

UNIVERSIDAD DE GRANADA
Departamento de Microbiología
HOSPITAL UNIVERSITARIO VIRGEN DE LAS NIEVES
Servicio de Microbiología



TESIS DOCTORAL

**ESTUDIO CLÍNICO-EPIDEMIOLOGICO DE
ENTEROVIRUS NO POLIO Y OPTIMIZACIÓN DEL
CULTIVO CELULAR**

Gabriel Reina González

2007

El **Dr. José María Navarro Marí**, Jefe de Sección del Servicio de Microbiología del Hospital Universitario Virgen de las Nieves de Granada y la **Dra. María Jiménez Valera**, Profesora titular del Departamento de Microbiología de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Granada,

Certifican:

Que la Tesis Doctoral que presenta el Licenciado **Gabriel Reina González** “ESTUDIO CLÍNICO-EPIDEMIOLOGICO DE ENTEROVIRUS NO POLIO Y OPTIMIZACIÓN DEL CULTIVO CELULAR” ha sido realizada bajo nuestra dirección, habiendo sido revisada y estando conformes con su presentación para obtener el grado de Doctor, siempre que así lo considere el tribunal que designe la Universidad de Granada.

Granada, enero de 2007

Fdo: María Jiménez Valera

Fdo: José María Navarro Marí

AGRADECIMIENTOS

Al llegar al final de este camino, uno hace balance y se da cuenta de las muchas y buenas personas con las que se ha cruzado durante el mismo y que han permitido llevar a buen puerto este barco. Por ello quiero expresar mi agradecimiento a las siguientes personas.

En primer lugar quiero agradecer a José María Navarro todas las enseñanzas, apoyo y orientación que me ha brindado durante estos cuatro años de trabajo, siendo como es, un virólogo reconocido y una persona estupenda.

También quiero dar las gracias a María Jiménez Valera, codirectora de esta tesis, por la ayuda y consejos aportados en la realización de este trabajo.

A Manuel de la Rosa por dirigir nuestro centro de trabajo de la manera más eficiente y sabiendo sacar lo mejor de nosotros mismos.

Igualmente quiero agradecer a Mercedes Pérez su implicación en este trabajo, dirigiéndome en mis primeros pasos dentro del mundo de la biología molecular.

A todo el equipo del Laboratorio de Enterovirus de Majadahonda, particularmente a Gloria Trallero y Ana Avellón, por acogerme en su centro de la mejor manera posible, colaborar *a posteriori* en la secuenciación de nuestros amplicones y suministrarnos algunos serotipos de enterovirus para nuestro estudio. Además, quiero agradecer a Carmen Pérez del Hospital Dr. Negrín de Las Palmas de Gran Canaria y a Gustavo Cilla del Hospital de Donosti de San Sebastián, la colaboración en este trabajo mediante la aportación de varios serotipos para los ensayos en cultivo celular.

Quiero tener un recuerdo también para todo el personal del Laboratorio Servicio de Microbiología del Hospital Virgen de las Nieves por todo el saber científico-cultural que necesitaba este malagueño adoptado en estas

tierras. A todo el personal técnico, desde mis inicios con Victoria y Charo, pasando por la mejor bizcochera de todo el Camino de Ronda, hasta aquellas que me acogieron en mi última época entre virus. En este sentido quiero expresar mi infinito agradecimiento a Paqui, M^aÁngeles y M^aJosé que me prestaron generosamente parte de su tiempo y diariamente fueron víctimas de un ladrón compulsivo de cronómetros. Igualmente a todo el personal facultativo del laboratorio, especialmente a Chelo Miranda, por tutelarnos y prepararnos magníficamente en el conocimiento práctico y profundo de la Bacteriología, con la seriedad y la educación como señas. Y por supuesto, quiero tener un recuerdo hacia todos mis compañeros residentes, Conchi, Ruth, M^aFe, Enrique, Carmen, Irene, Silviña, Miguel, Pablo, Trini y el gran JDT, que me brindaron su amistad y su paciencia cuando de darle la vuelta al calendario de guardias se trataba. Finalmente deseo expresar también mi agradecimiento al resto del personal que ha pasado por este laboratorio a lo largo de los años, que de forma anónima me han permitido disponer de una importante colección de enterovirus con los que poder trabajar intensamente para elaborar esta tesis doctoral.

Igualmente, quisiera agradecer a la Fundación para la Investigación Biosanitaria de Andalucía Oriental (FIBAO) la colaboración prestada en la edición de este trabajo.

El manejo de los datos estadísticos ha sido otro elemento importante en la preparación de este trabajo y, por ello, quiero agradecer la ayuda que en este sentido me han prestado Ricardo Ocaña de la Escuela Andaluza de Salud Pública, Javi Rodríguez, nuestro microbiólogo epidemiólogo, y un magnífico oncólogo y estadístico, Quique.

También quiero expresar mi agradecimiento a las personas que en mi época universitaria en Pamplona, me metieron el gusanillo de la Microbiología. Por un lado a Carlos Gamazo que me ayudó a iniciarme en este mundo, además de facilitar mi experiencia Erasmus. Y por otro lado a Pepe Leiva, grandísimo profesor y persona, que me animó a entregarme al mundo clínico de la Microbiología. Asimismo deseo agradecer a Miguel Rojas la ayuda

prestada, ya que guió mis estudios para la preparación del examen FIR de la mejor manera posible.

A todos mis amigos de Málaga, Pamplona y Granada que tanto se han interesado por el estado de este trabajo y con los que tantas cosas he podido compartir desde hace muchos años.

Y acabando con estos agradecimientos, quiero tener un recuerdo especial con mi hermana, la enfermera de la familia, y con mi madre, que me ha dado todo lo que tengo a base de muchos sacrificios y roles desempeñados en la vida. Gracias a las dos por quererme tanto y muchas veces soportarme con paciencia.

