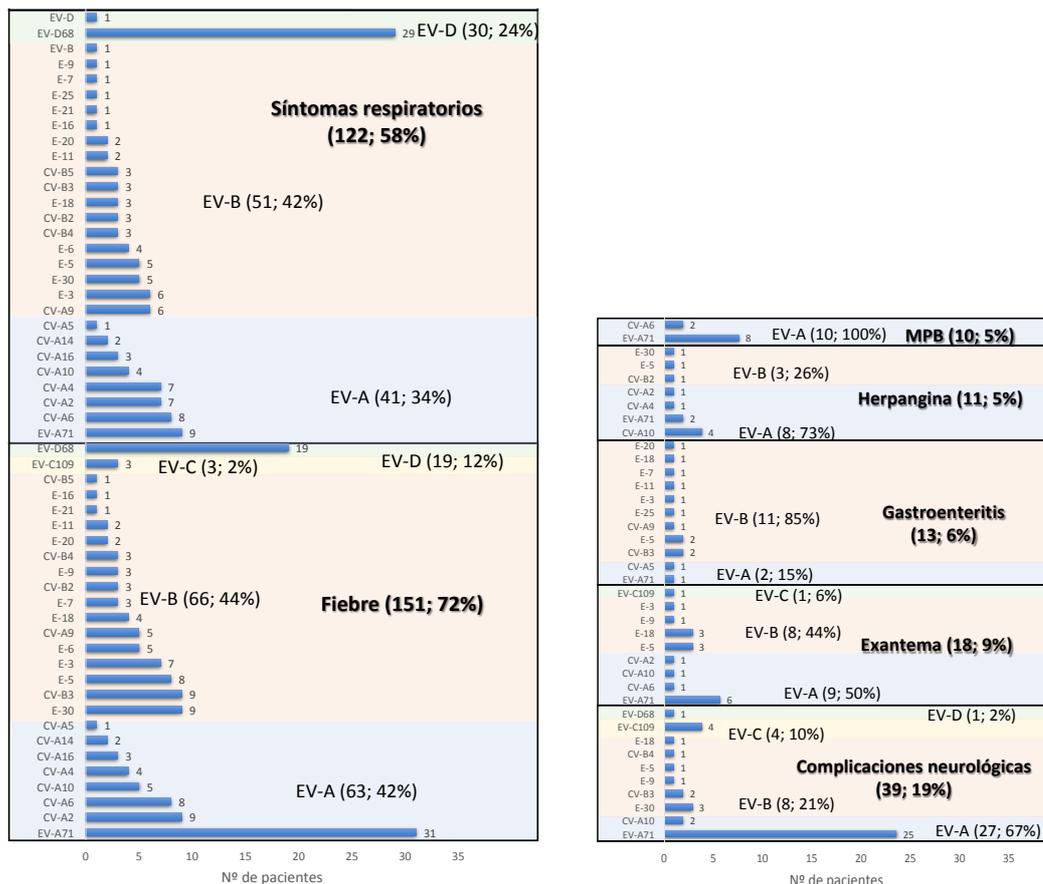


Figura 12. Descripción de los EV (número de casos, especie y tipo) asociados a cada uno de los síndromes clínicos. Los síndromes están enmarcados en negro, mientras las especies de EV se distinguen por colores: EV-A (azul); EV-B (naranja); EV-C (verde); y EV-D (amarillo). E, echovirus; CV, coxsackievirus.

En relación con aquellos EV con una mayor prevalencia, y últimamente con un mayor interés epidemiológico, los datos clínicos asociados a la infección por EV-D68 muestran como este virus estaba mayoritariamente relacionado con ITRI (28/74; 38%) (**Tabla 10**), destacando un caso de PFA y otro de miocarditis. Respecto a las características clínicas, la mayoría de casos de ITRI por EV-D68, eran casos graves, de los que el 11% (3/28)

presentaron fallo respiratorio que requirió ingreso en UCI (1 requirió ventilación mecánica invasiva; 1 ventilación mecánica no invasiva; y 1 con cánula nasal de alto flujo).

Tabla 10. Infecciones por EV (N, %) del tracto respiratorio inferior (ITRI) o superior (ITRS).

Tipo de EV	ITRI (N, %)	ITRS (N, %)	Total (N, %)
EV-D68	28 (39)	1 (2)	29 (24)
EV-A71	4 (5)	5 (10)	9 (7)
CV-A6	6 (8)	2 (4)	8 (7)
CV-A2	2 (3)	5 (10)	7 (6)
CV-A4	4 (5)	3 (7)	7 (6)
E-3	2 (3)	4 (8)	6 (5)
CV-A9	3 (4)	3 (7)	6 (5)
E-30	1 (1)	4 (8)	5 (4)
E-5	2 (3)	3 (7)	5 (4)
E-6	0 (0)	4 (8)	4 (3)
CV-A10	2 (3)	2 (4)	4 (3)
CV-B5	3 (4)	0 (0)	3 (2)
CV-B3	2 (3)	1 (2)	3 (2)
CV-B4	0 (0)	3 (7)	3 (2)
E-18	2 (3)	1 (2)	3 (2)
CV-B2	2 (3)	1 (2)	3 (2)
CV-A16	2 (3)	1 (2)	3 (2)
CV-A14	1 (1)	1 (2)	2 (2)
E-20	2 (3)	0 (0)	2 (2)
E-11	1 (1)	1 (2)	2 (2)
E-7	1 (1)	0 (0)	1 (1)
EV-B	1 (1)	0 (0)	1 (1)
EV-D	1 (1)	0 (0)	1 (1)
CV-A5	1 (1)	0 (0)	1 (1)
E-9	0 (0)	1 (2)	1 (1)
E-16	1 (1)	0 (0)	1 (1)
E-25	0 (0)	1 (2)	1 (1)
E-21	0 (0)	1 (2)	1 (1)
Total	74 (61)	48 (39)	122

Por otro lado, en referencia a los casos con complicaciones neurológicas (39; 19%), 34/39 (87%) eran casos de rombencefalitis, 4 (10%) de meningitis aséptica y 1 (3%) de PFA. En los casos de meningitis aséptica se detectaron diferentes tipos de EV (E-30, E-5, E-9 y EV-C109), como se observa en la **Figura 13**. En cambio, la rombencefalitis se asoció mayoritariamente a la infección por EV-A71 (25/39; 74%), de los cuales 20/25

Resultados: Estudio 1

(80%) tenían confirmación por resonancia magnética nuclear (RMN), y 5/25 (20%) sospecha clínica de rombencefalitis con RMN normal o no realizada. La mayoría de estos casos fueron estudiados durante el brote de rombencefalitis en Cataluña en 2016. Sólo un paciente presentó PFA asociada a la infección por EV-D68 con secuelas invalidantes permanentes, tal como antes se ha comentado (**Figura 13**).

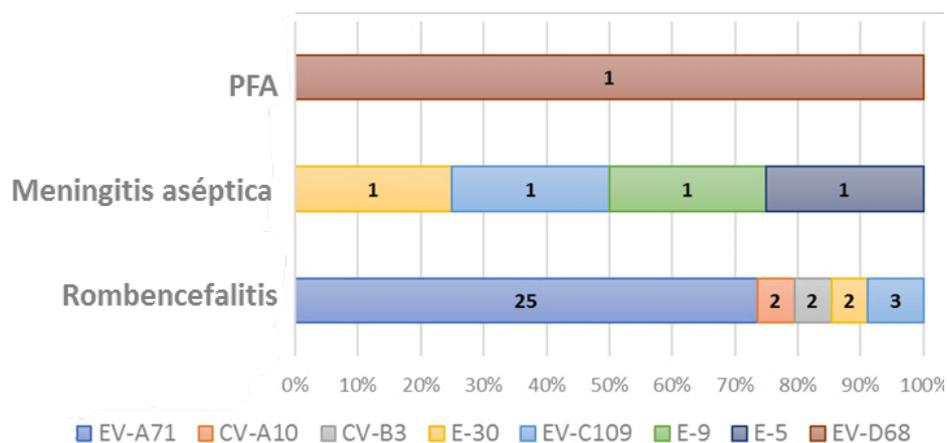


Figura 13. Distribución por síndrome clínico de los 39 casos con complicaciones neurológicas asociados a infección por EV (número, %) en los casos. E, echovirus; CV, coxsackievirus; y PFA, parálisis flácida aguda.

2. Estudio 2: Describir la prevalencia, estacionalidad, diversidad genética y características clínicas de los enterovirus causantes de MPB o herpangina en pacientes pediátricos atendidos en atención primaria durante una temporada de vigilancia (2017-2018).

2.1. Prevalencia y diversidad genética de los enterovirus detectados

Para la realización de este estudio, se recogieron exudados faríngeos de un total de 172 casos (mediana 2 años; RIQ 1-3 años; 105/172 (61%) hombres) de MPBa (125/172; 72%), de herpangina (44/172; 26%) y de MPB (3/172; 2%), para la detección y caracterización (si procede) de EV. En 137 (80%) casos se confirmó la infección por EV mediante RT-PCR a tiempo real de rutina, de los cuales 88/137 (64%) fueron varones (p=0,09). Estos casos confirmados para EV mayoritariamente fueron detectados durante el pico de detección de otoño (semanas 40-48/2017), con algunos casos esporádicos a finales del invierno y principios de primavera (07-25/2018), observando en general una distribución semanal variable, tal como se describe en la **Figura 14**.

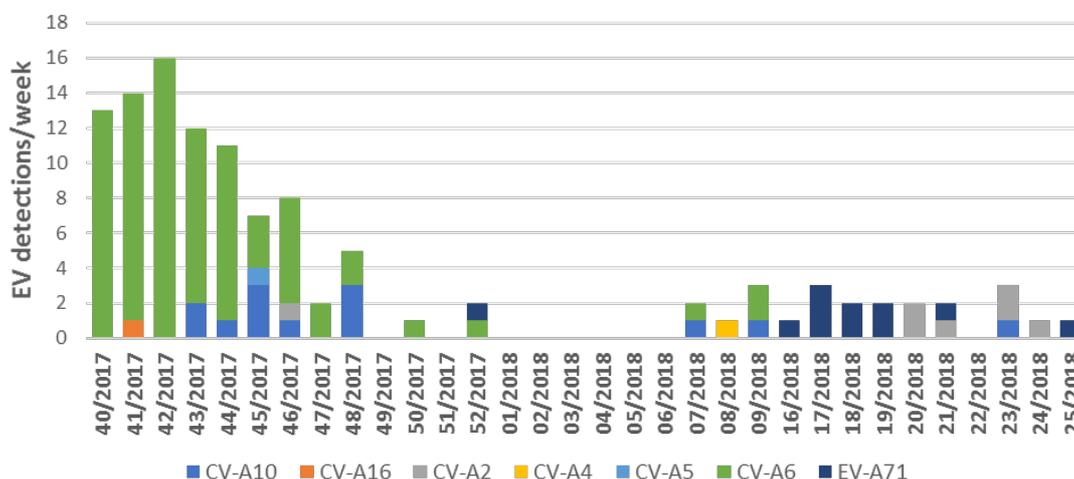


Figura 14. Distribución semanal de los distintos tipos de enterovirus (EV) detectados durante el periodo de estudio. Coxsackievirus (CV).

De los casos detectados, 124/137 (91%) virus pudieron ser secuenciados en base a la secuencia parcial de la región codificante de la proteína VP1, de los cuales la mayoría (115/124; 93%) pertenecieron a la especie de EV-A, y unos pocos a EV-B (6; 5%) y a RV-

A (3; 2%), tal como se observa en la **Tabla 11**. De estos casos caracterizados, 99/124 (80%) estaban relacionados con MPBa, 23/124 (18%) con herpangina y 2/124 (2%) con MPB.

Tabla 11. Enterovirus (EV) caracterizados en base a la secuencia parcial codificante de la proteína VP1 viral (especie y tipo) durante el periodo de estudio. Los porcentajes están calculados respecto al total de cada una de las especies de EV. E, Echovirus; CV, coxsackievirus, y RV, rinovirus.

ESPECIE DE EV	N (%)
EV-A	115 (93)
CV-A6	80 (70)
CV-A10	13 (11)
EV-A71	11 (9)
CV-A2	7 (6)
CV-A4	2 (2)
CV-A5	1 (1)
CV-A16	1 (1)
EV-B	6 (5)
E-9	3 (50)
E-6	2 (30)
CV-B3	1 (20)
RV-A	3 (2)
TOTAL	124

Como se ha comentado, mayoritariamente se detectaron EV pertenecientes a la especie EV-A, especialmente CV-A6 (80/115; 70%). Sin embargo, se observaron diferencias en la caracterización de los EV-A detectados durante otoño e invierno-primavera. Así, mientras los virus CV-A6 fueron más frecuentemente detectados en otoño de 2017, otros tipos de EV, como EV-A71 (11/115; 9%) o CV-A10 (13/115; 11%) fueron más frecuentemente detectados durante la primavera de 2018 (**Tabla 11**).

2.2. Diversidad genética y clínica de CV-A6

En relación con las características clínicas de los casos caracterizados para EV, CV-A6, además de ser el más prevalente, era también el más relacionado con la enfermedad MPBa (75/96; 78%; $p < 0,00001$), aunque con un papel secundario en los casos de herpangina (4/23; 17%) en comparación con otros EV (CV-A2 y CV-A10), tal como se describe en la **Tabla 12**. Para MPB, el número de casos fue demasiado bajo como para extraer conclusiones.

Tabla 12. Número y porcentaje de enterovirus (EV) por síndrome clínico. Los porcentajes están calculados para cada uno de los síndromes clínicos. E, echovirus; CV, coxsackievirus; MPB, mano-pie-boca

Síndromes clínicos		N (%)
MPB	Tipos de EV	2 (2)
	CV-A10	1 (50)
	CV-A6	1 (50)
HERPANGINA	Tipo de EV	23 (19)
	CV-A2	7 (31)
	CV-A10	6 (26)
	CV-A6	4 (17)
	CV-A4	2 (9)
	E-6	2 (9)
	CV-A5	1 (4)
	CV-B3	1 (4)
MPBa*	Tipo de EV	96 (79)
	CV-A6	75 (78)
	EV-A71	11 (12)
	CV-A10	6 (6)
	E-9	3 (3)
	CV-A16	1 (1)
TOTAL		121

La caracterización en base a la secuencia completa de la región codificante de la proteína VP1 de 78 de los 80 (98%) CV-A6 reveló como todos los virus pertenecían al sublinaje D3, la mayoría de los cuales (67/78; 86%) se agrupaban en un mismo grupo genético con una similitud genética del 98,4%, como se observa en la **Figura 15**. Para los otros dos CV-A6 no fue posible secuenciar de forma completa la región de estudio. Estos virus presentaban similitudes genéticas con otras cepas que habían circulado anteriormente en Europa (España, 2008; Finlandia, 2008; y Francia, 2010), y posteriormente en la región Asia-Pacífico (Taiwán, 2010; Japón, 2011; y China, 2010-2013).