Finalmente a Silvia, por el continuo apoyo, generosidad y cariño que de ella recibo cada día desde que hace diez años empezara la mejor época de mi vida. Su alegría y su constancia han permitido también que hoy esté aquí terminando este trabajo. Además su condición de microbióloga ha hecho de ella una eficiente colaboradora directa mediante la lectura y comentario de lo que viene a continuación. Asimismo la finalización de la redacción de esta tesis coincidió con uno de los momentos más importantes de mi vida ocurrido el día 2 de octubre del 2006 sobre las 18:30h. Aunque él todavía es consciente de pocas cosas, la presencia de Pablo a nuestro lado ha supuesto la mayor de las alegrías para sus padres y no es posible expresar con palabras lo que uno siente cada día cuando se dibuja una gran sonrisa en su pequeño rostro.

*Hay que tener el valor de caminar en la dirección
en que nadie ha caminado hasta ahora*

Juan Pablo II

A la memoria de mi padre
Para mi madre, mi hermana, Silvia y Pablo

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN	1
I.1. FAMILIA <i>PICORNAVIRIDAE</i>	3
I.1.1. Antecedentes históricos.....	4
I.1.2. Taxonomía	4
I.1.2. Estructura vírica	5
I.1.4. Ciclo replicativo	5
I.2. ENTEROVIRUS	7
I.2.1. Antecedentes históricos.....	7
I.2.2. Propiedades físicas.....	8
I.2.3. Estructura viral	8
I.2.4. Clasificación	10
I.2.4.1. Clasificación taxonómica tradicional por subgrupos.....	10
I.2.4.1. Clasificación actual de los enterovirus	11
I.2.5. Patogénesis e Inmunidad	12
I.2.5.1. Patogénesis.....	12
I.2.5.2. Respuesta inmune	13
I.2.5.3. Inmunopatología.....	14
I.2.5.4. Virulencia y tropismo celular.....	15
I.2.5.5. Persistencia	15
I.3. MANIFESTACIONES CLÍNICAS.....	16
I.3.1. ENFERMEDAD NEUROLÓGICA	16
I.3.1.1. Parálisis flácida aguda.....	16
I.3.1.2. Meningitis aséptica aguda	17
I.3.1.3. Encefalitis	18
I.3.2. ENFERMEDADES NO NEUROLÓGICAS.....	19
I.3.2.1. Exantemas	19
I.3.2.1. Infecciones respiratorias agudas.....	20
I.3.2.3. Miopericarditis	21
I.3.2.4. Enfermedad muscular	21
I.3.2.5. Conjuntivitis aguda hemorrágica	22
I.3.2.6. Enfermedad neonatal	23
I.3.2.7. Gastroenteritis y otras enfermedades de dudosa etiología enteroviral ...	24
I.3.3. INFECCIÓN PERSISTENTE	24
I.3.3.1. Miocardiopatía dilatada crónica.....	24
I.3.3.2. Diabetes mellitus tipo I o insulina dependiente (DMID).....	25
I.3.3.3. Meningoencefalitis crónica en inmunodeprimidos.....	25

I.3.3.4. Enfermedades musculares crónicas: poliomiocitis, dermatomiocitis.....	26
I.4. DIAGNÓSTICO	26
I.4.1. RECOGIDA, TRANSPORTE Y ALMACENAMIENTO DE LAS MUESTRAS .	27
I.4.2. DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO	27
I.4.2.1. Aislamiento en cultivo celular	27
I.4.2.2. Diagnóstico molecular	29
I.4.2.3. Diagnóstico serológico	31
I.4.2.4. Caracterización del enterovirus	32
I.4.2.4.i. Técnica tradicional (neutralización)	33
I.4.2.4.ii. Inmunofluorescencia.....	34
I.4.2.4.iii. RT-PCR y Secuenciación	34
I.5. EPIDEMIOLOGÍA.....	35
I.5.1. DATOS DEMOGRÁFICOS	35
I.5.2. TRANSMISIÓN	38
I.5.3. PREVALENCIA E INCIDENCIA.....	40
I.5.3. EPIDEMIOLOGÍA MOLECULAR	41
I.6. TRATAMIENTO Y PROFILAXIS	43
I.6.1. TRATAMIENTO	43
I.6.2. PREVENCIÓN	43
I.6.2.1. Vacunas anti-polio.....	44
I.7 ANTECEDENTES DEL TEMA EN ESPAÑA.....	45
II. OBJETIVOS.....	47
III. MATERIAL Y MÉTODOS	51
III.1. ESTUDIO CLÍNICO-EPIDEMIOLOGÍCO	53
III.1.1. PACIENTES Y MUESTRAS	53
III.1.2. MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO	54
III.1.2.1. Aislamiento en cultivo celular	54
III.1.2.2. Identificación del enterovirus	55
III.1.2.2.1. Inmunofluorescencia indirecta para identificación de enterovirus a partir de líneas celulares infectadas.....	55
III.1.2.2.2. Pruebas Físico-químicas.....	57
III.1.2.2.2.i. Inhibición de virus ADN con 5-bromo-2-desoxiuridina	57
III.1.2.2.2.ii. Tratamiento con cloroformo	58
III.1.2.2.2.iii. Crecimiento en pH ácido	59
III.1.2.2.3. Diagnóstico molecular	60

III.1.2.2.3.i. Extracción de ácidos nucleicos.....	60
III.1.2.2.3.ii. Retrotranscripción.....	62
III.1.2.2.3.iii. RT-PCR en tiempo real.....	62
III.1.2.2.3.iv. RT-nested PCR 5'NTR.....	64
III.1.3. MÉTODOS DE SEROTIPIFICACIÓN.....	66
III.1.3.1. Inmunofluorescencia indirecta.....	66
III.1.3.2. RT-PCR gen codificante de VP1.....	67
III.1.3.3. Neutralización.....	70
III.1.3.3.1. Neutralización en tubo con antisueros individualizados.....	70
III.1.3.3.2. Neutralización en placa usando pools de antisueros.....	71
III.2. OPTIMIZACIÓN DEL CULTIVO CELULAR.....	73
III.2.1. Serotipos estudiados.....	73
III.2.2. Líneas celulares empleadas.....	73
III.2.3. Estudio comparativo mediante cultivo tradicional.....	76
III.2.4. Estudio comparativo mediante cultivo en <i>shell vial</i>	77
III.2.5. Semicuantificación por PCR en tiempo real.....	79
III.3. ANÁLISIS DE SECUENCIAS DE LOS PRODUCTOS AMPLIFICADOS..	82
III.4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS DATOS.....	83
III.5. ANEXO.....	84
III.5.1. Cálculo de la Dosis Infecciosa 50% de un virus en Cultivo Celular (TCID ₅₀). Métodos de Reed-Muench y Kärber.....	84
III.5.2. Programas informáticos utilizados.....	86
IV. RESULTADOS.....	87
IV.1. ESTUDIO CLÍNICO-EPIDEMIOLÓGICO.....	89
IV.1.1.DATOS GENERALES DE LAS INFECCIONES POR ENTEROVIRUS DIAGNOSTICADAS.....	89
IV.1.1.1. Aislamientos totales durante el período 1985-2006.....	89
IV.1.1.2. Procedencia de los pacientes.....	90
IV.1.1.3. Distribución por edad y sexo de los pacientes.....	90
IV.1.1.4. Situación clínica asociada a los enterovirus aislados.....	92
IV.1.1.5. Aislamientos de enterovirus por mes.....	93
IV.1.2. EPIDEMIOLOGÍA DE SEROTIPOS AISLADOS (1985-2006).....	94
IV.1.2.1. Distribución temporal y geográfica de los serotipos aislados.....	94
IV.1.2.2. Distribución mensual de los grupos de enterovirus.....	100
IV.1.2.3. Relación de los serotipos aislados con los síndromes clínicos.....	101

IV.2. OPTIMIZACIÓN DEL CULTIVO CELULAR	103
IV.2.1. Comparación de líneas celulares valorando la producción de efecto citopático en cultivo tradicional	103
IV.2.1.1. Evaluación de IFI y RT-PCR para la detección del crecimiento en cultivo celular.....	103
IV.2.1.2. Sensibilidad analítica de cada línea celular valorando el ECP	104
IV.2.1.3. Espectro de crecimiento en cada línea celular valorando el ECP	107
IV.2.2. Comparación de líneas celulares mediante inmunofluorescencia indirecta valorando el número de focos fluorescentes en <i>shell vial</i>	108
IV.2.2.1. Sensibilidad analítica de cada línea celular según IFI	108
IV.2.2.2. Espectro de crecimiento en cada línea celular utilizando IFI.....	112
IV.2.3. Comparación de líneas celulares valorando la detección mediante RT-PCR en tiempo real del sobrenadante del <i>shell vial</i>	113
IV.2.3.1. Sensibilidad de cada línea celular utilizando RT-PCR en tiempo real	113
IV.2.3.2. Espectro de crecimiento en cada línea celular utilizando RT-PCR en tiempo real.....	118
IV.2.4. Detección mediante RT-PCR frente a detección mediante IFI en <i>shell vial</i>	120
V. DISCUSIÓN	121
V.1. ESTUDIO CLÍNICO-EPIDEMIOLÓGICO	123
V.2. OPTIMIZACIÓN DEL CULTIVO CELULAR	135
VI. CONCLUSIONES	141
VII. BIBLIOGRAFÍA	147
ANEXO	161

ABREVIATURAS UTILIZADAS:

ADN: ácido desoxirribonucleico

ADNc: ADN complementario

ANF: aspirado nasofaríngeo

ARN: ácido ribonucleico

BDU: 5-bromo-2-desoxiuridina

CVA24v: coxsackievirus A24 variante

CVA: coxsackievirus A

CVB: coxsackievirus B

DMID: diabetes mellitus insulino-dependiente

dNTP: desoxinucleótido trifosfato

E: echovirus

ECP: efecto citopático

EFA: exudado faringo amigdalario

EV: enterovirus

EVNP: enterovirus no polio

MPB: enfermedad mano-pie-boca (*hand-foot-mouth disease*)

IFI: inmunofluorescencia indirecta

IRES: sitio interno de entrada al ribosoma

LCR: Líquido Cefalorraquídeo

MEM: Medio Mínimo Esencial (*Minimal Esencial Medium*)

Min: minuto

NT: enterovirus no tipable

Pb: pares de bases

PBS: tampón fosfato salino

PCR: reacción en cadena de la polimerasa (*Polymerase Chain Reaction*)

PFA: parálisis flácida aguda

PV: poliovirus

RD: rhabdomiosarcoma

RT-PCR: retrotranscripción + PCR

seg: segundo

SFB: suero fetal bovino

SV: *shell vial*

TBE: Tris-bórico-EDTA

TC: cultivo tradicional

TCID₅₀: Dosis infectiva 50% de un virus en cultivo celular (*Tissue Culture Infective Dose*)

UN: unidad neutralizante

VHS: Virus Herpes Simplex

VP1: proteína o región codificante para la proteína VP1 de la cápsida

5'NTR: región 5' no traducida o no codificante

Códigos de nucleótidos:

A: Adenina

C: Citosina

G: Guanina

T: Timina

I: Inosina

R: A, G

Y: C, T

K: G, T

M: A, C

S: C, G

W: A, T

I. INTRODUCCIÓN

Los enterovirus se encuentran entre los patógenos humanos más comunes. El arte egipcio ya nos muestra imágenes de la capacidad parálitica de los poliovirus en el siglo 14 a.C. La mayoría de los virus pertenecientes a este grupo fueron descubiertos entre 1948 y 1963, tras la investigación de distintos casos de poliomielitis parálitica y otras alteraciones del sistema nervioso central (Romero y Rotbart, 2003).

El grupo de enfermedades más importantes causadas por este grupo han sido aquellas provocadas por los poliovirus, cuya erradicación parece cada vez más cercana (Arita *et al.*, 2006; Trallero *et al.*, 2006). Por ello, el control de las enfermedades por enterovirus no polio (EVNP), muy prevalentes en nuestro medio (30-50 millones de infecciones cada año en EEUU y más de 1 billón en todo el mundo), centran la atención de la comunidad científica en este campo (Oberste *et al.*, 2000).