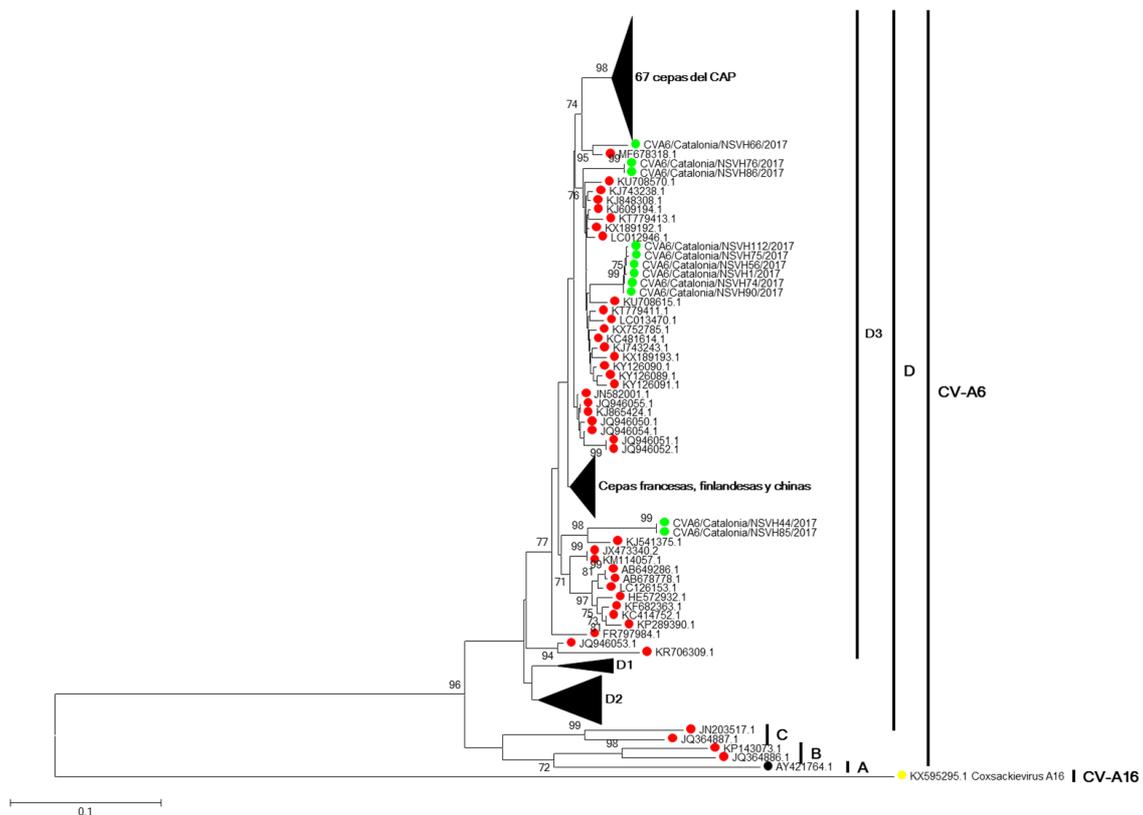


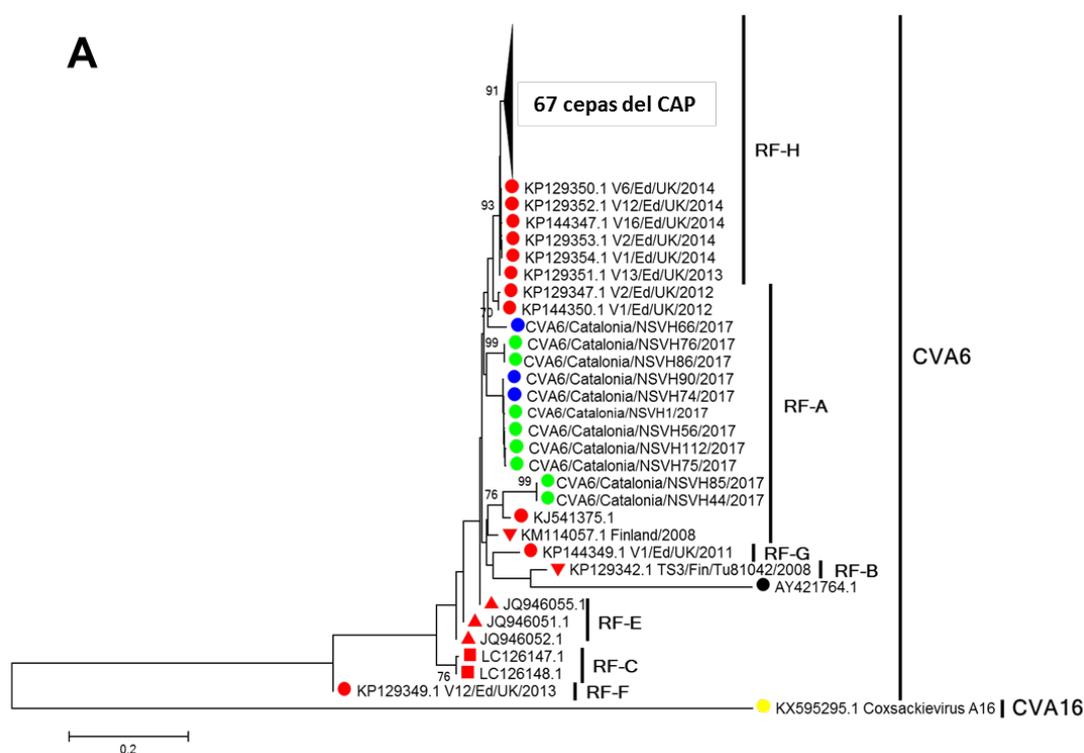
Figura 15. Árbol filogenético de los genotipos de coxsackievirus (CV)-A6 (linajes A - D) en base a la secuencia completa de la VP1. Las secuencias del estudio están marcadas en verde; las cepas de referencia de CV-A6, en rojo (algunas comprimidas, España: 2008; Finlandia: 2008; Francia: 2010; y China: 2010-2013); y la cepa CV-A16 como *outgroup*, en amarillo. Los valores de *Bootstrap* (>70%) están marcados en las ramas del árbol. Gdula es la cepa original del CV-A6 (círculo negro).

Para el estudio de eventos de recombinación en CV-A6 (**Figura 16**), un total de 78/80 (98%) y de 68/80 (85%) secuencias de las regiones VP1 y 3Dpol, respectivamente, pudieron ser secuenciadas de forma satisfactoria. En base a la secuencia VP1, el 86% (67/78) de los virus se clasificaron en la forma recombinante RF-H, junto con otras secuencias de referencia procedentes de Edimburgo (2012-2014), mientras que el otro 14% (11/78) se agruparon en la forma RF-A, junto con otras secuencias de referencia de estudios previos en Finlandia (2008), Taiwán (2010) y Japón (2011) (**Figura 16A**). El estudio conjunto de los resultados obtenidos por filogenia de las secuencias completas que codifican para las proteínas VP1 y 3Dpol mostró como los resultados eran congruentes en la mayoría de los virus, aunque con evidencias de recombinación para 3/68 (4%) cepas (CVA6/Catalonia/NSVH66/2017, CVA6/Catalonia/NSVH74/2017 y

Resultados: Estudio 2

CVA6/Catalonia/NSVH90/2017) (**Figura 16B**). Mientras que la secuencias 3Dpol de las cepas CVA6/Catalonia/NSVH74/2017 y CVA6/Catalonia/NSVH90/2017 presentaban mayor similitud genética al CV-A16 que al CV-A6, la cepa CVA6/Catalonia/NSVH66/2017 sólo cambió de la forma RF-A (VP1) a la RF-F (3Dpol) de CV-A6. En relación con la presentación clínica, estos virus recombinantes estaban asociados a MPBa, pero no se pudieron distinguir diferencias clínicas relevantes.

Todas las secuencias del estudio están disponibles en la base de datos Genbank con los números de acceso de MK167046 a MK167123 (VP1), y MK167124 a MK167191 (3Dpol).



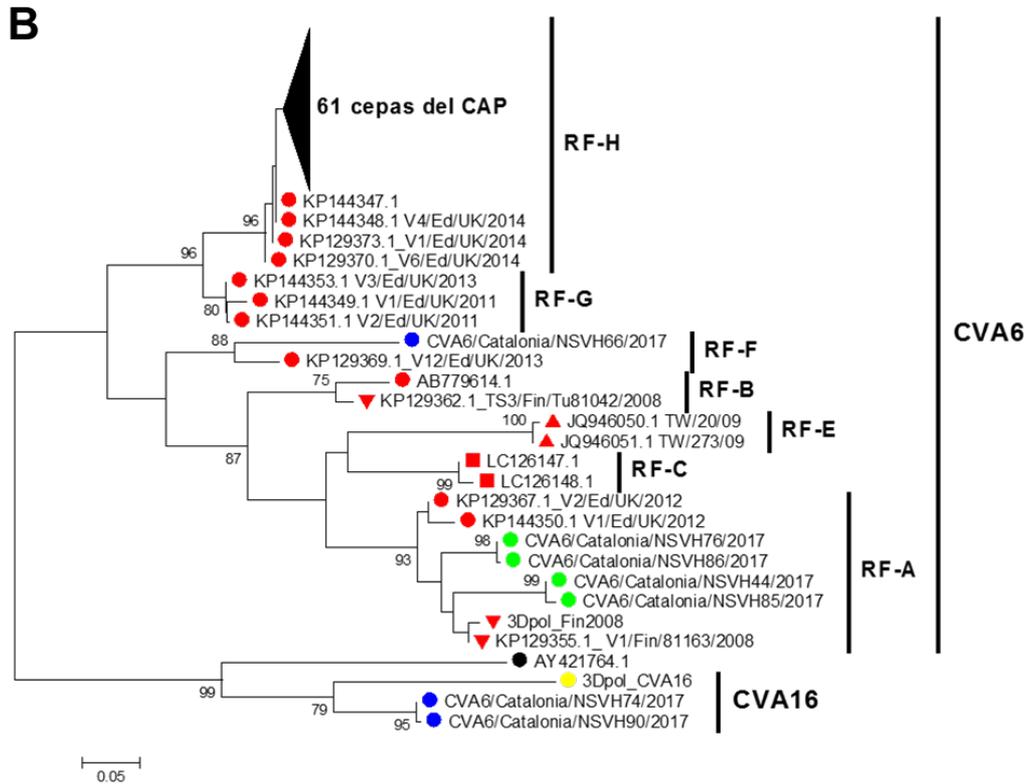


Figura 16. Árbol filogenético de las secuencias completas de la VP1 (A) y la 3Dpol (B). Las secuencias del estudio están marcadas en verde; las cepas recombinantes, en azul; las secuencias de referencia para coxsakievirus (CV)-A6 de las distintas formas recombinantes (RF) descritas por Gaunt *et al.* 2015, en rojo (cuadrado para las cepas de Japón de 2011; triángulo para las de Taiwán de 2010; círculo para las de Escocia de 2012-2014; y triángulo invertido para las de Finlandia de 2008); y la cepa CV-A16, en amarillo. Los valores de *Bootstrap* (>70%) están marcados en las ramas del árbol. Gdula es la cepa original del CV-A6 (círculo negro).

3. Estudio 3: Estudiar la prevalencia, estacionalidad y diversidad genética de los rinovirus en el Hospital Universitario Vall d'Hebron durante el periodo comprendido entre las temporadas 2014-2015 y 2016-2017.

3.1. Prevalencia de los rinovirus

En nuestra Unidad se recibieron 19.957 muestras de 12.775 pacientes, de las cuales 2.615 (13%) muestras de 2.024 (16%) pacientes se confirmaron para RV. La mediana de edad de los casos confirmados fue de 5 años (RIQ 1-45 años). Entre los casos confirmados (2.024), se observaron más hombres (1.139; 56%) que mujeres (885; 47%) (OR 0,8565; 95% IC 0,7784-0,9425, $p=0,0015$; 1 dato perdido).

Los RV se pueden detectar a lo largo de todo el año, pero con picos de detección durante los periodos comprendidos entre las semanas 40-43 (septiembre-octubre) y 16-20 (abril-mayo), tal como se observa en la **Figura 17**. Las tasas más bajas de detección de los RV fueron durante los periodos de epidemia de gripe (semanas 2-12, enero-marzo).

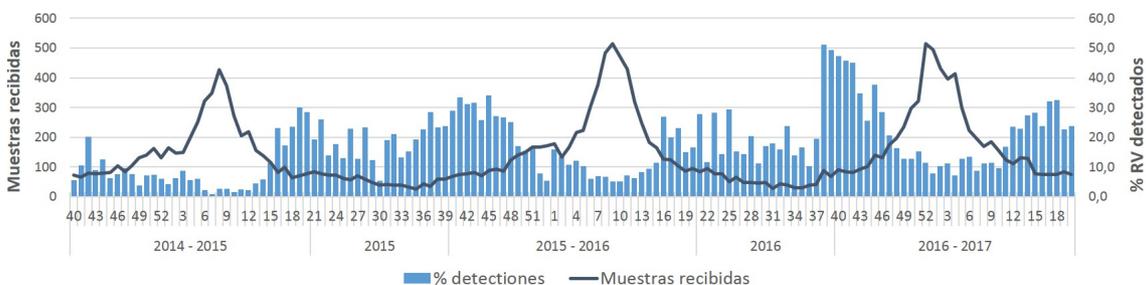


Figura 17. Distribución semanal de las tasas de detección de RV (%) con respecto al número de muestras estudiadas durante el periodo de estudio comprendido entre las semanas 40/2014 y 20/2017.

3.2. Caracterización molecular de los rinovirus

Entre las muestras confirmadas para RV, 1.771 (67%) muestras (1.324 casos; 65%) que presentaban valores de Ct < 35 fueron seleccionadas para ser caracterizadas por secuenciación, de las cuales un 93% (1.651) fueron secuenciadas con éxito. Los análisis filogenéticos de las secuencias parciales de la región codificante de la proteína VP4/2

evidenciaron que 1.040 (63%) pertenecían a RV-A, 94 (6%) a RV-B y 517 (31%) a RV-C. Además, otras 6 (< 1%) muestras confirmadas inicialmente como RV fueron finalmente caracterizadas como EV (3 EV-D68, 2 CV-B5 y 1 CV-B4). El análisis filogenético de las secuencias de RV reveló una alta diversidad genética dentro de cada una de las especies, ya que se pudieron distinguir hasta 119 tipos distintos de RV: 69/80 (86%) en RV-A, 19/32 (60%) en RV-B y 31/55 (56%) en RV-C, tal como se detalla en la **Tabla 13**.

Tabla 13. Tipos de RV por especie detectados ordenado según el número de casos detectados.

RV-A																			
A78	A22	A49	A12	A31/47	A21	A46	A19	A101	A57	A58	A29/44	A102	A81	A51	A8/95	A9	A7/88	A40	A39
60	41	39	35	31	30	30	28	29	29	24	23	23	22	21	20	19	19	18	18
A98	A59	A0	A28	A10	A71	A60	A89	A67	A55	A66	A34	A13	A20	A45	A82	A94	A1	A36	A88
18	17	17	17	17	17	16	16	16	15	15	15	14	14	13	12	12	12	12	11
A43	A24	A75	A73	A76	A7	A65	A33	A53	A103	A77	A25/62	A41	A61	A56	A18	A32	A11	A68	A85
11	10	10	9	9	9	9	9	9	8	8	7	7	7	7	7	7	6	6	5
A15	A	A63	A16	A38	A100	A30	A25	A90											
4	4	4	2	2	1	1	1	1											
RV-B																			
B72	B70	B79	B4	B92	B83	B93	B3	B14	B48	B	B97	B84	B26	B35	B17	B27	B86	B99	
14	12	7	7	6	6	5	4	4	4	4	3	3	3	3	3	3	2	1	
RV-C																			
C2	C12	C15	C5	C3	C27	C11	C43	C42	C22	C16	C6	C25	C23	C10	C28	C32	C13	C41	C17
51	37	36	33	31	26	24	23	22	19	19	19	19	18	14	12	11	10	10	10
C	C1	C24	C4	C18	C7	C21	C26	C31	C9	C8									
10	9	9	8	8	7	7	5	4	3	3									

Durante el periodo de estudio se observó cómo los virus pertenecientes a las tres especies estaban en variable cocirculación (**Figura 18**). En general, los RV-A fueron los más predominantes en las semanas estudiadas, aunque los RV-C fueron detectados con mayor frecuencia durante los meses de invierno en dos de las tres temporadas estudiadas. Respecto RV-B, el número de detecciones fue demasiado bajo como para poder describir un patrón de circulación.

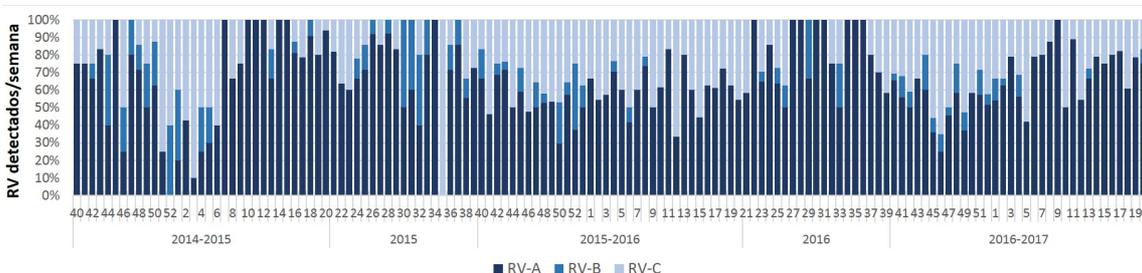


Figura 18. Número de detecciones por semana de rinovirus (RV) (%) desde la semana 40/2014 hasta la 20/2017.

A lo largo del estudio, algunos pacientes (91) se (re)infectaron por RV en múltiples ocasiones, la mayoría (54; 59%) de los cuales eran de sexo masculino y menores de 15 años (58/91; 75%). De estas múltiples infecciones por RV, el 40% (36/91) se reinfectaron con RV de la misma especie (RV-A), y el 31% (28/91) cambiaron de RV-A a -C seguido por otras combinaciones, tal como se resume en la **Tabla 14**. En el caso de las reinfecciones mayoritarias con la misma especie de RV-A, solo un 12% (11/91) de los casos fue con el mismo tipo de RV.

Tabla 14. Múltiples infecciones de RV en un mismo paciente durante el periodo de estudio, resaltando los posibles cambios de tipo si los hubiera.

Reinfección	Pacientes (N; %)	Tipos de RV
RV-A	36 (40)	A49, A8/95, A78, A57, A22, A12, A88, A66
RV-A a -C	28 (31)	A45, A81, A15, C22, C10, A33, C5, A71,
RV-C a -A	9 (10)	C5, C3, A76, C43,
RV-C	7 (8)	C42, C3, C12, C2, C5
RV-B a -A	6 (6)	B93, A73, A28, B93, A57, B79
RV-A a -B	3 (3)	A28, B79, A8/95, B70, A49, B26
RV-B a -A a -C	2 (2)	A88, B92, C27, C3, A51, B70
TOTAL	91	

3.3. Distribución por edades y datos clínicos

Se encontraron diferencias en las medianas de edad entre los grupos de pacientes infectados por las distintas especies de RV ($p < 0,001$, 5 valores perdidos): RV-A (5 años; RIQ 1-16 años), RV-B (16 años; RIQ 1-56 años) y RV-C (3 años; RIQ 1-16 años). También se encontraron diferencias en la distribución por grupos de edad de los casos de RV pertenecientes a las tres especies ($p = 0,002$), tal como se observa en la **Tabla 15**.

Tabla 15. Distribución de las especies de RV por grupos de edad

Grupos de edad (años)	RV-A N (%)	RV-B N (%)	RV-C N (%)	Total N (%)
<2	293 (36)	23 (28)	194 (45)	509 (39)
2-4	99 (12)	5 (6)	60 (14)	164 (12)
5-14	138 (17)	11 (14)	69 (16)	218 (17)
15-64	168 (21)	25 (31)	61 (14)	254 (19)
>64	109 (14)	17 (21)	47 (11)	174 (13)
Total	807 (61)	81 (6)	431 (33)	1319*

*5 valores perdidos

p -valor=0,002

En relación con las características clínicas descritas en la **Tabla 16**, 724 pacientes (724/1.324; 55%) fueron hospitalizados, 29 de los cuales (29/724; 4%) fallecieron durante la hospitalización.

Por otra parte, en 469 (18%) muestras, los RV fueron codetectados con otros virus respiratorios, como adenovirus (29%), VRS (15%), coronavirus (14%), bocavirus (13%), virus parainfluenza (11%) y EV (11%), entre otros. En un 62% (290/469) de las codetecciones, los RV presentaban un valor de Ct < 35.

Tabla 16. Diferencias en las características clínicas de los pacientes hospitalizados, según el tipo de RV detectado.