La mayoría de los cuadros producidos por EVNP son asintomáticos y autolimitados, sin embargo, se da también un número importante de infecciones sintomáticas que provocan anualmente importantes pérdidas económicas en cuanto a cuidados de salud y absentismo laboral y escolar se refiere. Además esas afecciones suelen propiciar la instauración de terapias antiinfecciosas inadecuadas, dirigidas a tratar infecciones de tipo bacteriano o herpético.

El período en que mayoritariamente se producen dichas infecciones abarca, en climas templados como el nuestro, las estaciones más calurosas (verano y otoño), siendo el grupo de niños pequeños el más frecuentemente afectado (Romero y Rotbart, 2003).

I.1. FAMILIA PICORNAVIRIDAE

Está compuesta esta familia por pequeños ("pico") virus ("viridae") con ARN ("rna"), englobando diversos géneros en función de la secuencia que codifica la proteína estructural VP1 de estos virus. Los géneros principales que la componen son seis, incluyendo algunos que afectan a animales (*Cardiovirus* y *Aphthovirus*) y humanos (*Enterovirus*, *Hepatovirus*, *Parechovirus* y *Rhinovirus*) (Pallansch y Roos, 2001; Romero y Rotbart, 2003).

Enterovirus, hepatovirus y rinovirus son los grupos más importantes en cuanto a patogenia humana, siendo éstos causa frecuente de enfermedades como la meningitis aséptica, hepatitis A o catarro común, respectivamente. Además dentro del grupo de enterovirus se encuentran los poliovirus, importante grupo, que durante siglos ha provocado la clásica parálisis flácida en el hombre.

I.1.1. ANTECEDENTES HISTÓRICOS

Esta familia engloba numerosos patógenos animales y humanos, como ya se ha indicado. Muchos de sus géneros han jugado un papel importante dentro de la virología moderna, concretamente los poliovirus han contribuido a iniciar el estudio de los cultivos celulares, desarrollar los análisis de infectividad, valorar la efectividad vacunal y constituyeron las primeras imágenes tridimensionales obtenidas en 1985 por cristalografía de rayos X (poliovirus 1 y rinovirus 14). En cuanto a la virología molecular, poliovirus fue el primer virus animal completamente secuenciado y clonado (Pallansch y Roos, 2001).

I.1.2. TAXONOMÍA

Se compone este grupo de virus de 6 géneros: *Aphthovirus* (virus de la fiebre aftosa o enfermedad pie-boca, que afecta a animales con pezuña), *Cardiovirus* (virus de la encefalomiocarditis y encefalomiелitis, que afectan a ratones principalmente), *Enterovirus* (con más de 100 serotipos que afectan a animales y hombre), *Hepatovirus* (virus de la hepatitis A, antiguo miembro del género *Enterovirus*, concretamente constituía el serotipo 72), *Rhinovirus* (103 serotipos productores del resfriado común) y *Parechovirus* (Racaniello, 2001).

El género de más reciente introducción es *Parechovirus*, que está constituido por 4 serotipos. Parechovirus 1 y 2, antiguamente echovirus 22 y 23 respectivamente, fueron recatalogados en este género tras observar las secuencias que presentaban (no amplificables mediante distintas PCR genéricas para enterovirus), aunque sus características clínicas (respiratorias y gastrointestinales, principalmente) y de crecimiento en cultivo celular son análogas a las de enterovirus. Recientemente se ha postulado la inclusión de nuevos serotipos en este género (parechovirus 3 y 4) tras su descripción en Japón, Canadá y Holanda, como causantes de síndromes febriles, parálisis transitoria o sepsis en niños menores de 3 años (Ito *et al.*, 2004; Boivin *et al.*, 2005; Benschop *et al.*, 2006a; Benschop *et al.*, 2006b).

I.1.3. ESTRUCTURA VÍRICA

Son virus desnudos de pequeño tamaño (20-30 nm), cuyo genoma está compuesto por ARN monocatenario de polaridad positiva, es decir, que puede actuar directamente como ARN mensajero en la célula que infecta. Ese ARN viral puede tener entre 7209 y 8450 nucleótidos y codifica 11 ó 12 proteínas según el género (cinco de ellas estructurales).

La cápsida viral (figura I.1) es de simetría icosaédrica, constituida por 60 subunidades o protómeros, cada uno de los cuales está compuesto por 4 proteínas (VP1, VP2, VP3 y VP4), excepto los parechovirus que poseen 3 proteínas en cada subunidad (Racaniello, 2001).

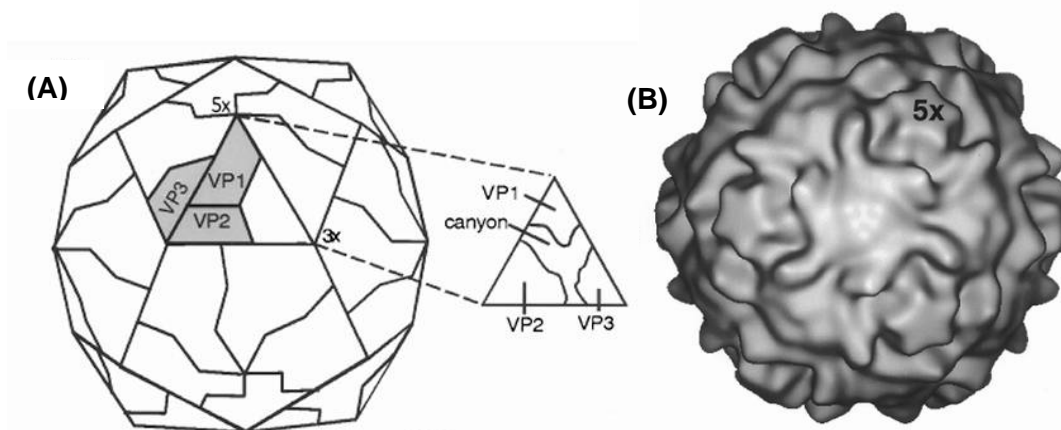


Figura I.1. (A) Esquema de la cápsida de picornavirus, mostrando la disposición externa de VP1, VP2 y VP3 en el protómero. VP4 quedaría en el interior de la cápsida (B) Modelo tridimensional de poliovirus tipo 1, Mahoney (Racaniello, 2001)

I.1.4. CICLO REPLICATIVO

La replicación de los picornavirus tiene lugar en su totalidad en el citoplasma de la célula. Los pasos que se dan para la producción de nuevos virus se detallan a continuación.

a. Unión al receptor celular

El plegamiento externo de las proteínas que conforman la cápsida, da lugar a las estructuras capaces de interactuar con los receptores de las células humanas. Los receptores para estos virus se suelen situar en la superficie de la célula, siendo el de los rinovirus primordialmente la proteína ICAM-1 (molécula de adhesión intercelular-1) y los de los enterovirus y parechovirus, los que se detallan en la tabla I.1. Además, en algunos casos es necesaria la actuación de un correceptor para la adecuada fijación del virus.

Tabla I.1. Receptores y correceptores celulares de Enterovirus y Parechovirus (Racaniello, 2001)

	Receptor	Tipo de receptor	Correceptor
Poliovirus 1-3	PVR (CD155)	Superfamilia Ig	-
Coxsackievirus A13, A18, A21	ICAM-1	Superfamilia Ig	-
Coxsackievirus A21	DAF (CD55)	Cascada del complemento	ICAM-1
Coxsackievirus A9	$\alpha_v\beta_3$	Integrina	-
Coxsackievirus B1-B6	CAR	Superfamilia Ig	-
Coxsackievirus B1, B3, B5	DAF (CD55)	Cascada del complemento	$\alpha_v\beta_6$ -integrina
Echovirus 1	$\alpha_2\beta_1$ -integrina	Integrina	β_2 -microglobulina
Echovirus 3, 6, 7, 11-13, 20, 21, 24, 29, 33	DAF (CD55)	Cascada del complemento	β_2 -microglobulina
Enterovirus 70	DAF (CD55)	Cascada del complemento	-
Parechovirus 1	$\alpha_v\beta_1, \alpha_v\beta_3$	Integrina	-

PVR: receptor de poliovirus; ICAM-1: molécula de adhesión intercelular-1; DAF: Factor de aceleración de la degeneración

b. Decapsidación y entrada del genoma viral en la célula

Tras la unión con el receptor correspondiente, se producen una serie de cambios conformacionales en la cápsida (pérdida de la subunidad VP4 y exposición al exterior de la fracción hidrofóbica de VP1) que van a permitir la formación de un poro en la membrana celular, a través del cual se producirá la entrada del ARN viral en el citoplasma de la célula. Sin embargo, algunos picornavirus (rhinovirus o aphthovirus) parecen entrar en la célula mediante endocitosis (Racaniello, 2001).

c. Traducción del ARN viral y procesamiento de la poliproteína precursora.

El ARN se dirige a los ribosomas, para ser traducido directamente y dar lugar a una poliproteína. La región 5' no codificante es esencial en el control de la traducción ya que contiene el **sitio interno de entrada al ribosoma (IRES)**, región muy conservada que permite el inicio de la traducción viral y la inhibición de la traducción de proteínas normales de la célula. Existen dos tipos de IRES, tipo I (enterovirus y rhinovirus) y tipo II (cardiovirus y aphthovirus).

Durante el proceso de traducción se generan proteasas que se escinden a sí mismas de la poliproteína (L, 2A y 3C), y posteriormente, por la acción de éstas, generarán el resto de proteínas virales. La proteína 3C lleva a cabo la separación de los fragmentos 2C y 3A en todos los picornavirus, mientras que la proteasa 2A sólo actúa en enterovirus, rhinovirus, cardiovirus y aphthovirus. Por

otro lado la proteasa L es exclusiva de los picornavirus animales (Racaniello, 2001).

d. Replicación del genoma

El procesamiento de la poliproteína da lugar a los componentes del complejo de replicación del ARN: (i) ARN polimerasa viral ARN-dependiente (3D) que da lugar a un ARN intermedio de polaridad negativa, para luego a partir de él producir el ARN final de polaridad positiva; (ii) Proteínas accesorias 2A, 2B, 2C y 3AB, que contribuyen a la formación de vesículas membranosas en el citoplasma de la célula, lugar donde tiene lugar el proceso de replicación (Racaniello, 2001).

e. Encapsidación

Una vez las proteasas generan las proteínas estructurales VP1, VP3 y VP0, éstas se unen para formar protómeros 5S, posteriormente cinco de ellos formarán pentámeros 14S y 20 pentámeros se unirán para dar lugar al provirión 150S junto al genoma viral. El virión 160S final se forma cuando la VP0 de los protómeros se escinde en VP2 y VP4 (excepto en parechovirus) (Racaniello, 2001).

f. Liberación de viriones maduros (ciclo lítico)

Los viriones maduros salen al exterior mediante destrucción de la célula huésped (ciclo lítico). Esto da lugar al efecto citopático en cultivo, excepto el virus de la hepatitis A que sale sin romper la célula. (Beltrán *et al.*, 1999; Racaniello, 2001).

I.2. ENTEROVIRUS

I.2.1. Antecedentes históricos

Las primeras descripciones clínicas de infección por enterovirus datan de principios del siglo XIX, cuando se comentan una serie de casos de fiebre y parálisis. Las contribuciones de von Heine y Medin, hicieron que a finales de ese siglo se hablara de la polio como *enfermedad de Heine-Medin* (Pallansch y Roos, 2001).

A partir de 1900 diversos estudios ayudan a comprender la transmisibilidad e importancia del tracto gastrointestinal en el ciclo del virus, las características del cultivo celular o la existencia de 3 serotipos de polio. En la década de los 50, se logra desarrollar la primera vacuna, inactivada con formalina, frente al virus de la polio (Salk), haciendo por ello de Jonas Salk una persona más conocida en EEUU que el propio presidente del país (Pallansch y Roos, 2001).