	RV-A		RV-B		RV-C		Total
	n	%	n	%	n	%	n
Pacientes hospitalizados	415	57.3%	46	6.4%	263	36.3%	724
<2 años	175	54.3%	17	5.3%	130	40.4%	322
2-4 años	52	54.7%	1	1.1%	42	44.2%	95
5-14 años	70	58.8%	6	5.1%	43	36.1%	118
15-64 años	64	62.8%	13	12.7%	25	24.5%	102
>64 años	54	62.8%	9	10.5%	23	26.7%	86
Mujeres	181	57.8%	19	6.1%	113	36.1%	313
Hombres	234	56.9%	27	6.6%	150	36.5%	411
Exitus	22	75.9%	0	0.0%	7	24.1%	29
<2 años	7	87.5%	0	0.0%	1	12.5%	8
2-4 años	0	0.0%	0	0.0%	0	0.0%	0
5-14 años	4	80.0%	0	0.0%	1	20.0%	5
15-64 años	8	80.0%	0	0.0%	2	20.0%	10
>64 años	3	50.0%	0	0.0%	3	50.0%	6
Mujeres	5	55.6%	0	0.0%	4	44.4%	9
Hombres	17	85.0%	0	0.0%	3	15.0%	20
Comorbilidades*							
Diabetes (249-250)	28	63.6%	6	13.6%	10	22.7%	44
Obesidad (278)	8	50.0%	5	31.3%	3	18.8%	16
Trasplantes de precursores hematopoyéticos (V42.82, V42.83)	2	40.0%	1	20.0%	2	40.0%	5
Otros trasplantes (V42.1-V42.81, V42.84-V42.9, V58.44, 996.8)	38	71.7%	7	13.2%	8	15.1%	53
Neoplasia (140-209, 230-239, 199.2)	46	64.8%	5	7.0%	20	28.2%	71
Virus de la Inmunodeficiencia Humana (42)	63	70.0%	8	8.9%	19	21.1%	90
Enfermedad crónica de riñón (580-589)	37	61.7%	10	16.7%	13	21.7%	60
Prematuridad (765)	33	52.4%	4	6.3%	26	41.3%	63
Enfermedad cardiovascular** (410-414, 425, 429.3, 426-428)	62	70.5%	9	10.2%	17	19.3%	88
Enfermedad pulmonar (460-519)	198	53.4%	25	6.7%	148	39.9%	371
Asma (977.31, 481-486)	6	66.7%	0	0.0%	3	33.3%	9
Enfermedad pulmonar obstructiva crónica (491-492, 494, 496)	12	60.0%	3	15.0%	5	25.0%	20
Bronquitis por VRS (466.11)	2	40.0%	1	20.0%	2	40.0%	5
Bronquitis y bronquiolitis no por VRS (466.00, 466.19)	7	58.3%	1	8.3%	4	33.3%	12
Neumonía viral (480)	1	33.3%	0	0.0%	2	66.7%	3
Otras neumonías (977.31, 481-486)	14	66.7%	4	19.0%	3	14.3%	21

Los rinovirus no tipados se han excluido del estudio.

* En paréntesis, los códigos ICD-9 usados para la definición de la enfermedad.

** Se excluye la hipertensión.

4. Estudio 4: Estudiar la capacidad de discriminación de la técnica molecular de rutina para la detección de los virus respiratorios entre los diferentes picornavirus (rinovirus y enterovirus).

Durante el periodo de estudio, se recibieron un total de 19.957 muestras en nuestra Unidad para la detección de virus respiratorios mediante RT-PCR multiplex de rutina, de los cuales 2.546 (12%) se confirmaron únicamente como RV, 309 (1,5%), como EV, y 233 (1%), como codetecciones RV/EV. En base a las secuencias parciales de las regiones codificantes de las proteínas virales VP1 y VP4/2, se confirmaron o no estas detecciones, cuyos resultados están resumidos en la **Figura 19**. Brevemente, en ambos casos de detecciones únicas de RV o EV, la caracterización confirmó en un 99% de los casos que la detección era correcta. Por otra parte, en el caso de codetección EV/RV, un 68% se confirmó como RV y un 32% como EV.

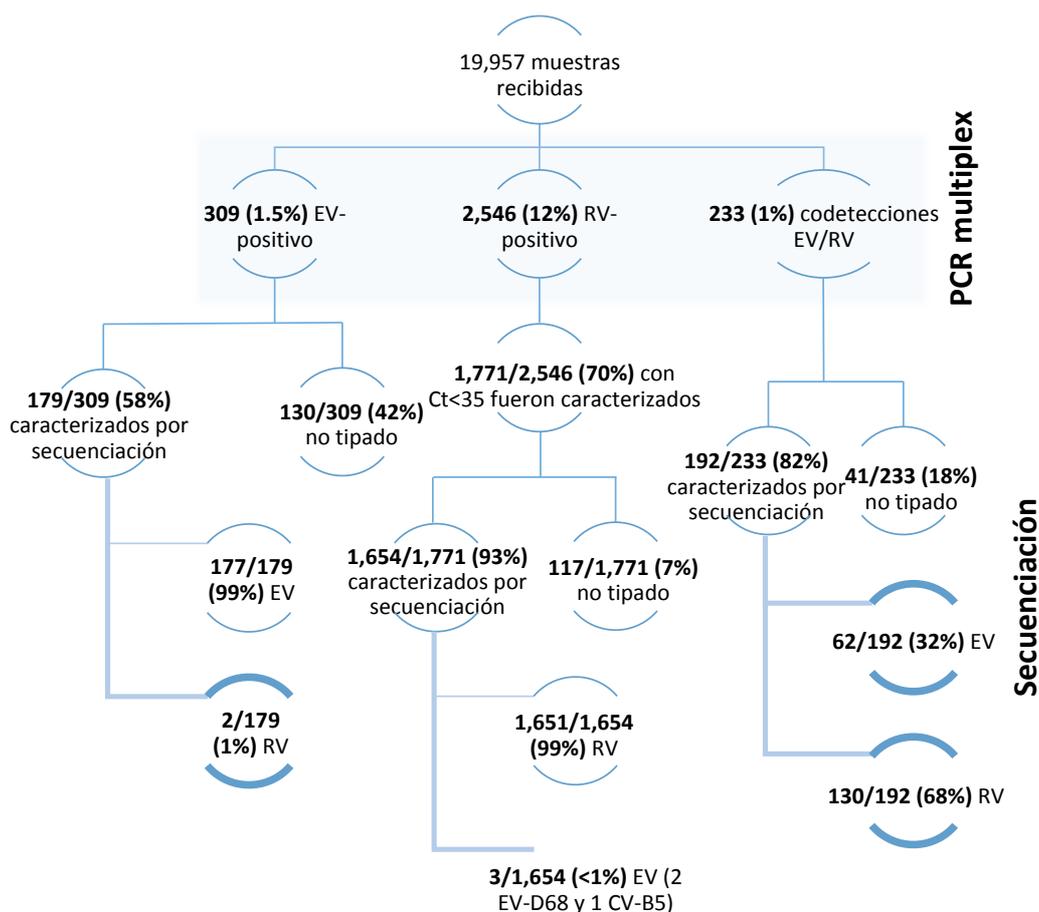


Figura 19. Resumen de resultados del diagnóstico (PCR multiplex) y posterior caracterización (secuenciación) de los EV y RV. Aquellos resultados discordantes están señalados con líneas azules de mayor grosor.

DISCUSIÓN

Los picornavirus son una familia que incluye un amplio espectro de virus que pueden causar una gran variedad de enfermedades, tanto en humanos como animales. Entre los picornavirus humanos estudiados en esta tesis doctoral, los RV se asocian normalmente a enfermedad respiratoria leve, mientras los EV además de estar relacionados con enfermedad leve, como MPB, herpangina o exantema, en un pequeño porcentaje la infección puede estar asociada a complicaciones graves tales como miocarditis, meningitis aséptica o PFA (11).

El objetivo que se persigue en esta tesis doctoral es conocer en nuestro medio, en la población atendida en nuestro hospital, e incluso en el ámbito de atención primaria de donde el hospital es referencia, la prevalencia, estacionalidad, diversidad genética y características clínicas de la infección por estos dos picornavirus. Reducir este estudio a un resultado cualitativo como el que nos ofrece un método molecular comercial en nuestro laboratorio para su detección podría ser quizás demasiado simple. Somos conscientes que tanto EV y RV son especies con una gran diversidad genética, que por un lado es responsable de un amplio espectro en la presentación clínica de la infección, mientras que por otro puede condicionar el funcionamiento de las técnicas de diagnóstico utilizadas en la rutina diaria del hospital. Así, se ha realizado esta tesis doctoral con el fin de generar un mayor conocimiento de los diferentes picornavirus que pueden estar asociados a enfermedad, tanto leve como grave, que ayudará a monitorizar aquellos picornavirus que podrían ser causa de brotes en un futuro, especialmente de aquellos asociados a una mayor gravedad. Con la información generada en los primeros tres estudios, se ha revisado también la capacidad de discriminación de la técnica molecular comercial utilizada en el laboratorio, y seguramente más utilizada en Europa, para la detección e identificación de los virus respiratorios.

La información disponible respecto a los picornavirus es francamente escasa. Bien conocida es la elevada prevalencia de RV, en la mayoría de los casos asociada a cuadros respiratorios leves. Pero los últimos brotes de EV-D68, EV-A71 y el creciente interés en monitorizar la circulación de los diferentes enterovirus no polio (ENPEN), han sido el origen de esta tesis. En particular, la información disponible para los EV antes del brote de EV-D68 del 2014 en España se limitaba sobre todo a los casos de meningitis o PFA notificados de acuerdo con el Plan de Erradicación de la Poliomielitis (42, 72), pero no de otros EV que también se estaban detectando en los diferentes laboratorios clínicos, pero quizás asociados a enfermedad sin complicaciones.

Los EV, si los comparamos con otros virus respiratorios (VG, VRS), pero especialmente con los RV, no presentan una prevalencia de las más elevadas. Sin embargo, para algunos casos las complicaciones clínicas asociadas a la infección son razón más que suficiente para considerarlos objetos de vigilancia. Como bien es conocido, la circulación de los EV es universal y heterogénea, no siempre igual temporada tras temporada, tanto en el número de detecciones como en los EV que circulan. El patrón temporal de detección de EV fue similar al descrito previamente en nuestra área geográfica (50) y en otras regiones geográficas con clima templado, observando picos de detección durante los meses de otoño y de primavera. Como era de esperar, más de un 80% de la población con confirmación diagnóstica de infección por EV eran menores de 5 años, que concuerda con lo descrito, ya que la población más joven es de hecho la más susceptible al no tener una respuesta inmune específica y eficaz por una exposición previa (81). Así, la edad es claramente un factor determinante de la susceptibilidad a la infección por EV, ya que cuanto más joven, mayor es la susceptibilidad (81, 82). Sin embargo, estos resultados podrían estar sesgados por el hecho que solo se estudió aquella población que acudía al hospital con criterio de hospitalización, y seguramente estaríamos infravalorando la infección por EV en la población que cursa con mayor benignidad, no siendo necesaria su atención sanitaria en un hospital terciario, sino en un centro de atención primaria. Eso, sin valorar la posibilidad que muchos de los casos de infección por EV son asintomáticos, los cuales habitualmente no son estudiados.

Discusión

Con respecto a la diversidad genética en base a la secuencia parcial VP1 de los EV detectados en nuestro hospital, la mayoría de éstos pertenecían a las especies EV-A y EV-B. Es algo que concuerda con respecto a lo reportado por otros autores, y algo que incluso puede ser considerado como lógico, ya que es en estas dos especies donde se clasifican el mayor número de tipos de EV conocidos, en comparación con el menor número de tipos dentro de las especies EV-C y -D. Además de esta diversidad, la caracterización de los EV ha permitido visualizar como la circulación de los diferentes tipos de EV fue variable a lo largo de estas tres temporadas de estudio, con distintos predominios por año.

Entre los 27 tipos distintos de EV observados, los EV con un mayor predominio fueron EV-A71 y EV-D68. Estos dos tipos de EV no polio son actualmente considerados principales objetos de vigilancia, debido a los recientes brotes de EV-D68 ocurridos en 2014, 2016 y 2018 en Norte-América, y su estrecha relación con la PFA, y también por el brote de rombencefalitis asociado a la infección por EV-A71 en España (53, 83) y en otros países europeos (60) durante 2016, y que a continuación se comentan con mayor detalle.

En verano de 2014, el *Centre for Disease Prevention and Control* (CDC) notificó un importante incremento de pacientes con enfermedad respiratoria grave en diferentes estados de EUA, algunos de los cuales requirieron ingreso en la UCI. El análisis de las muestras de estos pacientes permitió identificar que el principal agente etiológico de estas infecciones era EV-D68 (84), hecho que sorprendió, ya que la circulación de este virus había sido esporádica en años anteriores, con pequeños clústeres poblacionales asociados a enfermedad respiratoria leve (57). Además de esta mayor circulación (81), las cepas de EV-D68 caracterizadas pertenecían a dos linajes (genogrupos A y B), similares a los que habían circulado anteriormente, pero en ningún caso se pudieron identificar nuevas variantes asociadas a esta mayor virulencia o gravedad (57). Este repunte en la circulación y esta mayor gravedad alertó a la comunidad científica alentando a la realización de estudios más exhaustivos a nivel clínico, epidemiológico y virológico de la infección por este virus respiratorio, hasta entonces infravalorado. Con motivo de conocer que estaba sucediendo en Europa, en 2014 se inició un estudio coordinado por la *European Society for Clinical Virology* (ESCV), y con el soporte del

European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC), donde participaron laboratorios clínicos (también el nuestro) y de referencia, para monitorizar su circulación y detección (51). En comparación a lo observado en EUA, la prevalencia de EV-D68 en Europa fue baja, y asociado a una baja gravedad, a pesar de que las cepas que estuvieron circulando era similares a las de Norte-América. Una característica destacable de este estudio fue la prevalencia del virus (0-25%), observando un gradiente descendiente de norte a sur en Europa (51). Los resultados de esta tesis doctoral muestran como la detección de EV-D68 en otoño de 2014 fue baja, pero mayor durante las siguientes temporadas, sobre todo en 2016, y también en 2018 (85), como sucedió en otras regiones españolas (86, 87) y europeas (88-90). Los datos disponibles hasta ahora permiten sugerir que el virus sigue un patrón de circulación bienal (91). Asimismo, la circulación de los distintos genogrupos de EV-D68 (A, B, C y D) también varía según el año de circulación, tal como nuestro grupo ha observado en un estudio de cuatro temporadas (2014-2018) (85). Esta diversidad es fruto de la evolución del virus y de la elevada tasa de recambio genético de estos virus, característica típica de los virus ARN. Haber descrito este patrón de circulación (bienal) permitirá saber cuándo circulará con antelación, lo que permitirá a los laboratorios disponer de todos los medios para responder de una forma más rápida y precoz, especialmente para su detección en aquellos casos con complicaciones graves.

En relación a su presentación clínica, la mayoría de EV-D68 detectados en nuestro estudio estaban asociados a ITRI, y por ello a una mayor gravedad (57, 84), sobre todo en pacientes con comorbilidades respiratorias, como asma o reactividad bronquial (92, 93). Pero, no obstante, es bien conocido el neurotropismo potencial de los distintos tipos de EV. En el caso de EV-D68 desde 2014 se estableció una asociación entre la infección y PFA en algunos pacientes (84, 90, 94), que aparecía pocos días después de la infección, mayormente respiratoria, en algunos casos con secuelas permanentes, o incluso la muerte (84). Durante la realización de esta tesis doctoral, de forma similar a lo observado en otros estudios europeos (95, 96), sólo se detectó un caso esporádico de PFA asociado a infección por EV-D68 durante el mes de febrero de 2016, de una niña de dos años que desarrolló una parálisis con secuelas posteriores permanentes (97). Un aspecto importante de este caso, y por ello hablamos de asociación de EV-D68 con PFA, fue que la detección y caracterización del virus fue a partir de la muestra

Discusión

respiratoria, pero en cambio no se pudo detectar en líquido cefalorraquídeo (LCR), supuestamente el foco de la infección. Este hecho es especialmente importante desde el punto de vista microbiológico, ya que si seguimos las actuales recomendaciones del grupo de expertos ENPEN, cuando existe sospecha de enfermedad neurológica por EV, no solo se debe estudiar el LCR, sino también otras muestras como exudados o aspirados de la nasofaringe o heces, siendo conscientes que es en la fase más temprana de la infección cuando la replicación del virus es alta en nasofaringe, y que es en las heces donde observamos una excreción más prolongada aunque intermitente durante aproximadamente las primeras dos semanas desde el inicio de los síntomas. De todos modos, y con el fin de hacer una monitorización de EV-D68, una vigilancia basada en la detección y caracterización de los EV en muestras del tracto respiratorio sería suficiente para tener un conocimiento adecuado de la situación a nivel poblacional (63).

Por otro lado, el otro tipo de EV predominante en esta tesis doctoral fue EV-A71. Este virus es uno de los principales agentes causales de enfermedad MPB. Esta enfermedad se describió por primera vez en 1948, pero al ser leve y autolimitada, con una resolución a los pocos días, el interés de la comunidad científica ha sido hasta ahora relativamente escaso (98). Toda la información virológica y clínica de MPB disponible hasta el momento ha sido la recogida durante las epidemias anuales de esta enfermedad en los países de la región Asia-Pacífico (99-101), como Vietnam o Camboya. Al estar la enfermedad MPB asociada a una gran morbilidad, y también mortalidad (78), la OMS la considera como un problema de Salud Pública de primer orden en esta área geográfica (44, 45, 102), manteniendo activo un completo sistema de vigilancia para el control y seguimiento de esta enfermedad (103). En otros brotes más limitados ocurridos durante los años 60 y 70 en Europa, EV-A71 también fue relacionado con casos con complicaciones neurológicas (104-107). Si bien la vigilancia de los EV no polio ya estaba justificada con lo sucedido con EV-D68 desde 2014, durante 2016, un importante brote de rombencefalitis asociado a la infección por EV-A71 se reportó en Cataluña, y más tarde en otras CCAA españolas (53, 83, 108). Lo observado en el primer estudio de esta tesis doctoral fue que la rombencefalitis fue la presentación clínica no respiratoria más comúnmente observada en este estudio, y mayormente relacionada con la infección por EV-A71 del genogrupo C1.

Recientemente, se ha reportado que la cepa circulante durante ese brote era una cepa recombinante y fue la que causó los casos más graves de complicaciones neurológicas. Esta cepa, además, era similar a las circulantes en otras regiones europeas (Alemania o Francia), pero con una circulación limitada en comparación con el brote ocurrido aquí en España. Este hecho sería similar a lo ocurrido en EUA con EV-D68, ya que la circulación de esta cepa era escasa antes del brote y podría ser la razón de su emergencia y lo que causó el brote (109).

Por otro lado, es importante destacar, que muchos de los casos graves de infección por EV-A71 evolucionaron a partir infecciones con presentación clínica inicial más leve, tales como enfermedad MPB, herpangina o exantema. La mayoría de estos casos de rombencefalitis, sucedieron durante el brote de 2016. Seguramente la enfermedad MPB, herpangina o exantema en este estudio podrían estar infraestimados, ya que por un lado son cuadros clínicos benignos que no requieren atención hospitalaria, y por tanto está indicada la recogida de muestra clínica para el estudio microbiológico según los protocolos del hospital, y por otro lado, este estudio se ha realizado a partir de muestras respiratorias.

Además de EV-D68 y EV-A71, hubo otros tipos de EV detectados no de forma tan frecuente en este estudio. Tal como se ha descrito en la introducción, un tipo de EV puede estar relacionado con diferentes presentaciones clínicas, del mismo modo que una presentación clínica puede ser causada por distintos tipos de EV. EV-D68 y EV-A71 no fueron los únicos tipos asociados a afecciones neurológicas, sino que además, CV-A10, E-5, E-30, CV-B3 y EV-C109 también fueron relacionados, como han descrito estudio previos (110-113), aparte de estar asociados a enfermedades más leves, como MPB, herpangina o exantema. De este grupo de EV, E-30 ha sido relacionado con brotes de enfermedad neurológica en varias regiones como China, EUA y Europa (114-118) y, de hecho, este virus y su evolución está siendo objeto de estudio por la ENPEN. En nuestro estudio, a este virus normalmente se le relaciona con meningitis aséptica (115, 116), aunque solo haya sido en pocos casos. Otro virus frecuentemente asociado a enfermedad neurológica es E-6, del cual se han reportado varios brotes en Holanda, sobre todo durante 2016, ya que es considerado endémico en esa región (119). Sin embargo, en nuestra zona geográfica donde este EV se considera no endémico, el

número de detecciones ha sido bajo, y solamente ha podido asociarse a enfermedad respiratoria o fiebre, en discordancia con los datos reportados en Holanda (119).

Sin embargo, para los EV a pesar de su baja prevalencia se debe considerar prioritaria su vigilancia, debido a que todos ellos (polio o no polio) se consideran potencialmente neurotrópicos, quizás reforzando el sistema ya creado para la vigilancia de los casos de PFA, o bien permitiendo a los laboratorios clínicos participar en esa vigilancia del mismo modo a como lo ha establecido la red ENPEN (63).

Realmente, una de las cosas aprendidas durante los brotes de EV, especialmente durante el brote de rombencefalitis en 2016, es que los estudios en el ámbito de atención primaria (casos leves) que permiten la recogida de datos para describir la circulación de EV en la comunidad son escasos, a pesar de que esta información podría ser de gran importancia como herramienta de predicción de brotes, o como mínimo para poder contextualizar la información microbiológica del hospital (casos graves), tal como hizo realizó un grupo francés recientemente (120). Con el interés de conocer los EV asociados principalmente a enfermedad más leve, seguramente infraestimados a nivel hospitalario, pero que como hemos comentado en muchos casos son la causa de complicaciones de mayor gravedad, se llevó a cabo el segundo estudio de esta tesis doctoral.

Clásicamente, EV-A71 y CV-A16 habían sido considerados como los principales agentes causales de MPB y herpangina. Tal como hemos comentado anteriormente, EV-A71 es el principal agente causal de los brotes de MPB en los países de la región Asia-Pacífico (45, 78, 121), sobre todo, de los casos con complicaciones graves, a diferencia de lo reportado para CV-A16 u otros coxsackievirus (122, 123). Sin embargo, desde su primera descripción en Finlandia en 2008, CV-A6 ha ido desplazando a EV-A71 y CV-A16 como principal agente etiológico en Francia, España y otras regiones europeas y de Norte-América (47, 48, 124), donde se dispone de información. Con este mayor predominio de CV-A6, la presentación clínica de esta enfermedad MPB ha ido cambiando, observando cómo además de erupciones en manos, pies y región peribucal que describen el cuadro típico, ya aparecen lesiones en otras áreas anatómicas y onicomadesis, siendo entonces definida como forma atípica de la enfermedad (MPBa) (47, 48, 125).

En este segundo estudio, de nuevo los menores de 5 años representaron la población más susceptible (92%) a enfermedad MPB y herpangina, aunque hay recalcar que estamos estudiando sólo población pediátrica menor de 17 años, como sucede en el primer estudio. Se pudo observar de nuevo una distribución de los casos a lo largo de todo el año, pero sobre todo con picos de detección en los meses de otoño y de primavera, tal como habíamos comentado en el primer estudio de esta tesis (83, 126). Durante este año de vigilancia de los EV asociados a MPB y herpangina en atención primaria, los EV más predominantes fueron pertenecientes a la especie EV-A, en particular CV-A6, seguido de CV-A10 y EV-A71. No obstante, cabe remarcar que la distribución de estos EV fue desigual durante los dos picos de detección, ya que mientras CV-A6 se detectó mayormente durante el pico de otoño de 2017, los otros EV fueron los más observados en el pico de primavera de 2018, siendo la detección de CV-A6 menos representativa. Estos datos son similares a los observados durante un segundo año de vigilancia que daba continuidad a este estudio (temporada 2018-2019), en que CV-A6 se detectó principalmente en el pico de otoño de 2018 (datos no publicados).

En estos dos primeros estudios de caracterización de EV, se ha trabajado con una secuencia parcial del genoma (VP1), de acuerdo con los criterios recomendados por la OMS. Sin embargo, se conoce bien la gran capacidad de recombinación de los EV (127), o en general atribuida a todos los picornavirus (31), cuando están en cocirculación, especialmente entre los EV pertenecientes a la misma especie. Estos eventos de recombinación permiten a los EV adquirir diversidad evolutiva y nuevas características fenotípicas, tal como “nuevos” genes estructurales y no estructurales (32). Entonces, caracterizarlos basándonos únicamente en la secuencia de esta pequeña región es quizás demasiado simple. Sin lugar a duda, lo más adecuado sería poder trabajar con secuencia de genoma completo (*whole genome sequencing*), pero una buena aproximación es trabajar también conjuntamente con secuencias parciales o completas de otras regiones del genoma que permitan detectar posibles eventos de recombinación, de modo que así se pueda describir mejor la diversidad genética de los virus en circulación. Hay estudios que evidencian la generación de nuevos EV recombinantes entre virus pertenecientes a la especie EV-B, como E-9 y E-11, entre las regiones de la VP1 y 3Dpol principalmente (128). Otro estudio también describe

Discusión

recombinaciones en la región 3Dpol de EV-A71, reportando grupos más cercanamente relacionados a CV-A16 y otros tipos de EV-A (32). En concreto para CV-A6, se han descrito en la literatura un gran número de brotes de MPB asociados a cepas recombinantes de este virus (45, 47, 48, 78, 102), además de varias formas recombinantes (de RF-A a -H) (48, 125), del mismo modo que para EV-A71 (32). Un reciente estudio ha descrito la distribución universal de algunas de estas formas recombinantes, la RF-E en Europa y Asia, las -G y -H únicamente en Europa, la -E en Taiwán, y de otras (RF-J y -K) únicamente en China (125).

En este segundo estudio, para la caracterización de los CV-A6 se utilizaron las secuencias de VP1 y 3Dpol, de forma similar a como se había planteado en otros estudios citados anteriormente, para el estudio de eventos de recombinación. Por un lado, sólo en base a las secuencias codificantes de VP1 se pudo comprobar como todas las cepas de CV-A6 del presente estudio pertenecían al sublinaje D3, que presentaban similitudes genéticas con otras cepas que habían circulado anteriormente en Europa (2008-2010) y la región Asia-Pacífico (2010-2013), demostrando una distribución del sublinaje D3 a nivel mundial (47, 78). El estudio filogenético de las secuencias de VP1 y 3Dpol permitió observar como la mayoría de CV-A6 (86%) se agrupaban en la forma recombinante RF-H, con la excepción de un menor porcentaje de cepas (14%) que lo hicieron como RF-A, tal como ya ha sido descrito en Europa. Según la historia evolutiva de las distintas formas recombinantes de CV-A6, la RF-A es considerada la forma recombinante ancestral, descrita por primera vez en el brote de 2008 en Finlandia (47), y a partir de la cual las otras formas recombinantes hubieran emergido posteriormente, en sucesivos eventos de recombinación durante un periodo de tiempo comprendido entre 5 y 10 años (48). Por otro lado, se pudieron detectar tres cepas de CV-A6 con evento de recombinación, una de ellas entre diferentes formas recombinantes (RF-A a RF-F) de CV-A6, y las otras dos con CV-A16 (3Dpol). Según lo conocido, en este estudio se describe por primera vez una recombinación entre CV-A6 y CV-A16 en nuestra zona geográfica. Sin embargo, se supone que para que estas recombinaciones puedan ocurrir, es necesario que los EV originales se encuentren en cocirculación (121, 124). Así pues, para esta recombinación entre CV-A6/CV-A16 tendría que haber habido cocirculación de estos tipos de EV durante el periodo de estudio en nuestro medio, que no es el caso según los datos que tenemos, o podría ser

el resultado de una cocirculación reciente, pero previa. De nuevo, se resalta aquí la falta de información que debería ser aportada por un sistema de vigilancia continuo también en la población general. Por otro lado, algunos estudios han sugerido diferencias en la distribución de las lesiones a nivel anatómico y el tipo de vesículas, entre las cepas recombinantes y no recombinantes (45, 47, 48). Desafortunadamente, el estudio de las características clínicas entre cepas recombinantes y no recombinantes no se pudo llevar a cabo en este estudio debido al bajo número de cepas recombinantes detectadas. Además, también se ha propuesto que estos cambios de presentación clínica podrían estar más estrechamente asociados a características genéticas de otras partes del genoma, como las regiones P2 y P3, en lugar de la P1 (VP1), no caracterizadas en este estudio. Por ello, es importante remarcar el valor que tendría el estudio de los EV basado en la secuenciación del genoma completo, que permitiera una mejor caracterización del virus, para así poder establecer una mejor asociación con las características clínicas.

Con el fin de completar el estudio de diversidad de los picornavirus, el tercer trabajo de esta tesis doctoral describe la diversidad genética, la epidemiología y la clínica de los RV detectados en pacientes atendidos en nuestro hospital durante tres temporadas de vigilancia consecutivas (2014-2017). Los RV han sido uno de los virus respiratorios más prevalentes en nuestro hospital, seguidos de los VG y VRS. Bien es conocida la elevada prevalencia de estos virus en la población con sospecha de infección respiratoria aguda, tanto la atendida en el hospital, como en la población general, aunque sin tener claro el papel que tiene este virus como causa de enfermedad.

En este estudio la prevalencia observada fue ligeramente más alta que la reportada por la Agencia de Salud Pública de Cataluña (13% vs 10%) (129), pero similar a la descrita en otros estudios en otras zonas geográficas (130, 131). Aunque si hay una característica epidemiológica destacada de los RV respecto a los otros virus respiratorios más prevalentes (VG y VRS) es su continua circulación a lo largo de todo el año, con picos de detección justo antes (meses de otoño) y después (meses de invierno) de las epidemias de VRS y VG, como ocurre en otros países de climas templados (132, 133). Estos datos podrían sin embargo estar sesgados, porque esta baja prevalencia de los RV durante las epidemias de VRS y VG podría deberse al gran

Discusión

número de muestras recibidas, pero solo analizadas utilizando técnicas de diagnóstico rápido específicas para los VG o VRS, que en el caso de ser positivas para estas dianas no fue necesario un estudio adicional para otros virus respiratorios entre los que se incluye RV, no disponiendo así de esta información. Así, además de reducirse durante este periodo epidémico de gripe y VRS la tasa de detección de RV, tampoco se pudieron identificar coinfecciones con otros virus respiratorios. Interesante podría ser estudiar también la población general con enfermedad leve o asintomática a lo largo de todo el año, de manera que pudiéramos tener un conocimiento exacto de su prevalencia, pero el diseño de este estudio así no lo permite.

Sin embargo, su elevada prevalencia y su mayor distribución en la población y el territorio podría estar condicionada por diferentes razones: (i) su larga excreción en el paciente inmunocompetente desde la infección (10-11 días), o más prolongada incluso en pacientes pediátricos o con algún grado de inmunosupresión (134), donde algunos tipos podrían quizás estar relacionados con una mayor persistencia; (ii) la resistencia y viabilidad de las partículas virales frente a condiciones medioambientales adversas al ser virus ARN sin envuelta, lo cual favorecería su transmisión; y, (iii) su asociación con enfermedad leve en pacientes inmunocompetentes, en comparación con otros virus respiratorios como los VG o el VRS, que además se pueden también detectar en el paciente asintomático, por lo que se reduce la prevención y el control de la infección. Además, el hecho que RV no sea altamente citopático durante la infección, tenga un ciclo replicativo corto, y con capacidad rápida para la evasión del sistema inmune del huésped (38), junto con la limitada seroprotección cruzada del huésped entre los distintos tipos de RV (seroprotección tipo-específica), son factores que favorecen su dispersión y continua circulación en la población humana, en todos los grupos de edad (11). Esta elevada prevalencia, junto con la elevada diversidad genética en circulación (como comentaremos a continuación), y la seroprotección frente a algunos, pero no de todos los tipos de RV descritos, favorecen además las continuas reinfecciones a lo largo de la vida del individuo, tal como se ha observado en este estudio.

Asimismo, un mayor porcentaje de los casos confirmados de RV eran del sexo masculino, de forma similar a lo observado en estudios previos (135). Esto podría sugerir una mayor susceptibilidad del sexo masculino a la infección. De hecho, las

diferencias entre sexos se han descrito para un amplio rango de enfermedades infecciosas, para las cuales diferencias en la respuesta inmune humoral y celular entre sexos podría ser la responsable. Esto se podría deber a una maduración diferente del sistema inmunitario entre hombres (testosterona) y mujeres (progesterona y estradiol), ya que estas hormonas estarían jugando un efecto inmunomodulador, supresor o potenciador, respectivamente (136).

Por otra parte, una de las principales aportaciones de este estudio fue poder describir la cocirculación de RV pertenecientes a las tres especies en nuestra región geográfica, con variabilidad de diversidad a lo largo del periodo de estudio. Como era de esperar, los RV-A fueron los más predominantes, seguidos por RV-C, mientras que los RV-B se detectaron con menor frecuencia, tal como han reportado anteriores estudios (137-141). Esta observación se podría justificar porque la mayor parte de los tipos de RV se clasifican en las especies de RV-A y RV-C. Durante el periodo de estudio, los RV-A se detectaron de forma más homogénea, aunque con una menor circulación durante los meses de invierno, momento en el cual los RV-C presentaron una mayor circulación, tal como también describieron Pierangeli *et al.* y van der Linden *et al.* (132, 138). Estos cambios en el predominio de una especie u otra se podrían atribuir, quizás, a una interferencia entre las dos especies causada por la limitada reactividad cruzada entre ambas (135, 137, 142). Asimismo, hay estudios de coinfección entre VRS y RV que han descrito que posiblemente el tipo de respuesta inmunitaria que causan los RV por su rápida replicación y evasión del sistema inmunitario, anteriormente comentado, juntamente con los pocos cambios citopáticos que causan, podrían modular esta dominancia de un virus u otro (143).

En base al estudio filogenético de las secuencias parciales VP4/2, se detectaron un amplio abanico de tipos pertenecientes a las tres especies de RV, que representaban un gran porcentaje de los tipos de RV hasta ahora conocidos (3). En nuestro estudio, los RV más prevalentes fueron similares a los que habían sido descritos en años anteriores en otros países: en Holanda (A78, A49, B70, C2, C12 y C15) durante las temporadas 2007-2012 (138), en Suecia (A78, A49, B70, y C12) durante las temporadas 2006-2010 (133), y en Mongolia (A78, A22, C2, C12 y C15) durante las temporadas 2008-2013 (144). Estas similitudes en diferentes regiones geográficas sugieren una

Discusión

distribución global de RV en la población humana, con mayor predominio de unos sobre otros. Sin embargo, no todos los virus se pudieron clasificar en un solo tipo (A-8/95; A-7/88; A-25/62; A-29/44; A-31/47), por el hecho que la región VP4/2 en la que se basa esta caracterización, no es lo suficientemente informativa para una correcta discriminación. La secuenciación de otras regiones genéticas (VP1) o, incluso mejor, del genoma completo, mejoraría esta capacidad para discriminar entre los distintos tipos de RV.

Entre los casos confirmados por RV, aunque se observó una amplia distribución de casos en todos los grupos de edad, la población pediátrica fue en general la más susceptible a la infección por RV. Sin embargo, entre los casos confirmados para las distintas especies de RV se encontraron diferencias en esta distribución de los casos por grupos edad (**Tabla 15**), con una mayor detección de RV-A y RV-C en una población más joven en comparación con los casos confirmados como RV-B. Aunque el número de casos para RV-B podría influir en esta diferencia, la cual ya había sido previamente descrita (145, 146), las razones de esta susceptibilidad variable entre tipos son todavía desconocidas. Posiblemente una inmadurez del sistema inmunitario frente a la infección podrían explicarlo, de la misma forma que los EV, por el hecho de no haber tenido un contacto previo con el virus (81). No obstante, algunas características virales podrían también justificar, ya que el receptor celular de RV-C es diferente al de RV-A y RV-B, que explicarían diferencias en el tropismo viral, al igual que una distribución variable de receptores en el tracto respiratorio entre población pediátrica y adulta, aunque futuros estudios son necesarios.