Posteriormente, en 1962, se obtiene la licencia para la utilización de la vacuna atenuada de Sabin.

En 1948 se aísla por primera vez un virus en las heces de un niño con poliomiélitis en la ciudad estadounidense de Coxsackie que, al contrario que los poliovirus, era capaz de infectar e inducir parálisis en ratón lactante. Ese microorganismo fue catalogado como coxsackievirus A. Al año siguiente, se aisló otro tipo de virus coxsackie (grupo B) al investigar la etiología de una serie de casos de meningitis aséptica (Beltrán *et al.*, 1999; Pallansch y Roos, 2001).

Posteriormente, en 1951 se descubrió el primer virus ECHO (*enteric cytopathogenic human orphan*) en las heces de individuos asintomáticos, sin ser relacionado con ninguna enfermedad (Modlin, 2005a).

I.2.2. PROPIEDADES FÍSICAS

A diferencia de los rinovirus, los enterovirus son resistentes a la acción del pH ácido y menos termorresistentes (son inactivados a partir de 56°C). Además resisten la acción de muchos desinfectantes de uso común (etanol 70%, isopropanol, sales de amonio cuaternario), disolventes orgánicos (cloroformo, éter) o detergentes (desoxicolato).

Su inactivación, sin embargo, se puede conseguir mediante tratamiento con formaldehído, hipoclorito sódico, ácidos fuertes, rayos ultravioletas o pasteurización. Son inactivados rápidamente por el cloro libre, sin embargo, la presencia de materia orgánica o la disposición del virus en agregados puede protegerlos de la inactivación (Pallansch y Roos, 2001).

El $MgCl_2$, reduce la termolabilidad de los enterovirus en un amplio rango de temperaturas. Esta característica encuentra su utilidad para mantener la potencia de la vacuna oral de la poliomiélitis, compuesta por el virus vivo atenuado, cuando la refrigeración no es posible, como puede suceder en países subdesarrollados (Modlin, 2005a).

I.2.3. ESTRUCTURA VIRAL

Como el resto de picornavirus, estos pequeños agentes carecen de envoltura, poseen una cápsida compuesta por 60 subunidades proteicas y un genoma viral tipo ARN de polaridad positiva.

Genoma viral

La longitud del material nucleico abarca unos 7400 nucleótidos que podemos dividir en tres regiones (5'-NTR, ORF y 3'-NTR), como aparece representado en la figura I.2.

La primera y la tercera parte son regiones no codificantes o no traducidas, situadas en los extremos 5' y 3', estando compuestas por unos 740 y 70-100 nucleótidos, respectivamente. Ambas parecen estar implicadas en la replicación viral y, en concreto, la región 5'-NTR parece jugar además un papel fundamental en la virulencia, tipo de huésped y tipo celular que infecta. Además en esta región se sitúa la IRES tipo I o zona reconocida por el ribosoma para iniciar la traducción.

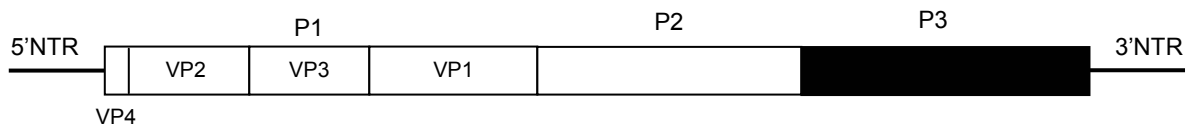


Figura I.2. Organización del genoma de enterovirus (Romero y Rotbart, 2003)

La secuencia de bases situada aproximadamente entre las posiciones 740 y 7370 contiene el marco de lectura abierta (ORF) que se puede subdividir en 3 zonas (P1, P2 y P3). P1 codifica las 4 proteínas estructurales de la cápsida, que se organizan en la secuencia de la siguiente manera: VP4 (región 1A), VP2 (1B), VP3 (1C) y VP1 (1D).

Las regiones P2 y P3 dan lugar a las siete proteínas no estructurales del virus (2A, 2B, 2C, 3A, 3B, 3C y 3D). Todas estas proteínas son escindidas por las proteasas 2A y 3C a partir de la poliproteína que se genera cuando esta región ORF es traducida en su totalidad (Romero y Rotbart, 2003).

Cápsida viral

Forma la superficie externa del virus, por lo que va a interactuar con los receptores y anticuerpos neutralizantes. Las proteínas VP1, VP2 y VP3 conforman la zona externa, mientras que VP4 aparece en el interior de cada protómero, junto al extremo N-terminal de las tres proteínas externas, conformando un entramado muy estable.

Su configuración espacial da lugar a vértices elevados donde se encuentran las zonas de neutralización por anticuerpos (curvaturas BC en VP1 y VP3, así como curvatura EF en VP2). Y aparecen también depresiones o "cañones" en estas subunidades, donde se encuentran los puntos de interacción con los receptores celulares. Bajo el cañón se encuentra un hueco hidrofóbico ocupado por

diferentes compuestos lipídicos en los distintos enterovirus (esfingosina, ácidos grasos), importante para permitir la correcta unión al receptor o los cambios conformacionales de la cápsida que se generan tras ello (Racaniello, 2001).

I.2.4. CLASIFICACIÓN

La estructura antigénica determinada por la cápsida viral da lugar a los distintos serotipos de enterovirus, en concreto, en base a la variabilidad de la proteína VP1. Clásicamente se describían 72 serotipos, que fueron reducidos a 64, al reconocer la existencia de serotipos redundantes (Ej. echovirus 1 igual que echovirus 8) y la reclasificación de algunos como miembros de otros géneros (echovirus 22 y 23, parechovirus 1 y 2, respectivamente) (Modlin, 2005a). Estos serotipos recatalogados se muestran de forma detallada en la tabla I.2.

Posteriormente se han descrito nuevos miembros del género enterovirus, por lo que actualmente encontramos 73 serotipos que afectan al hombre, aunque continuamente se están describiendo nuevos posibles integrantes a partir de cepas de enterovirus aisladas, diferentes a todos los serotipos conocidos (Romero y Rotbart, 2003).

Cada serotipo se correlaciona con una respuesta inmunológica concreta, protección frente a la enfermedad, unión a un receptor específico y, en menor medida, un espectro de enfermedades. Existen prototipos de cada serotipo de enterovirus, a partir de los cuales se han producido antisueros específicos, que son mantenidos en el *American Type Culture Collection* (ATCC), Rockville, Maryland (EEUU) y en los laboratorios de referencia designados por la OMS.

I.2.4.1. Clasificación taxonómica tradicional por subgrupos

Esta clasificación se realizaba en función de la capacidad de replicación del serotipo en líneas celulares y las manifestaciones patogénicas en modelos animales. Así, distinguimos varios grupos dentro de los enterovirus (Pallansch y Roos, 2001):

- **Poliovirus**, capaces de crecer en células de origen humano y simio, siendo el único patógeno en monos.
- **Coxsackie tipo A**, que no crecen en las líneas celulares habituales, aunque sí se replican en ratón lactante, provocando una parálisis flácida. No provocan enfermedad en los monos.

- **Coxsackie tipo B**, capaces de crecer en cultivo celular y en ratón lactante, dando lugar a una miositis más focal, con parálisis espástica. Tampoco producen enfermedad en los monos.
- **Virus ECHO**, con crecimiento favorable en células de simios y variable en células humanas. No es patógeno de monos, ni ratones.

Los serotipos emergentes presentan características intermedias entre estos grupos, por lo que se les ha decidido denominar "enterovirus", seguido de un número de orden (de descubrimiento). De esta manera, están descritos los enterovirus 68, 69, 70, 71, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 89, 90 y 91 (Oberste *et al.*, 2001; Norder *et al.*, 2003; Oberste *et al.*, 2004; Oberste *et al.*, 2005).

En la tabla I.2 aparecen reseñadas las características que diferencian los integrantes de los distintos grupos.

Tabla I.2. Clasificación tradicional y espectro de huéspedes de los enterovirus

Serotipos	Espectro de huéspedes			
	Primates	Ratones lactantes	Cultivos celulares	
Poliovirus	1-3	++	0	++
Coxsackievirus A	1-24	0	+++	±
Coxsackievirus B	1-6	0	+++	++
Echovirus	1-34	0	0	++
Enterovirus	68-71	Variable	Variable	+

Las cruces indican la capacidad de crecimiento. Serotipos recatalogados (denominación actual): coxsackievirus A23 (echovirus 9), echovirus 8 (echovirus 1), echovirus 10 (reovirus 1), echovirus 22 y 23 (parechovirus 1 y 2), echovirus 28 (rhinovirus A1), echovirus 34 (coxsackievirus A24), enterovirus 72 (virus de la hepatitis A).

I.2.4.2. Clasificación actual de los enterovirus.

La introducción progresiva de las técnicas de biología molecular en el estudio de los enterovirus ha provocado una reestructuración de la clasificación taxonómica del género. Así, actualmente, en base a la secuencia de nucleótidos presente en el gen de VP1 y otras características biológicas, el Comité Internacional de Taxonomía Viral considera las especies que se muestran en la tabla I.3. Las cepas de un mismo serotipo divergen entre sí menos de un 25% en su secuencia de nucleótidos y menos de un 12% en la de aminoácidos (Oberste *et al.*, 1999).

Tabla I.3. Clasificación de especies del género *Enterovirus* (Romero, 2003)

<i>Poliovirus</i> (3 serotipos) Poliovirus humano 1-3
<i>Enterovirus humano A</i> (10 serotipos) Coxsackievirus A2, A3, A5, A7, A8, A10, A12, A14, A16 EV 71
<i>Enterovirus humano B</i> (36 serotipos) Coxsackievirus A9, B1-B6 Echovirus 1-7, 9, 11-21, 24-27, 29-33 EV 69
<i>Enterovirus humano C</i> (11 serotipos) Coxsackievirus A1, A11, A13, A15, A17-22, A24
<i>Enterovirus humano D</i> (2 serotipos) EV 68 y 70
Enterovirus no asignados a ninguna especie (2 serotipos) Coxsackievirus A4 y A6

Recientemente, se ha propuesto que los poliovirus podrían ser recatalogados como miembros de los EV humanos C (Brown *et al.*, 2003). Sin embargo, se ha observado que mutantes de coxsackievirus A, cercanos a los poliovirus, son incapaces de usar los PVR para penetrar en la célula, y no se ha demostrado que virus relacionados genéticamente sean capaces de adaptar su receptor celular al de otros serotipos de la misma especie (Racaniello, 2001).

I.2.5. Patogénesis e Inmunidad

I.2.5.1. Patogénesis

La infección por los enterovirus se produce fundamentalmente por la ingestión del virus por contaminación fecal. Aunque algunos serotipos causantes de enfermedad respiratoria o conjuntival se transmiten a través de secreciones de esas zonas (ej. coxsackievirus A21, enterovirus 70) (Modlin, 2005a).

De esta manera, se implanta y multiplica en el tejido linfoide de la faringe, para luego atravesar el estómago y su pH ácido, e infectar las placas de Peyer del intestino (días 1-3). Desde aquí se van a emitir grandes cantidades de virus diariamente a las heces.

Tras esta multiplicación en tejido linfoide submucoso, el virus puede pasar a ganglios linfáticos regionales (cervicales o mesentéricos) y dar una primera viremia menor, normalmente indetectable. En este punto, la infección suele ser

atajada por las defensas inmunológicas, cursando por ello habitualmente de forma asintomática.

Sin embargo, la infección que se ha producido del sistema fagocítico-mononuclear, puede, en ciertos casos, sobrepasar las defensas del huésped, provocando una segunda viremia mayor y sostenida. En ella el virus puede alcanzar células y órganos diana (piel, miocardio, meninges, médula espinal), produciéndose en ellos una serie de lesiones inflamatorias y necrosis, no observadas en las anteriores regiones de replicación del virus (Modlin, 2005a).