En este estudio no se consideró apropiado hacer una asociación adecuada de la gravedad con las especies de RV detectados, ya que un alto porcentaje de los casos también presentaban numerosas comorbilidades, sobre todo enfermedad pulmonar. Sin embargo, se podría considerar a los RV como posibles desencadenantes de la infección, por el posible desequilibrio inmunitario causado en el paciente, en especial, los inmunodeprimidos. Un estudio caso-control que permitiera estudiar pacientes (sin comorbilidades) con enfermedad grave, leve y con infección asintomática, donde el RV fuera detectado de forma única sin otras codetecciones, sería un buen diseño para

conocer el verdadero rol del RV como patógeno y las diferencias entre las especies, e incluso tipos.

El elevado porcentaje de codetecciones observado (18%) de RV con otros virus respiratorios se podría explicar por su elevada prevalencia en la población, ya que cuanto más circula, más se detecta. Algunos estudios han llegado a asociar estas codetecciones a una mayor gravedad (147), pero desafortunadamente se necesitan más estudios, ya que los actuales no son lo suficientemente concluyentes (143, 148). De todos modos, debemos remarcar que la gravedad no está restringida solo a factores virales, sino también del huésped y ambientales.

Al margen de los estudios de esta tesis doctoral que han permitido describir la prevalencia, estacionalidad y diversidad genética de los picornavirus humanos, ha aportado información suficiente para afirmar que la caracterización por secuenciación es todavía aún la confirmación definitiva de un resultado a partir de una técnica molecular, ya sea comercial o desarrollada en el laboratorio, para el diagnóstico microbiológico de la infección respiratoria viral. La caracterización posterior de los virus detectados mediante el método de rutina en nuestro hospital ha permitido detectar algunas incoherencias, sospecha que motivó la realización del cuarto estudio de esta tesis doctoral.

La alta similitud genética entre ambos picornavirus es un factor importante que afecta tanto al desarrollo de nuevas técnicas diagnósticas como a la especificidad de las técnicas comerciales de diagnóstico molecular (149), y en consecuencia a la confianza depositada en ellas, que teóricamente están bien diseñadas para discriminar entre EV y RV (74). Ciertamente, a pesar de los grandes avances tecnológicos aplicados en las técnicas moleculares comerciales para el diagnóstico, estas todavía no han sido capaces de ser suficientemente específicas, a la luz de los resultados presentados. Es importante comentar que no hacer un correcto diagnóstico puede tener consecuencias, por las diferencias en cuanto a las complicaciones derivadas de la infección, escasas en el caso de RV o mayores en el caso de EV, tal como antes hemos podido explicar. Así, se debería exigir una buena discriminación entre ambos virus en las técnicas del laboratorio para un buen diagnóstico, que permitirán el mejor manejo del paciente y una mejor vigilancia de estos virus respiratorios.

Discusión

En resumen, hemos podido observar como los picornavirus, en general, son causa de una importante morbilidad, tanto en la población hospitalizada como en la comunidad. Además, hemos podido describir una gran diversidad genética, que por un lado permitiría la capacidad de infección a lo largo de la vida, y en el caso de los EV es la responsable de un amplio abanico de presentaciones clínicas. Esta diversidad genética ha permitido describir también aquellos EV que han estado asociados a una mayor gravedad. Un estudio en profundidad de los diferentes picornavirus, basado en la caracterización por secuenciación, más allá de su detección, ha permitido revelar como la gran similitud genética entre ambos virus continúa condicionando todavía hoy la correcta discriminación de las técnicas moleculares utilizadas a diario en el diagnóstico microbiológico en el laboratorio.

Sin lugar a duda, el gran valor de esta tesis doctoral es haber iniciado un trabajo de vigilancia que debería mantenerse en el tiempo para hacer una monitorización activa de los picornavirus, no sólo los detectados en población hospitalizada, sino también en aquella atendida en atención primaria. La vigilancia en el paciente hospitalizado permite describir aquellos picornavirus que están asociados a una mayor gravedad, pero se debería complementar con una vigilancia en poblaciones con clínica leve o incluso asintomática, de forma que podamos tener una visión global de un problema de salud pública, sobre todo para la predicción, prevención y control de estas infecciones.

CONCLUSIONES

1. Esta Tesis Doctoral aporta información actualizada de los picornavirus relacionados con enfermedad leve, pero también grave, con especial interés en aquellos picornavirus que podrían haber o han sido causa de brotes. La aplicación de las técnicas de caracterización genética de los picornavirus, más allá de su detección, ha permitido describir aspectos poco conocidos en nuestro medio.
2. Durante el periodo de estudio hemos podido describir la estacionalidad de los picornavirus en nuestra área geográfica. Esta estacionalidad es diferente entre rinovirus, normalmente a lo largo de todo el año, y enterovirus, durante los meses de primavera y otoño.
3. La prevalencia de los enterovirus en nuestro hospital ha sido moderada (7%) en comparación con otros virus respiratorios, como los rinovirus (13%), pero la morbilidad asociada a algunos tipos de enterovirus puede ser significativa.
4. La caracterización de los enterovirus detectados en tracto respiratorio ha permitido describir una gran diversidad genética, que se detecta de forma variable a lo largo del periodo de estudio, y observando como existe una mayor prevalencia para ciertos tipos de enterovirus, como sucede con EV-D68 y EV-A71.
5. EV-D68 ha estado principalmente asociado a infección del tracto respiratorio inferior, y por lo tanto, con una mayor gravedad. Sin embargo, la asociación de esta infección respiratoria por EV-D68 con posteriores complicaciones neurológicas como mielitis o PFA, aunque han sido pocos los casos detectados en este estudio, refuerza el interés en su vigilancia.
6. La monitorización del EV-D68 ha permitido describir un patrón de circulación cada dos años (bienal), aunque en menor medida se ha podido detectar en otros

periodos. Conocer su estacionalidad permite estar preparado en el laboratorio para disponer de los medios necesarios para una respuesta rápida y eficaz en el caso de sospecha de enfermedad neurológica asociada a este tipo de enterovirus, especialmente en momentos de máxima circulación.

7. Hay que remarcar que EV-A71 ha sido detectado sobre todo en el contexto de un brote, sobreestimando así su circulación y también las complicaciones derivadas de la infección respiratoria. Sin tener en consideración estos casos neurológicos, EV-A71 se ha sido asociado con presentaciones clínicas leves, como enfermedad mano-pie-boca o herpangina.
8. Conscientes de la escasa información sobre los enterovirus que circulan en la comunidad, que en su mayor caso son causa de infección leve o incluso asintomática, pero que en determinados casos pueden estar asociados a brotes de enfermedad grave, se debe reforzar esta vigilancia virológica de los enterovirus en atención primaria para disponer de una información prospectiva que pueda ser utilizada como herramienta de predicción en salud pública.
9. El potencial neurotropismo de todos los enterovirus no polio es una justificación suficiente para que los enterovirus sean objetos de una estrecha vigilancia, ya que además de los enterovirus clásicamente asociados a enfermedad neurológica (E-30) existen otros también relacionados (EV-C109 o CV-B3). La información aportada por los laboratorios clínicos reforzaría el actual sistema de vigilancia de enterovirus que está especialmente orientado a la monitorización de los casos más graves.
10. Esta Tesis Doctoral ha permitido describir la gran diversidad genética de los rinovirus, y como los diferentes tipos circulan de forma variable a lo largo del periodo de estudio. Sin embargo, más allá de esta información, futuros estudios deberían orientarse para asociar esta diversidad genética con enfermedad, y sobre todo con su gravedad. Así, se podría llegar a considerar esta caracterización de los rinovirus como un factor pronóstico de la evolución clínica en el momento del diagnóstico microbiológico. No obstante, primero todavía queda pendiente conocer el

Conclusiones

verdadero papel de los rinovirus como agentes causales de enfermedad respiratoria.

11. Se ha observado en este estudio como la (re)infección por rinovirus sucede a lo largo de la vida del individuo, ya que se pueden detectar en todos los grupos de edad. Son frecuentes las reinfecciones, favorecidas por esta gran diversidad genética y esta respuesta inmune tipo-específica. Sin embargo, la población pediátrica continúa siendo la más susceptible, tal como ocurre con los enterovirus, aunque se aprecian diferencias en cuanto a la edad de los casos entre las diferentes especies de rinovirus.
12. En general, para un mejor estudio de los picornavirus, su detección se debería complementar con su caracterización genética, no sólo con fines epidemiológicos sino también clínicos. Esta caracterización de los picornavirus por secuenciación puede realizarse en base a una o diferentes regiones del genoma viral, pero para describir con mayor exactitud su diversidad, y teniendo en consideración la gran frecuencia de eventos de recombinación, la mejor opción sería realizar esta caracterización en base a secuencias del genoma completo.
13. Por último, por las eventuales complicaciones derivadas de la infección, aunque escasas para rinovirus, pero más graves para enterovirus, debería ser requisito imprescindible exigir a los métodos de diagnóstico microbiológico una correcta discriminación entre ambos picornavirus para un mejor manejo del paciente y para una mejor información durante las tareas de vigilancia.

REFERENCIAS

1. David M. Knipe PMH. *FIELDS VIROLOGY*. 6th Edition ed. Wilkins LW, editor 2013.
2. Tuthill TJ, Gropelli E, Hogle JM, Rowlands DJ. Picornaviruses. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2010;343:43-89.
3. Picornaviridae.com. The Pirbright Institute UK; 2006. Available from: <http://www.picornaviridae.com/>.
4. Turner RB. Rhinovirus: more than just a common cold virus. *J Infect Dis*. 2007;195(6):765-6.
5. Nikonov OS, Chernykh ES, Garber MB, Nikonova EY. Enteroviruses: Classification, Diseases They Cause, and Approaches to Development of Antiviral Drugs. *Biochemistry (Mosc)*. 2017;82(13):1615-31.
6. Faleye TO, Adewumi MO, Adeniji JA. Defining the Enterovirus Diversity Landscape of a Fecal Sample: A Methodological Challenge? *Viruses*. 2016;8(1).
7. Price WH. THE ISOLATION OF A NEW VIRUS ASSOCIATED WITH RESPIRATORY CLINICAL DISEASE IN HUMANS. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1956;42(12):892-6.
8. International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV). Available from: <https://talk.ictvonline.org/>.
9. ViralZone: <http://www.expasy.org/viralzone>. SIB Swiss Institute of Bioinformatics.
10. Palmenberg AC, Spiro D, Kuzmickas R, Wang S, Djikeng A, Rathe JA, et al. Sequencing and analyses of all known human rhinovirus genomes reveal structure and evolution. *Science*. 2009;324(5923):55-9.
11. Jacobs SE, Lamson DM, St George K, Walsh TJ. Human rhinoviruses. *Clin Microbiol Rev*. 2013;26(1):135-62.
12. Jorgensen JH, Pfaller, M. A., Carroll, K. C., Funke, G., Landry, M. L., Richter, S., i Warnock, D. W. *Manual of Clinical Microbiology*. 11th Edition ed: American Society for Microbiology; 2015.
13. Yuan J, Shen L, Wu J, Zou X, Gu J, Chen J, et al. Enterovirus A71 Proteins: Structure and Function. *Front Microbiol*. 2018;9:286.
14. Kiener TK, Jia Q, Lim XF, He F, Meng T, Chow VT, et al. Characterization and specificity of the linear epitope of the enterovirus 71 VP2 protein. *Virology*. 2012;9:55.

15. Jia Q, Ng Q, Chin W, Meng T, Chow VTK, Wang CI, et al. Effective in vivo therapeutic IgG antibody against VP3 of enterovirus 71 with receptor-competing activity. *Sci Rep.* 2017;7:46402.
16. Chow M, Newman JF, Filman D, Hogle JM, Rowlands DJ, Brown F. Myristylation of picornavirus capsid protein VP4 and its structural significance. *Nature.* 1987;327(6122):482-6.
17. Wang B, Xi X, Lei X, Zhang X, Cui S, Wang J, et al. Enterovirus 71 protease 2Apro targets MAVS to inhibit anti-viral type I interferon responses. *PLoS Pathog.* 2013;9(3):e1003231.
18. Porter AG. Picornavirus nonstructural proteins: emerging roles in virus replication and inhibition of host cell functions. *J Virol.* 1993;67(12):6917-21.
19. Cong H, Du N, Yang Y, Song L, Zhang W, Tien P. Enterovirus 71 2B Induces Cell Apoptosis by Directly Inducing the Conformational Activation of the Proapoptotic Protein Bax. *J Virol.* 2016;90(21):9862-77.
20. Harris JR, Racaniello VR. Amino acid changes in proteins 2B and 3A mediate rhinovirus type 39 growth in mouse cells. *J Virol.* 2005;79(9):5363-73.
21. Xiao X, Lei X, Zhang Z, Ma Y, Qi J, Wu C, et al. Enterovirus 3A facilitates viral replication by promoting PI4KB-ACBD3 interaction. *J Virol.* 2017.
22. Lin JY, Chen TC, Weng KF, Chang SC, Chen LL, Shih SR. Viral and host proteins involved in picornavirus life cycle. *J Biomed Sci.* 2009;16:103.
23. Lei X, Xiao X, Xue Q, Jin Q, He B, Wang J. Cleavage of interferon regulatory factor 7 by enterovirus 71 3C suppresses cellular responses. *J Virol.* 2013;87(3):1690-8.
24. Li ML, Hsu TA, Chen TC, Chang SC, Lee JC, Chen CC, et al. The 3C protease activity of enterovirus 71 induces human neural cell apoptosis. *Virology.* 2002;293(2):386-95.
25. Wang W, Xiao F, Wan P, Pan P, Zhang Y, Liu F, et al. EV71 3D Protein Binds with NLRP3 and Enhances the Assembly of Inflammasome Complex. *PLoS Pathog.* 2017;13(1):e1006123.
26. Liu Y, Wang C, Mueller S, Paul AV, Wimmer E, Jiang P. Direct interaction between two viral proteins, the nonstructural protein 2C and the capsid protein VP3, is required for enterovirus morphogenesis. *PLoS Pathog.* 2010;6(8):e1001066.
27. Bochkov YA, Watters K, Ashraf S, Griggs TF, Devries MK, Jackson DJ, et al. Cadherin-related family member 3, a childhood asthma susceptibility gene product, mediates rhinovirus C binding and replication. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2015;112(17):5485-90.
28. Steinhauer DA, Domingo E, Holland JJ. Lack of evidence for proofreading mechanisms associated with an RNA virus polymerase. *Gene.* 1992;122(2):281-8.
29. Ward CD, Stokes MA, Flanagan JB. Direct measurement of the poliovirus RNA polymerase error frequency in vitro. *J Virol.* 1988;62(2):558-62.

Referencias

30. Bailly JL, Mirand A, Henquell C, Archimbaud C, Chambon M, Regagnon C, et al. Repeated genomic transfers from echovirus 30 to echovirus 6 lineages indicate co-divergence between co-circulating populations of the two human enterovirus serotypes. *Infect Genet Evol.* 2011;11(2):276-89.
31. Simmonds P, Welch J. Frequency and dynamics of recombination within different species of human enteroviruses. *J Virol.* 2006;80(1):483-93.
32. McWilliam Leitch EC, Cabrerizo M, Cardosa J, Harvala H, Ivanova OE, Koike S, et al. The association of recombination events in the founding and emergence of subgenogroup evolutionary lineages of human enterovirus 71. *J Virol.* 2012;86(5):2676-85.
33. M JJaP. Enteroviruses. *Manual of clinical microbiology.* 11th ed: ASM Press; 2015.
34. Roos KL. Pathogenesis and Pathophysiology. *Textbook of Clinical Neurology.* 3rd Edition ed2007.
35. Patrick Murray KR, Michael Pfaller. *Medical Microbiology.* 6th ed. Philadelphia, PA Elsevier2009.
36. Muehlenbachs A, Bhatnagar J, Zaki SR. Tissue tropism, pathology and pathogenesis of enterovirus infection. *J Pathol.* 2015;235(2):217-28.
37. Blaas D, Fuchs R. Mechanism of human rhinovirus infections. *Mol Cell Pediatr.* 2016;3(1):21.
38. Greenberg SB. Update on Human Rhinovirus and Coronavirus Infections. *Semin Respir Crit Care Med.* 2016;37(4):555-71.
39. Fica A, Dabanch J, Andrade W, Bustos P, Carvajal I, Ceroni C, et al. Clinical relevance of rhinovirus infections among adult hospitalized patients. *Braz J Infect Dis.* 2015;19(2):118-24.
40. Tanner H, Boxall E, Osman H. Respiratory viral infections during the 2009-2010 winter season in Central England, UK: incidence and patterns of multiple virus co-infections. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2012;31(11):3001-6.
41. Wang JH, Kwon HJ, Jang YJ. Rhinovirus enhances various bacterial adhesions to nasal epithelial cells simultaneously. *Laryngoscope.* 2009;119(7):1406-11.
42. World Health Organisation (WHO). Global Polio Eradication Initiative: World Health Organisation; Available from: <http://polioeradication.org/polio-today/polio-now/surveillance-indicators/>.
43. Esposito S, Principi N. Hand, foot and mouth disease: current knowledge on clinical manifestations, epidemiology, aetiology and prevention. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2018;37(3):391-8.

44. Kanbayashi D, Kaida A, Yamamoto SP, Hirai Y, Kubo H, Fujimori R, et al. Impact of Coxsackievirus A6 emergence on hand, foot, and mouth disease epidemic in Osaka City, Japan. *J Med Virol*. 2017;89(12):2116-21.
45. Feng X, Guan W, Guo Y, Yu H, Zhang X, Cheng R, et al. A novel recombinant lineage's contribution to the outbreak of coxsackievirus A6-associated hand, foot and mouth disease in Shanghai, China, 2012-2013. *Sci Rep*. 2015;5:11700.
46. Solomon T, Lewthwaite P, Perera D, Cardosa MJ, McMinn P, Ooi MH. Virology, epidemiology, pathogenesis, and control of enterovirus 71. *Lancet Infect Dis*. 2010;10(11):778-90.
47. Osterback R, Vuorinen T, Linna M, Susi P, Hyypiä T, Waris M. Coxsackievirus A6 and hand, foot, and mouth disease, Finland. *Emerg Infect Dis*. 2009;15(9):1485-8.
48. Gaunt E, Harvala H, Österback R, Sreenu VB, Thomson E, Waris M, et al. Genetic characterization of human coxsackievirus A6 variants associated with atypical hand, foot and mouth disease: a potential role of recombination in emergence and pathogenicity. *J Gen Virol*. 2015;96(Pt 5):1067-79.
49. Baggen J, Thibaut HJ, Strating JRPM, van Kuppeveld FJM. The life cycle of non-polio enteroviruses and how to target it. *Nat Rev Microbiol*. 2018;16(6):368-81.
50. European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). Rapid risk assesment - Outbreak of enterovirus A71 with severe neurological symptoms among children in Catalonia, Spain; June 2016.
51. Poelman R, Schuffenecker I, Van Leer-Buter C, Josset L, Niesters HG, Lina B, et al. European surveillance for enterovirus D68 during the emerging North-American outbreak in 2014. *J Clin Virol*. 2015;71:1-9.
52. Nelson R. Outbreaks of enterovirus D68 continue across the USA. *Lancet Respir Med*. 2014;2(10):791.
53. Casas-Alba D, de Sevilla MF, Valero-Rello A, Fortuny C, García-García JJ, Ortez C, et al. Outbreak of brainstem encephalitis associated with enterovirus-A71 in Catalonia, Spain (2016): a clinical observational study in a children's reference centre in Catalonia. *Clin Microbiol Infect*. 2017.
54. Schieble JH, Fox VL, Lennette EH. A probable new human picornavirus associated with respiratory diseases. *Am J Epidemiol*. 1967;85(2):297-310.
55. Bitnun A, Yeh EA. Acute Flaccid Paralysis and Enteroviral Infections. *Curr Infect Dis Rep*. 2018;20(9):34.
56. Tokarz R, Firth C, Madhi SA, Howie SR, Wu W, Sall AA, et al. Worldwide emergence of multiple clades of enterovirus 68. *J Gen Virol*. 2012;93(Pt 9):1952-8.

Referencias

57. Midgley CM, Watson JT, Nix WA, Curns AT, Rogers SL, Brown BA, et al. Severe respiratory illness associated with a nationwide outbreak of enterovirus D68 in the USA (2014): a descriptive epidemiological investigation. *Lancet Respir Med.* 2015;3(11):879-87.
58. Zeng H, Lu J, Yang F, Liu L, Zheng H, Ke C, et al. The increasing epidemic of hand, foot, and mouth disease caused by coxsackievirus-A6, Guangdong, China, 2017. *J Infect.* 2018;76(2):220-3.
59. World Health Organisation (WHO), Centre for Disease Prevention and Control (CDC). Enterovirus surveillance guidelines - guidelines for enterovirus surveillance in support of the Polio Eradication Initiative. 2015.
60. European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). Rapid Risk Assessment – Enterovirus detections associated with severe neurological symptoms in children and adults in European countries, 8 August 2016. Stockholm; 2016.
61. ANDREWES CH. The taxonomic position of common cold viruses and some others. *Yale J Biol Med.* 1961;34:200-6.
62. Muir P, Kämmerer U, Korn K, Mulders MN, Pöyry T, Weissbrich B, et al. Molecular typing of enteroviruses: current status and future requirements. The European Union Concerted Action on Virus Meningitis and Encephalitis. *Clin Microbiol Rev.* 1998;11(1):202-27.
63. Harvala H, Broberg E, Benschop K, Berginc N, Ladhani S, Susi P, et al. Recommendations for enterovirus diagnostics and characterisation within and beyond Europe. *J Clin Virol.* 2018;101:11-7.
64. Lu X, Holloway B, Dare RK, Kuypers J, Yagi S, Williams JV, et al. Real-time reverse transcription-PCR assay for comprehensive detection of human rhinoviruses. *J Clin Microbiol.* 2008;46(2):533-9.
65. Modlin JF. Coxsackieviruses, Echoviruses and Newer Enteroviruses. In: G. L. Madell JEBaRD, editor. *Principles and Practice of Infectious Diseases.* 2: Philadelphia, Churchill Livingstone.; 2005. p. 2148-61.
66. Immunization, Vaccines and Biologicals: Poliomyelitis World Health Organisation (WHO). Available from: <https://www.who.int/immunization/diseases/poliomyelitis/en/>.
67. Trallero G, Avellón A, Otero A, de Miguel T, Alonso M, Pérez-Breña P, et al. [Laboratory Network within the Polio Eradication Initiative (1998-2003): six years of surveillance for acute flaccid paralysis in Spain]. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2006;24(3):167-72.
68. Modlin JF. Poliovirus. In: G. L. Madell JEBaRD, editor. *Principles and Practice of Infectious Diseases.* 2: Philadelphia, Churchill Livingstone.; 2005. p. 2141-8.

69. Mao Q, Wang Y, Bian L, Xu M, Liang Z. EV-A71 vaccine licensure: a first step for multivalent enterovirus vaccine to control HFMD and other severe diseases. *Emerg Microbes Infect.* 2016;5(7):e75.
70. Holm-Hansen CC, Midgley SE, Schjørring S, Fischer TK. The importance of enterovirus surveillance in a Post-polio world. *Clin Microbiol Infect.* 2017;23(6):352-4.
71. Organisation WH. Polio laboratory manual. 2004.
72. Noemí López-Perea MCS, María de Viarce Torres de Mier, Beatriz Fernández Martínez, Josefa Masa Calles, Enterovirus y Grupo de Vigilancia de la Parálisis Flácida Aguda en España.. Vigilancia de la Parálisis Flácida Aguda y Vigilancia de Enterovirus, 2016 PLAN DE ACCIÓN EN ESPAÑA PARA LA ERRADICACIÓN DE LA POLIOMIELITIS 2016.
73. Protocol per la vigilància de les paràlisis flàccides agudes en menors de 15 anys.: Subdirecció general de la vigilància i resposta a emergències en salut pública. Agència de Salut Pública. Generalitat de Catalunya.; 2018.
74. Gimferrer L, Campins M, Codina MG, Esperalba J, Martin MeC, Fuentes F, et al. First Enterovirus D68 (EV-D68) cases detected in hospitalised patients in a tertiary care university hospital in Spain, October 2014. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2015;33(9):585-9.
75. Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol Biol Evol.* 2011;28(10):2731-9.
76. Kroneman A, Vennema H, Deforche K, v d Avoort H, Peñaranda S, Oberste MS, et al. An automated genotyping tool for enteroviruses and noroviruses. *J Clin Virol.* 2011;51(2):121-5.
77. Edgar RC. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res.* 2004;32(5):1792-7.
78. Song Y, Zhang Y, Ji T, Gu X, Yang Q, Zhu S, et al. Persistent circulation of Coxsackievirus A6 of genotype D3 in mainland of China between 2008 and 2015. *Sci Rep.* 2017;7(1):5491.
79. Granados A, Luinstra K, Chong S, Goodall E, Banh L, Mubareka S, et al. Use of an improved quantitative polymerase chain reaction assay to determine differences in human rhinovirus viral loads in different populations. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2012;74(4):384-7.
80. Savolainen C, Mulders MN, Hovi T. Phylogenetic analysis of rhinovirus isolates collected during successive epidemic seasons. *Virus Res.* 2002;85(1):41-6.
81. Khetsuriani N, Lamonte-Fowlkes A, Oberst S, Pallansch MA, Prevention CfDca. Enterovirus surveillance--United States, 1970-2005. *MMWR Surveill Summ.* 2006;55(8):1-20.
82. Calvo C, Gallardo P, Torija P, Bellón S, Méndez-Echeverría A, Del Rosal T, et al. Enterovirus neurological disease and bacterial coinfection in very young infants with fever. *J Clin Virol.* 2016;85:37-9.

Referencias

83. European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). Rapid risk assesment - Outbreak of enterovirus A71 with severe neurological symptoms among children in Catalonia, Spain. June 2016.
84. Midgley CM, Jackson MA, Selvarangan R, Turabelidze G, Obringer E, Johnson D, et al. Severe respiratory illness associated with enterovirus D68 - Missouri and Illinois, 2014. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 2014;63(36):798-9.
85. Cristina Andrés, Jorgina Vila, Maria Piñana, Juliana Esperalba, Jesús Trejo-Zahínos, Maria Gema Codina, Maria Carmen Martín, Francisco Fuentes, Susana Rubio, Carlos Rodrigo, Tomàs Pumarola, Andrés Antón. Surveillance of EV-D68 (2014-2018) in hospitalised paediatric population: a task focused on severe cases.: XV Congress of the Spanish Society of Virology/11th International Meeting GVN 2019.
86. Cabrerizo M, Díaz-Cerio M, Muñoz-Almagro C, Rabella N, Tarragó D, Romero MP, et al. Molecular epidemiology of enterovirus and parechovirus infections according to patient age over a 4-year period in Spain. *J Med Virol.* 2017;89(3):435-42.
87. Cabrerizo M, Grupo Para El Estudio de Las Infecciones Por Enterovirus Y Parechovirus GPEE. Importance of enteroviruses in neuropaediatrics: from polioviruses to other enteroviruses. *Rev Neurol.* 2017;64(s03):S35-S8.
88. Bal A, Sabatier M, Wirth T, Coste-Burel M, Lazrek M, Stefic K, et al. Emergence of enterovirus D68 clade D1, France, August to November 2018. *Euro Surveill.* 2019;24(3).
89. Pellegrinelli L, Giardina F, Lunghi G, Uceda Renteria SC, Greco L, Fratini A, et al. Emergence of divergent enterovirus (EV) D68 sub-clade D1 strains, northern Italy, September to October 2018. *Euro Surveill.* 2019;24(7).
90. Cottrell S, Moore C, Perry M, Hilvers E, Williams C, Shankar AG. Prospective enterovirus D68 (EV-D68) surveillance from September 2015 to November 2018 indicates a current wave of activity in Wales. *Euro Surveill.* 2018;23(46).
91. Kramer R, Sabatier M, Wirth T, Pichon M, Lina B, Schuffenecker I, et al. Molecular diversity and biennial circulation of enterovirus D68: a systematic screening study in Lyon, France, 2010 to 2016. *Euro Surveill.* 2018;23(37).
92. Lugo D, Krogstad P. Enteroviruses in the early 21st century: new manifestations and challenges. *Curr Opin Pediatr.* 2016;28(1):107-13.
93. Schuster JE, Miller JO, Selvarangan R, Weddle G, Thompson MT, Hassan F, et al. Severe enterovirus 68 respiratory illness in children requiring intensive care management. *J Clin Virol.* 2015;70:77-82.
94. Knoester M, Schölvink EH, Poelman R, Smit S, Vermont CL, Niesters HG, et al. Upsurge of Enterovirus D68, the Netherlands, 2016. *Emerg Infect Dis.* 2017;23(1):140-3.

95. Midgley SE, Christiansen CB, Poulsen MW, Hansen CH, Fischer TK. Emergence of enterovirus D68 in Denmark, June 2014 to February 2015. *Euro Surveill.* 2015;20(17).
96. Pfeiffer HC, Bragstad K, Skram MK, Dahl H, Knudsen PK, Chawla MS, et al. Two cases of acute severe flaccid myelitis associated with enterovirus D68 infection in children, Norway, autumn 2014. *Euro Surveill.* 2015;20(10):21062.
97. Cabrerizo M, García-Iñiguez JP, Munell F, Amado A, Madurga-Revilla P, Rodrigo C, et al. First Cases of Severe Flaccid Paralysis Associated with Enterovirus D68 Infection in Spain, 2015-2016. *Pediatr Infect Dis J.* 2017.
98. ROBINSON CR, DOANE FW, RHODES AJ. Report of an outbreak of febrile illness with pharyngeal lesions and exanthem: Toronto, summer 1957; isolation of group A Coxsackie virus. *Can Med Assoc J.* 1958;79(8):615-21.
99. Mirand A, Peigue-Lafeuille H. [Clinical characteristics and course of hand, foot, and mouth disease]. *Arch Pediatr.* 2017;24(10):1036-46.
100. Cabrerizo M, Tarragó D, Muñoz-Almagro C, Del Amo E, Domínguez-Gil M, Eiros JM, et al. Molecular epidemiology of enterovirus 71, coxsackievirus A16 and A6 associated with hand, foot and mouth disease in Spain. *Clin Microbiol Infect.* 2014;20(3):O150-6.
101. Akhmadishina LV, Govorukhina MV, Kovalev EV, Nenadskaya SA, Ivanova OE, Lukashev AN. Enterovirus A71 Meningoencephalitis Outbreak, Rostov-on-Don, Russia, 2013. *Emerg Infect Dis.* 2015;21(8):1440-3.
102. Bian L, Wang Y, Yao X, Mao Q, Xu M, Liang Z. Coxsackievirus A6: a new emerging pathogen causing hand, foot and mouth disease outbreaks worldwide. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2015;13(9):1061-71.
103. A Guide to Clinical Management and Public Health Response for Hand, Foot and Mouth Disease (HFMD) World Health Organisation (WHO), Western Pacific Region.; 2011.
104. van der Sanden S, Koopmans M, Uslu G, van der Avoort H, Virology DWGfC. Epidemiology of enterovirus 71 in the Netherlands, 1963 to 2008. *J Clin Microbiol.* 2009;47(9):2826-33.
105. Schmidt NJ, Lennette EH, Ho HH. An apparently new enterovirus isolated from patients with disease of the central nervous system. *J Infect Dis.* 1974;129(3):304-9.
106. Chumakov M, Voroshilova M, Shindarov L, Lavrova I, Gracheva L, Koroleva G, et al. Enterovirus 71 isolated from cases of epidemic poliomyelitis-like disease in Bulgaria. *Arch Virol.* 1979;60(3-4):329-40.
107. Nagy G, Takátsy S, Kukán E, Mihály I, Dömök I. Virological diagnosis of enterovirus type 71 infections: experiences gained during an epidemic of acute CNS diseases in Hungary in 1978. *Arch Virol.* 1982;71(3):217-27.

Referencias

108. Taravilla CN, Pérez-Sebastián I, Salido AG, Serrano CV, Extremera VC, Rodríguez AD, et al. Enterovirus A71 Infection and Neurologic Disease, Madrid, Spain, 2016. *Emerg Infect Dis.* 2019;25(1).
109. González-Sanz R, Casas-Alba D, Launes C, Muñoz-Almagro C, Ruiz-García MM, Alonso M, et al. Molecular epidemiology of an enterovirus A71 outbreak associated with severe neurological disease, Spain, 2016. *Euro Surveill.* 2019;24(7).
110. Takamatsu Y, Uchida L, Nga PT, Okamoto K, Nabeshima T, Thao DT, et al. An approach for differentiating echovirus 30 and Japanese encephalitis virus infections in acute meningitis/encephalitis: a retrospective study of 103 cases in Vietnam. *Virology.* 2013;10:280.
111. Laxmivandana R, Cherian SS, Yergolkar P, Chitambar SD. Genomic characterization of coxsackievirus type B3 strains associated with acute flaccid paralysis in south-western India. *J Gen Virol.* 2016;97(3):694-705.
112. Grard G, Drexler JF, Lekana-Douki S, Caron M, Lukashev A, Nkoghe D, et al. Type 1 wild poliovirus and putative enterovirus 109 in an outbreak of acute flaccid paralysis in Congo, October-November 2010. *Euro Surveill.* 2010;15(47).
113. Benschop KS, Rahamat-Langendoen JC, van der Avoort HG, Claas EC, Pas SD, Schuurman R, et al. VIRO-TypeNed, systematic molecular surveillance of enteroviruses in the Netherlands between 2010 and 2014. *Euro Surveill.* 2016;21(39).
114. Center for Prevention and Disease Control. Outbreaks of aseptic meningitis associated with echoviruses 9 and 30 and preliminary surveillance reports on enterovirus activity--United States, 2003. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 2003;52(32):761-4.
115. Vestergaard HT, Johnsen CK, Böttiger B. An unusual enterovirus outbreak in Denmark: clinical characteristics and molecular epidemiology. *Scand J Infect Dis.* 2004;36(11-12):840-7.
116. Zhao YN, Jiang QW, Jiang RJ, Chen L, Perlin DS. Echovirus 30, Jiangsu Province, China. *Emerg Infect Dis.* 2005;11(4):562-7.
117. Dos Santos GP, Skraba I, Oliveira D, Lima AA, de Melo MM, Kmetzsch CI, et al. Enterovirus meningitis in Brazil, 1998-2003. *J Med Virol.* 2006;78(1):98-104.
118. Broberg EK, Simone B, Jansa J, The Eu/Eea Member State Contributors. Upsurge in echovirus 30 detections in five EU/EEA countries, April to September, 2018. *Euro Surveill.* 2018;23(44).
119. Benschop KS, Geeraedts F, Beuvink B, Spit SA, Fanoy EB, Claas EC, et al. Increase in ECHOvirus 6 infections associated with neurological symptoms in the Netherlands, June to August 2016. *Euro Surveill.* 2016;21(39).

120. Mirand A, le Sage FV, Pereira B, Cohen R, Levy C, Archimbaud C, et al. Ambulatory Pediatric Surveillance of Hand, Foot and Mouth Disease as Signal of an Outbreak of Coxsackievirus A6 Infections, France, 2014-2015. *Emerg Infect Dis.* 2016;22(11):1884-93.
121. Wang SH, Wang A, Liu PP, Zhang WY, Du J, Xu S, et al. Divergent Pathogenic Properties of Circulating Coxsackievirus A6 Associated with Emerging Hand, Foot, and Mouth Disease. *J Virol.* 2018;92(11).
122. Koh WM, Bogich T, Siegel K, Jin J, Chong EY, Tan CY, et al. The Epidemiology of Hand, Foot and Mouth Disease in Asia: A Systematic Review and Analysis. *Pediatr Infect Dis J.* 2016;35(10):e285-300.
123. McMinn P, Lindsay K, Perera D, Chan HM, Chan KP, Cardoso MJ. Phylogenetic analysis of enterovirus 71 strains isolated during linked epidemics in Malaysia, Singapore, and Western Australia. *J Virol.* 2001;75(16):7732-8.
124. Blomqvist S, Klemola P, Kaijalainen S, Paananen A, Simonen ML, Vuorinen T, et al. Co-circulation of coxsackieviruses A6 and A10 in hand, foot and mouth disease outbreak in Finland. *J Clin Virol.* 2010;48(1):49-54.
125. Puenpa J, Vongpunsawad S, Österback R, Waris M, Eriksson E, Albert J, et al. Molecular epidemiology and the evolution of human coxsackievirus A6. *J Gen Virol.* 2016;97(12):3225-31.
126. Wang J, Teng Z, Cui X, Li C, Pan H, Zheng Y, et al. Epidemiological and serological surveillance of hand-foot-and-mouth disease in Shanghai, China, 2012-2016. *Emerg Microbes Infect.* 2018;7(1):8.
127. Lukashev AN, Shumilina EY, Belalov IS, Ivanova OE, Eremeeva TP, Reznik VI, et al. Recombination strategies and evolutionary dynamics of the Human enterovirus A global gene pool. *J Gen Virol.* 2014;95(Pt 4):868-73.
128. McWilliam Leitch EC, Cabrerizo M, Cardoso J, Harvala H, Ivanova OE, Kroes AC, et al. Evolutionary dynamics and temporal/geographical correlates of recombination in the human enterovirus echovirus types 9, 11, and 30. *J Virol.* 2010;84(18):9292-300.
129. Pla d'informació de les infeccions respiratòries agudes a Catalunya (PIDIRAC): Agència de Salut Pública de Catalunya, Generalitat de Catalunya; 1999. Available from: <http://canalsalut.gencat.cat/ca/professionals/vigilancia-epidemiologica/pla-dinformacio-de-les-infeccions-respiratories-agudes-a-catalunya-pidirac/>.
130. Iwane MK, Prill MM, Lu X, Miller EK, Edwards KM, Hall CB, et al. Human rhinovirus species associated with hospitalizations for acute respiratory illness in young US children. *J Infect Dis.* 2011;204(11):1702-10.

131. Lu QB, Wo Y, Wang LY, Wang HY, Huang DD, Zhang XA, et al. Molecular epidemiology of human rhinovirus in children with acute respiratory diseases in Chongqing, China. *Sci Rep*. 2014;4:6686.
132. Pierangeli A, Ciccozzi M, Chiavelli S, Concato C, Giovanetti M, Cella E, et al. Molecular epidemiology and genetic diversity of human rhinovirus affecting hospitalized children in Rome. *Med Microbiol Immunol*. 2013;202(4):303-11.
133. Sansone M, Andersson M, Brittain-Long R, Andersson LM, Olofsson S, Westin J, et al. Rhinovirus infections in western Sweden: a four-year molecular epidemiology study comparing local and globally appearing types. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2013;32(7):947-54.
134. Peltola V, Waris M, Kainulainen L, Kero J, Ruuskanen O. Virus shedding after human rhinovirus infection in children, adults and patients with hypogammaglobulinaemia. *Clin Microbiol Infect*. 2013;19(7):E322-7.
135. Antón A, Marcos MA, Torner N, Isanta R, Camps M, Martínez A, et al. Virological surveillance of influenza and other respiratory viruses during six consecutive seasons from 2006 to 2012 in Catalonia, Spain. *Clin Microbiol Infect*. 2016;22(6):564.e1-9.
136. Muenchhoff M, Goulder PJ. Sex differences in pediatric infectious diseases. *J Infect Dis*. 2014;209 Suppl 3:S120-6.
137. Henquell C, Mirand A, Deusebis AL, Regagnon C, Archimbaud C, Chambon M, et al. Prospective genotyping of human rhinoviruses in children and adults during the winter of 2009-2010. *J Clin Virol*. 2012;53(4):280-4.
138. van der Linden L, Bruning AH, Thomas XV, Minnaar RP, Rebers SP, Schinkel J, et al. A molecular epidemiological perspective of rhinovirus types circulating in Amsterdam from 2007 to 2012. *Clin Microbiol Infect*. 2016;22(12):1002.e9-.e14.
139. McCulloch DJ, Sears MH, Jacob JT, Lyon GM, Burd EM, Caliendo AM, et al. Severity of rhinovirus infection in hospitalized adults is unrelated to genotype. *Am J Clin Pathol*. 2014;142(2):165-72.
140. Calvo C, Casas I, García-García ML, Pozo F, Reyes N, Cruz N, et al. Role of rhinovirus C respiratory infections in sick and healthy children in Spain. *Pediatr Infect Dis J*. 2010;29(8):717-20.
141. Cuevas MT, Molinero M, Pozo F, Calvo C, García-García ML, Reyes N, et al. Spread of different rhinovirus B genotypes in hospitalized children in Spain. *Influenza Other Respir Viruses*. 2013;7(5):623-8.
142. Kaida A, Kubo H, Takakura K, Togawa M, Shiomi M, Kohdera U, et al. Molecular epidemiology of human rhinovirus C in patients with acute respiratory tract infections in Osaka City, Japan. *Jpn J Infect Dis*. 2011;64(6):488-92.

143. Wisdom A, Kutkowska AE, McWilliam Leitch EC, Gaunt E, Templeton K, Harvala H, et al. Genetics, recombination and clinical features of human rhinovirus species C (HRV-C) infections; interactions of HRV-C with other respiratory viruses. *PLoS One*. 2009;4(12):e8518.
144. Tsatsral S, Xiang Z, Fuji N, Maitsetseg C, Khulan J, Oshitani H, et al. Molecular Epidemiology of the Human Rhinovirus Infection in Mongolia during 2008-2013. *Jpn J Infect Dis*. 2015;68(4):280-7.
145. Lau SK, Yip CC, Lin AW, Lee RA, So LY, Lau YL, et al. Clinical and molecular epidemiology of human rhinovirus C in children and adults in Hong Kong reveals a possible distinct human rhinovirus C subgroup. *J Infect Dis*. 2009;200(7):1096-103.
146. Onyango CO, Welch SR, Munywoki PK, Agoti CN, Bett A, Ngama M, et al. Molecular epidemiology of human rhinovirus infections in Kilifi, coastal Kenya. *J Med Virol*. 2012;84(5):823-31.
147. Chu HY, Englund JA, Strelitz B, Lacombe K, Jones C, Follmer K, et al. Rhinovirus Disease in Children Seeking Care in a Tertiary Pediatric Emergency Department. *J Pediatric Infect Dis Soc*. 2016;5(1):29-38.
148. Achten NB, Wu P, Bont L, Blanken MO, Gebretsadik T, Chappell JD, et al. Interference Between Respiratory Syncytial Virus and Human Rhinovirus Infection in Infancy. *J Infect Dis*. 2017;215(7):1102-6.
149. McAllister SC, Schleiss MR, Arbefeville S, Steiner ME, Hanson RS, Pollock C, et al. Epidemic 2014 enterovirus D68 cross-reacts with human rhinovirus on a respiratory molecular diagnostic platform. *PLoS One*. 2015;10(3):e0118529.

ANEXOS

ARTÍCULO 1

Factor de impacto: 3.020 (2018); Cuartil: Q2 (2018); DOI: 10.1016/j.jcv.2018.11.004

Journal of Clinical Virology 110 (2019) 29–35



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Clinical Virology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jcv

Surveillance of enteroviruses from paediatric patients attended at a tertiary hospital in Catalonia from 2014 to 2017



Cristina Andrés^a, Jorgina Vila^b, Laura Gimferrer^a, Maria Piñana^a, Juliana Esperalba^a, Maria Gema Codina^a, Meritzell Barnés^b, Maria Carmen Martín^a, Francisco Fuentes^a, Susana Rubio^a, Pilar Alcubilla^a, Carlos Rodrigo^b, Tomàs Pumarola^{a,*}, Andrés Antón^a

^a Respiratory Viruses Unit, Virology Section, Microbiology Department, Hospital Universitari Vall d'Hebron, Vall d'Hebron Research Institute, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain

^b Paediatric Hospitalisation Unit, Department of Paediatrics, Hospital Universitari Maternoinfantil Vall d'Hebron, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain

ARTICLE INFO

Keywords:
Enteroviruses
Respiratory infections
Surveillance
Genetic diversity
Molecular epidemiology
Paediatric population

ABSTRACT

Background: Enterovirus (EV) infections are usually asymptomatic or mild, but symptomatic infections can evolve to severe complications. Outbreaks of EV-A71 and EV-D68 have been recently reported worldwide, sometimes related to severe clinical outcomes.

Objective: To describe EV genetic diversity and the clinical outcomes from paediatric patients attended at a tertiary university hospital in Barcelona (Catalonia, Spain) from 2014 to 2017.

Study design: Specimens were collected from paediatric (< 17 years old) cases with suspicion of respiratory tract infection or EV infection. EV laboratory-confirmation was performed by specific real-time multiplex RT-PCR assay. Partial viral VP1 protein was sequenced for genetic characterisation by phylogenetic analyses.

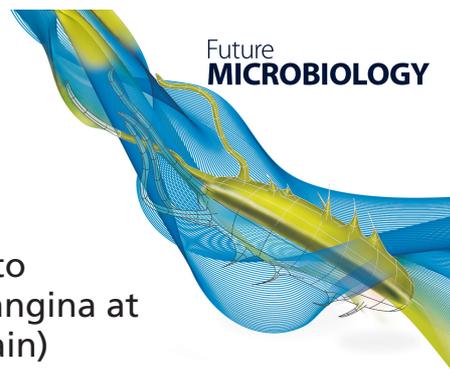
Results: A total of 376 (7%) from 5703 cases were EV laboratory-confirmed. Phylogenetic analyses of VP1 (210; 81%) sequences distinguished up to 27 different EV types distributed within EV-A (82; 40%), EV-B (90; 42%), EV-C (5; 2%), and EV-D (33; 15%), in addition to 50 (19%) rhinoviruses. The most predominant were EV-A71 (37; 45%) and EV-D68 (32; 99%). EV-A71 was highly related to neurological complications (25/39, 63%), of which 20/39 were rhombencephalitis, and most EV-D68 (28/32, 88%) were associated with lower respiratory tract infections (LRTI), and exceptionally one (3%) with acute flaccid paralysis.

Conclusions: EV-A71 and EV-D68 were the most detected EV in respiratory specimens. EV-A71 was highly related to neurological disease and EV-D68 was often associated with LRTI. However, both potential relatedness to neurological diseases makes the monitoring of EV circulation obligatory.

ARTÍCULO 2

Factor de impacto: 3.190 (2017); Cuartil: Q2 (2017); DOI: 10.2217/fmb-2018-0336

Short Communication

For reprint orders, please contact: reprints@futuremedicine.com

Recombinant CV-A6 strains related to hand-foot-mouth disease and herpangina at primary care centers (Barcelona, Spain)

Cristina Andrés¹, Eulàlia Guasch², Maria Piñana¹, Paula Fernandes¹, Laura Gimferrer¹, Diego Van Esso², Maria Gema Codina¹, Juliana Esperalba¹, Jorgina Vila³, Carlos Rodrigo³, Maria Carmen Martín¹, Francisco Fuentes¹, Susana Rubio¹, Tomàs Pumarola*¹, Group for EV Surveillance in Pediatric Primary Care² & Andrés Antón¹

¹Respiratory Viruses Unit, Virology Section, Microbiology Department, Hospital Universitari Vall d'Hebron, Vall d'Hebron Research Institute, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain.

²Primary Care Service Muntanya, Institut Català de la Salut, Department of Health, Barcelona, Spain.

³Paediatric Hospitalisation Unit, Department of Paediatrics, Hospital Universitari Maternoinfantil Vall d'Hebron, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain.

*Author for correspondence: virusesrespiratoris@vhebron.net

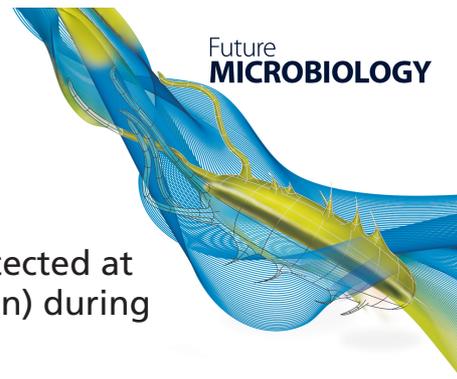
Aim: To describe the genetic diversity of enteroviruses (EV) causing hand, foot and mouth disease (HFMD) and herpangina, especially of coxsackievirus (CV)-A6, from patients attended at pediatric primary care centers during the 2017–2018 season. **Methods:** Phylogenetic analysis of partial VP1 region was performed for genetic characterization. The complete VP1 and 3Dpol proteins were sequenced for lineage determination and detection of recombination events. **Results:** An 80% of samples were EV laboratory-confirmed. CV-A6 was the most detected (70%) and associated with atypical HFMD (78%). The comparison of VP1 and 3Dpol phylogenies showed evidence of recombination in three strains, in which two shifted to CV-A16 3Dpol. **Conclusion:** The study provides recent information regarding the nonrecombinant and recombinant EVs related to HFMD at primary care centers.

First draft submitted: 3 December 2018; Accepted for publication: 28 February 2019; Published online: 29 April 2019

Keywords: coxsackievirus A6 • enteroviruses • hand, food and mouth disease • herpangina • pediatric infections

ARTÍCULO 3**Factor de impacto:** 3.190 (2017); **Cuartil:** Q2 (2017); **DOI:** 10.2217/fmb-2018-0151

Research Article

For reprint orders, please contact: reprints@futuremedicine.com

Genetic diversity of rhinoviruses detected at a tertiary hospital in Catalonia (Spain) during the 2014–2017 seasons

Cristina Andrés¹, Paula Peremiquel-Trillas², Laura Gimferrer¹, Anna Isern¹, Maria Piñana¹, José Ángel Rodrigo-Pendás², Maria Gema Codina¹, Maria del Carmen Martín¹, Francisco Fuentes¹, Susana Rubio¹, Magda Campins-Martí², Tomàs Pumarola^{*,1} & Andrés Antón¹

¹Respiratory Viruses Unit, Virology Section, Microbiology Department, Hospital Universitari Vall d'Hebron, Vall d'Hebron Research Institute, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain

²Preventive Medicine & Epidemiology Department, Hospital Universitari Vall d'Hebron, Universitat Autònoma de Barcelona, Vall Hebron Research Institute, Barcelona, Spain

*Author for correspondence: virusrespiratoris@vhebron.net

Aim: To describe the genetic diversity of rhinovirus (RV) from patients attended at a tertiary hospital in Barcelona (Spain) from October 2014 to May 2017. **Methods:** RV detection was performed by real-time multiplex RT-PCR. A specific real-time quantitative retrotranscription PCR (qRT-PCR) was carried out to select those samples (Ct < 35) for molecular characterization based on partial VP4/2 protein. **Results:** Phylogenetic characterization revealed proportions of 63% RV-A, 6% RV-B and 31% RV-C (119 different types). RV-A circulated throughout all the study period, with a minor circulation during winter, just when RV-C prevailed. Differences between age medians by RV-specie were reported. **Conclusion:** The large genetic diversity of RV detected in our area is described here. The variable cocirculation of multiple RV types is also reported, showing differences by age.

First draft submitted: 14 May 2018; Accepted for publication: 15 August 2018; Published online: 12 November 2018

Keywords: evolution • genetic diversity • mild respiratory diseases • molecular epidemiology • pediatric patients • respiratory tract infection • respiratory virus • rhinovirus • RV circulation • surveillance

ARTÍCULO 4: High genetic similarity between rhinoviruses and enteroviruses remains as a pitfall for molecular diagnostic tools: a three-year overview

Autores: Cristina Andrés¹, Maria Piñana¹, Jorgina Vila², Juliana Esperalba¹, Jesús Trejo-Zahínos¹, Maria Gema Codina¹, Maria Carmen Martín¹, Francisco Fuentes¹, Susana Rubio¹, Tomàs Pumarola¹, Andrés Antón¹

Afiliaciones:

¹Respiratory Viruses Unit, Virology Section, Microbiology Department, Hospital Universitari Vall d'Hebron - Vall d'Hebron Research Institute, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain.

²Paediatric Hospitalisation Unit, Department of Paediatrics, Hospital Universitari Infantil Vall d'Hebron, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain.

Estado: En revisión.

Revista: Infection, Genetics and Evolution. **Factor de impacto:** 2.611; **Cuartil:** Q2.

PRODUCCIÓN CIENTÍFICA DURANTE LA TESIS DOCTORAL (CONGRESOS)

- **COMUNICACIÓN ORAL**

1. Guasch E, van Esso D, Hernando E, Soler L, Trifu I, Aloy G, Ferrer J, Carreras M, Picas J, Rodrigo C, Andrés C, Martín MC, Antón A y Grupo BCN_EV en AP. **Vigilància virològica dels enterovirus no pòlio en pacients pediàtrics diagnosticats d'herpangina o boca-mà-peu en l'atenció primària de Barcelona ciutat**. 25 Reunió anual de la Societat Catalana de Pediatria a Barcelona.
2. Iglesias S, van Esso D, Vilà M, Losada L, Sánchez L, Ferrer J, Ferrandez MA, Morera P, Andrés C, Antón A, Rodrigo C i Equip BCN_FLU. **Característiques clíniques de la grip en lactants i nens menors de 6 anys diagnosticats a l'Atenció Primària. Temporada 2017/18**. 25 Reunió anual de la Societat Catalana de Pediatria a Barcelona.
3. Cristina Andrés; Jorgina Vila; Laura Gimferrer; Maria Piñana; Juliana Esperalba; Maria Gema Codina; Mertixell Barnés; Maria del Carmen Martín; Francisco Fuentes; Susana Rubio; Pilar Alcubilla; Carlos Rodrigo; Tomàs Pumarola; Andrés Antón. **Virological and clinical surveillance (2014-2017) of respiratory enteroviruses from paediatric patients attended at a tertiary hospital in Catalonia (Spain)**. XVII Jornada de Virologia, 2018 (Barcelona, España).
4. Meritxell Barnés; Cristina Andrés; Jorgina Vila; Maria del Carmen Martín; Andrés Antón; Carlos Rodrigo. **Infecciones Por Enterovirus En Pediatría: Revisión De Los Casos Detectados En Un Hospital De Tercer Nivel Durante Las Temporadas 2014-2017 Y Correlación Entre El Tipo De Enterovirus Y La Clínica**. 66 Congreso de la Asociación Española de Pediatría, 2018 (Zaragoza, España).
5. Maria Piñana, Jorgina Vila, Jordi Saura, Cristina Andrés, Laura Gimferrer, Maria Gema Codina, Íngrid Subirana, Francisco Fuentes, Maria del Carmen Martín, Susana Rubio, Carlos Rodrigo, Tomàs Pumarola, Andrés Antón. **Molecular characterisation and clinical impact of human bocavirus at a tertiary university hospital in Barcelona (Catalonia, Spain)**. 36th annual Meeting of the European Society for Paediatric Infectious Diseases, 2018 (Malmö, Suecia).
6. Cristina Andrés, Margarita del Cuerpo, Laura Gimferrer, Nuria Rabella, María Piñana, María Gema Codina, María Carmen Martín, Francisco Fuentes, Tomàs Pumarola, Andrés Antón. **Detection of reassortant influenza B strains from 2004 to 2015 seasons in Barcelona (Spain) by whole genome sequencing (WGS)**. 20th annual Meeting of the European Society for Clinical Virology, 2017 (Stresa, Italia).
7. María Piñana, Laura Gimferrer, Cristina Andrés, María Gema Codina, Francisco Fuentes, María Carmen Martín, Susana Rubio, Pilar Alcubilla, Tomàs Pumarola, Andrés Antón. **Noves variants de metapneumovirus humà portadores de duplicacions de 180 i 111 nucleòtids al gen G detectades a un hospital universitari terciari a Catalunya des de la temporada 2014-2015**. V Jornada científica del Departament de Genètica i Microbiologia, 2017 (Bellaterra, España).

8. María Piñana, Laura Gimferrer, Cristina Andrés, María Gema Codina, María Carmen Martín, Francisco Fuentes, Rosario Saiz, Pilar Alcubilla, Tomàs Pumarola, Andrés Antón. **A novel human metapneumovirus carrying a 180-nucleotide duplication within the coding G protein region detected at a tertiary university hospital in Catalonia since the 2014-2015 season.** 27th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, 2017 (Viena, Austria).
9. L. Gimferrer, JA. Rodrigo, C. Andrés, ID. Oriolo, MG. Codina, MC. Martín, M. Campins, T. Pumarola, A. Antón. **PREDOMINIO DEL VIRUS RESPIRATORIO SINCICIAL HUMANO A (VRS-A) EN UN HOSPITAL TERCIARIO EN CATALUÑA DURANTE LA TEMPORADA 2015 - 2016.** XXXIV Reunión Anual de la Sociedad Española de Epidemiología (SEE) i XI Congresso da Associação Portuguesa de Epidemiologia (APE), 2016 (Sevilla, España).

- **COMUNICACIÓN EN PÓSTER**

1. Sánchez A, Andrés C, Pumarola T, Herance R, Antón A, Baldrich E. **Synthrocyte agglutination inhibition assay.** 6thInternational Conference on Bio-Sensing Technology 2019. 16-19 June 2019, Kuala Lumpur, Malaysia.
2. Andrés C, Vila J, Piñana M, Esperalba J, Trejo-Zahínos J, Codina MG, Martín MC, Fuentes F, Rubio S, Rodrigo C, Pumarola T, Antón A. **Surveillance of EV-D68 (2014-2018) in hospitalised paediatric population: a task focused on severe cases.** XV Congreso Nacional de Virología en Barcelona.
3. Piñana M, Galano-Frutos JJ, Vila J, Nuvials FX, Andrés C, Sancho J, Valls M, Maldonado C, Gimferrer L, Esperalba J, Codina MG, Pumarola T, Antón A. **Novel duplications in human metapneumovirus G gene: Are we witnessing the evolution of an immune evasion mechanism?** XV Congreso Nacional de Virología en Barcelona.
4. C. Andrés, M. Piñana, J. Esperalba, M. Codina, M. Martín, F. Fuentes, S. Rubio, T. Pumarola, A. Antón. **Clinical evaluation of the Panther Fusion respiratory system at a tertiary university hospital in Catalonia (Spain).** 28th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases in Amsterdam.
5. C. Andrés, M. Piñana, J. Vila, J. Esperalba, M. Codina, M. Martín, F. Fuentes, S. Rubio, T. Pumarola Sole, A. Antón. **High genetic similarity between rhinoviruses and enteroviruses remains as a pitfall for molecular diagnostic tools: a three-year overview.** 28th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases in Amsterdam.
6. Piñana M, Galano-Frutos JJ, Vila J, Nuvials FX, Andrés C, Sancho J, Valls M, Maldonado C, Gimferrer L, Esperalba J, Codina MG, Pumarola T, Antón A. **Novel duplications in human metapneumovirus G gene: Are we witnessing the evolution of an immune evasion mechanism?** 28th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases in Amsterdam.
7. Vila J, Andrés C, Gimferrer L, Piñana M, Codina MG, Barnés M, Martín MC, Fuentes F, Rubio S, Rodrigo C, Pumarola T, Antón A. **Clínica i virologia de les infeccions**

- respiratòries per enterovirus a la població pediàtrica entre les temporades 2014-2017.** 12 Jornada Científica VHIR.
8. Sánchez A, Andrés C, Pumarola T, Herance R, Antón A, Baldrich E. **Synthrocyte agglutination inhibition assay.** 12 Jornada Científica VHIR.
 9. Piñana M, Andrés C, Gimferrer L, Codina MG, Martín MC, Esperalba J, Fuentes F, Rubio S, Alcubilla P, Pumarola T, Antón A. **Human metapneumovirus: Are the new duplications within the G gene responsible for doubling its prevalence?** 12 Jornada Científica VHIR.
 10. Maria Piñana; Cristina Andrés; Laura Gimferrer; Maria Gema Codina; Maria del Carmen Martín; Juliana Esperalba; Francisco Fuentes; Susana Rubio; Pilar Alcubilla; Tomàs Pumarola; Andrés Antón. **Human metapneumovirus: are the new duplications within the G gene responsible for doubling its prevalence?** XVII Jornada de Virologia, 2018 (Barcelona, España).
 11. Cristina Andrés; Paula Fernandes; Maria Piñana; Laura Gimferrer; Eulàlia Guasch; Diego Van Esso; Maria Gema Codina; Juliana Esperalba; Maria del Carmen Martín; Francisco Fuentes; Susana Rubio; Tomàs Pumarola; Andrés Antón. **Predominance of nonrecombinant and recombinant CV-A6 related to hand, foot and mouth disease and herpangina at primary care centers (Barcelona, Spain) during the 2017-2018 season.** 21st Annual Meeting of the European Society of Clinical Virology, 2018 (Atenas, Grecia).
 12. Maria Piñana; Cristina Andrés; Laura Gimferrer; Maria Gema Codina; Maria del Carmen Martín; Juliana Esperalba; Francisco Fuentes; Susana Rubio; Pilar Alcubilla; Tomàs Pumarola; Andrés Antón. **Human metapneumovirus: are the new duplication within the G gene responsible for doubling its prevalence?** 21st Annual Meeting of the European Society of Clinical Virology, 2018 (Atenas, Grecia).
 13. Laura Gimferrer; Maria Piñana; Cristina Andrés; Gemma Chavarria-Miró; Maria Gema Codina; Maria del Carmen Martín; Juliana Esperalba; Francisco Fuentes; Susana Rubio; Tomàs Pumarola; Andrés Antón. **Genetic and phylodynamic analysis of human respiratory syncytial virus A and B fusion protein.** 21st Annual Meeting of the European Society of Clinical Virology, 2018 (Atenas, Grecia).
 14. Candela Fernández-Naval; Maider Arando; Andrés Antón; Juanjo González-López; Mateu Espasa; Miguel Fernández-Huerta; Cristina Andrés; Maria Piñana; Judit Serra-Pladevall; Tomàs Pumarola; Martí Vall-Mayans; Juliana Esperalba. **High genetic macrolide resistance in different strain types of Treponema pallidum in Barcelona.** International Union against sexually transmitted infections, 2018 (Dublín, Irlanda).
 15. Blanca Borràs-Bermejo, Roger Esmel, Paula Peremiquel-Trillas, Cristina Andrés, Andrés Antón, Anna Fàbregas, José Ángel Rodrigo-Pendás, Tomàs Pumarola, Carlos Rodrigo, Magda Campins. **Prospective study of pediàtric influenza hospitalizations (2015-2017): clinical features and risk factors associated with severe outcomes.** 36th annual Meeting of the European Society for Paediatric Infectious Diseases, 2018 (Malmö, Suecia).
 16. D.L. Van Esso, A.M. Valente, J.M. Casanovas, M. Vila, M. de Quixano, C. Rodrigo, A. Antón, C. Andrés, M.C. Martin, J. Ferrer, M.A. Ferrandez, A. Bosch, T. Pumarola. **Rapid**

- influenza tests in infants and children <6 years in primary care. Impact on antibiotic treatment and use of health care services.** 36th annual Meeting of the European Society for Paediatric Infectious Diseases, 2018 (Malmö, Suecia).
17. Cristina Andrés, Jorgina Vila, Laura Gimferrer, María Piñana, María Gema Codina, Meritxell Barnés, María Del Carmen Martín, Francisco Fuentes, Susana Rubio, Carlos Rodrigo, Tomàs Pumarola, Andrés Antón. **Virologic and clinical surveillance of respiratory enteroviruses from paediatric patients attended at a tertiary hospital in Catalonia (Spain) during three consecutive seasons (2014-2017).** 36th annual Meeting of the European Society for Paediatric Infectious Diseases, 2018 (Malmö, Suecia).
 18. Laura Gimferrer, María Piñana, Cristina Andrés, Aida Vall, María Gema Codina, Francisco Fuentes, María Carmen Martín, Susana Rubio, Tomàs Pumarola, Andrés Antón. **Molecular epidemiology of human mastadenovirus detected in respiratory specimens at a tertiary care university hospital in Catalonia (Spain) during the 2013-2015 seasons.** 20th annual Meeting of the European Society for Clinical Virology, 2017 (Stresa, Italia).
 19. Cristina Andrés, Melania Osuna, Laura Gimferrer, María Piñana, Anna Isern, María Gema Codina, Francisco Fuentes, María Carmen Martín, Pilar Alcubilla, Susana Rubio, Tomàs Pumarola, Andrés Antón. **Virological surveillance of respiratory enteroviruses from attended patients at a tertiary university hospital in Catalonia (Spain) during the 2014-2017 seasons.** 20th annual Meeting of the European Society for Clinical Virology, 2017 (Stresa, Italia).
 20. María Piñana, Cristina Andrés, Laura Gimferrer, María Gema Codina, Francisco Fuentes, María Carmen Martín, Susana Rubio, Pilar Alcubilla, Anna Isern, Melania Osuna, Tomàs Pumarola, Andrés Antón. **A novel metapneumovirus carrying a 111-nucleotide duplication within the G gene detected at a tertiary university hospital in Catalonia since the 2015-2016 season.** 20th annual Meeting of the European Society for Clinical Virology, 2017 (Stresa, Italia).
 21. Cristina Andrés, Laura Gimferrer, María Piñana, Paula Peremiquel Trillas, Blanca Borrás Bermejo, María Gema Codina, José Ángel Rodrigo Pendás, Magda Campins, María Carmen Martín, Francisco Fuentes, Pilar Alcubilla, Tomàs Pumarola, Andrés Antón. **Virological surveillance of influenza viruses during the 2016-2017 season at a tertiary university hospital in Catalonia (Spain).** 20th annual Meeting of the European Society for Clinical Virology, 2017 (Stresa, Italia).
 22. Anna Isern, Cristina Andrés, Laura Gimferrer, María Piñana, Melania Osuna, María Gema Codina, María Carmen Martín, Francisco Fuentes, Tomàs Pumarola, Andrés Antón. **Genetic diversity of rhinoviruses detected at a tertiary university hospital from 2014 to 2017 in Catalonia, Spain.** Congreso Nacional de Virología, 2017 (Cádiz, España).
 23. Cristina Andrés, Laura Gimferrer, María Piñana, Paula Peremiquel Trillas, María Gema Codina, José Ángel Rodrigo Pendás, Magda Campins, María Carmen Martín, Francisco Fuentes, Pilar Alcubilla, Tomàs Pumarola, Andrés Antón. **Virological surveillance of influenza viruses during the 2012-2017 seasons at a tertiary university hospital in Catalonia (Spain).** Congreso Nacional de Virología, 2017 (Cádiz, España).

24. Laura Gimferrer, Cristina Andrés, Maria Piñana, José Angel Rodrigo, Maria Gema Codina, Paula Peremiquel-Trillas, Maria del Carmen Martín, Francisco Fuentes, Pilar Alcubilla, Jorgina Vila, Magda Campins, Carlos Rodrigo, Tomàs Pumarola, Andrés Antón. **Four years of virological surveillance of human respiratory syncytial virus at the Vall d'Hebron Hospital in Barcelona (Spain)**. XIV Congreso Nacional de Virología, 2017 (Cádiz, España).
25. Cristina Andrés, Laura Gimferrer, María Piñana, Paula Peremiquel Trillas, María Gema Codina, Magda Campins, María Carmen Martín, Francisco Fuentes, Rosario Saiz, Pilar Alcubilla, Susana Melendo, Tomàs Pumarola, Andrés Antón. **Molecular characterisation of influenza viruses during the 2012-2016 seasons at a tertiary paediatric university hospital in Catalonia (Spain)**. 35th annual meeting of the European Society for Paediatric Infectious Diseases, 2017 (Madrid, España).
26. Cristina Andrés, Laura Gimferrer, María Piñana, Paula Peremiquel Trillas, María Gema Codina, Magda Campins, María Carmen Martín, Francisco Fuentes, Rosario Saiz, Pilar Alcubilla, Benito Almirante, Susana Melendo, Tomàs Pumarola, Andrés Antón. **Molecular characterisation of influenza viruses during the 2012-2016 seasons at a tertiary university hospital in Catalonia (Spain)**. 27th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, 2017 (Viena, Austria).
27. Cristina Andrés, Laura Gimferrer, María Piñana, María Gema Codina, Francisco Fuentes, María Carmen Martín, Rosario Saiz, Pilar Alcubilla, Tomàs Pumarola, Andrés Antón. **Molecular characterisation of rhinoviruses detected at a tertiary university hospital during the 2014-2017 seasons in Catalonia (Spain)**. 27th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, 2017 (Viena, Austria).
28. María Piñana, Jorgina Vila, Laura Gimferrer, Maria Valls, Cristina Andrés, Javier Ramón, María Gema Codina, María Carmen Martín, Francisco Fuentes, Rosario Saiz, Pilar Alcubilla, Carlos Rodrigo, Tomàs Pumarola, Andrés Antón. **Genetic variability of human metapneumovirus A genotype circulating in Catalonia during the 2014-2015 and 2015-2016 seasons: a 180-nucleotide G gene duplication reported**. 19th annual Meeting of the European Society for Clinical Virology, 2016 (Lisboa, Portugal).
29. Javier Ramón, Jorgina Vila, Cristina Andrés, Cintia Castillo, Laura Gimferrer, María Piñana, María Gema Codina, María Carmen Martín, Rosario Saiz, Pilar Alcubilla, Carlos Rodrigo, Tomàs Pumarola, Andrés Antón. **Molecular epidemiology of circulating human coronaviruses in children at a tertiary hospital in Catalonia (Spain) from 2014 to 2016**. 19th annual Meeting of the European Society for Clinical Virology, 2016 (Lisboa, Portugal).
30. Laura Gimferrer, José Angel Rodrigo, Cristina Andrés, Isabel Oriolo, Maria Gema Codina, Paula Peremiquel, Maria del Carmen Martín, Francisco Fuentes, Rosario Saiz, Pilar Alcubilla, Magda Campins, Tomàs Pumarola, Andrés Antón. **Three years (2013-2016) of human respiratory syncytial virus surveillance at a tertiary hospital in Catalonia, Spain**. 19th annual Meeting of the European Society for Clinical Virology, 2016 (Lisboa, Portugal).
31. Cristina Andrés, Laura Gimferrer, Maria Gema Codina, Magda Campins, Benito Almirante, Susana Melendo, Juliana Esperalba, Francisco Fuentes, Maria del Carmen

- Martín, Tomàs Pumarola, Andrés Antón. **Full genome sequence analysis of influenza H1N1pdm09 and H3N2 viruses related to severe respiratory illness at a tertiary university hospital from 2012 to 2015 in Catalonia, Spain.** 26th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, 2016 (Ámsterdam, Holanda).
32. Laura Gimferrer, Cristina Andrés, Maria Gema Codina, Juliana Esperalba, Maria del Carmen Martín, Francisco Fuentes, Tomàs Pumarola, Andrés Antón. **Clinical evaluation of Seegene Allplex respiratory panel 1 kit for the detection of seasonal Influenza and human respiratory syncytial viruses.** 26th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, 2016 (Ámsterdam, Holanda).
33. Cristina Godoy, Cristina Andrés, Laura Gimferrer, Maria del Carmen Martín, Francisco Fuentes, Andrés Antón. **Molecular epidemiology and molecular characterisation of human parainfluenza virus type 3 at a tertiary university hospital in Catalonia, Spain.** 18th annual Meeting of the European Society for Clinical Virology, 2015 (Edimburgo, Escocia).
34. Cristina Andrés, Laura Gimferrer, Maria del Carmen Martín, Francisco Fuentes, Andrés Antón. **Molecular characterization of influenza viruses from hospitalized patients during the 2014-2015 season at a tertiary university hospital in Catalonia (Spain).** 18th annual Meeting of the European Society for Clinical Virology, 2015 (Edimburgo, Escocia).