Poliovirus es altamente infectivo y tan solo 100 TCID₅₀ pueden infectar a un niño por la vía oral. La duración máxima de excreción del virus suele ser de 3-4 semanas en la faringe y 5-6 en heces, aunque se han descrito casos en pacientes inmunodeprimidos de excreción en heces durante años (Pallansch y Roos, 2001; Modlin, 2005a).

Estudiando la poliomielitis en el hombre y en modelos animales se ha comprobado la importancia de la viremia para alcanzar el SNC, la permeabilidad de la barrera hematoencefálica al virus, así como la capacidad de los anticuerpos neutralizantes circulantes en sangre para atajar la enfermedad. Sin embargo, algunos ensayos también han sugerido la existencia de otros medios para alcanzar esa diana, como el flujo axonal retrógrado a través de nervios periféricos y pares craneales. Es posible que se produzca una combinación de ambos mecanismos, mediante la llegada del virus a músculo en la viremia y extensión a SNC a través del axón (Pallansch y Roos, 2001).

I.2.5.2. Respuesta inmune

Parece estar mediada fundamentalmente por la inmunidad humoral, de hecho se observan infecciones persistentes en pacientes con agammaglobulinemias, además de una mayor susceptibilidad y severidad de la infección en neonatos y niños pequeños (Pallansch y Roos, 2001).

Los anticuerpos de las clases IgG, IgM e IgA, juegan un papel fundamental en la defensa frente a los enterovirus. Estos anticuerpos se producen con rapidez, por la multiplicación del virus en el tejido linfoide intestinal y son específicos de serotipo (Pallansch y Roos, 2001). La implicación de la IgA en la defensa frente a la adquisición de la enfermedad, ya que se sitúa en la primera línea de batalla frente al virus (mucosa respiratoria e intestinal), ha sido muy estudiada en los poliovirus por la capacidad de la vacuna atenuada de Sabin de generarla (Pallansch y Roos, 2001).

Los puntos de neutralización por anticuerpos son fundamentalmente sitios antigénicos conformacionales no secuenciales de las proteínas de la cápsida, en concreto poliovirus 1 parece presentar zonas de neutralización en complejos que incluyen regiones de VP1 (residuos 220-222 y 286-290), VP2 (residuos 169-170) y VP3 (residuos 58-59). Otros enterovirus parecen comportarse de manera similar (Pallansch y Roos, 2001). No se han encontrado anticuerpos neutralizantes dirigidos contra proteínas no estructurales.

Además de esta inmunidad humoral, la función de los macrófagos también resulta decisiva en la defensa frente a los enterovirus. Los linfocitos T, al contrario, no contribuyen a ese proceso, excepto los Th2, por su cooperación con las células B productoras de anticuerpos neutralizantes (Pallansch y Roos, 2001).

I.2.5.3. Inmunopatología

Existen varias razones por las que se ha postulado un mecanismo inmunopatológico en la producción de ciertas enfermedades causadas por enterovirus. Por un lado, en algunos de estos síndromes se ha observado una importante respuesta inflamatoria, además algunos modelos animales han dejado entrever una mayor susceptibilidad genética y la eficacia de tratamientos inmunosupresores. Y por último, ciertas enfermedades inducidas por estos microorganismos se han relacionado con procesos de base autoinmune en el ser humano (Pallansch y Roos, 2001).

Concretamente se han relacionado con estos mecanismos inmunopatológicos, la cardiomiopatía dilatada crónica, la miositis crónica y la diabetes.

Se ha relacionado la enfermedad cardíaca con la infección por coxsackievirus B3, por ello se ha estudiado en modelos animales, observándose la posibilidad de un mimetismo molecular que induciría una respuesta inmune frente al virus que podría dar lugar a una respuesta cruzada con el tejido cardíaco (Modlin, 2000a).

Por otro lado, coxsackievirus B4 y B3 se han relacionado con la producción de Diabetes Mellitus Insulino-dependiente (DMID) por la detección de anticuerpos en estos pacientes (Helfand *et al.*, 1995) o detección del virus mediante técnicas moleculares (Clements *et al.*, 1995). También este caso podría estar ocasionado por un mecanismo inmune de mimetismo molecular, ya que los anticuerpos generados contra la proteína 2C del virus se ha visto que reaccionan de forma cruzada con la descarboxilasa de ácido glutámico GAD₆₅, expresada en

páncreas y SNC. Sin embargo, muchos estudios proponen otro mecanismo, con estos enterovirus como agentes superantigénicos capaces de generar respuestas inmunes inespecíficas no reguladas con la activación de linfocitos T que destruirían los islotes pancreáticos, dando lugar a insulinitis y DMID (Pallansch y Roos, 2001).

I.2.5.4. Virulencia y tropismo celular

Aunque la expresión del receptor PVR constituye un elemento esencial para la infección por poliovirus, no se correlaciona totalmente su expresión con el desarrollo de la enfermedad en un tejido particular. De esta manera, los niveles de PVR en hígado, pulmón o corazón, son superiores a los del cerebro. Podrían existir otros determinantes para la infección de un tejido o una célula por poliovirus, tal es el caso de los sitios internos de entrada al ribosoma (IRES) que podrían constituir un segundo elemento esencial para la neurovirulencia del virus. Habría factores celulares específicos en las neuronas, capaces de iniciar una traducción de la poliproteína más eficiente que en otros tejidos.

Se han comparado las secuencias de cepas de poliovirus vacunales y salvajes para identificar esos determinantes de patogenicidad. La región 5' no codificante, nucleótidos 480 (poliovirus 1), 481 (poliovirus 2) y 472 (poliovirus 3), en la región del IRES, se han considerado críticos para esa neurovirulencia. Además, algunos otros determinantes adicionales parecen observarse en las proteínas de la cápsida e, incluso, en la polimerasa 3D y en la región 3' no codificante (Pallansch y Roos, 2001).

Por otro lado, la cepa Sabin de poliovirus 3 es el serotipo vacunal que más fácilmente revierte a su correspondiente variante neurovirulenta y se ha comprobado que es el serotipo que menos diferencias presenta con su homólogo salvaje (11 nucleótidos), mientras que poliovirus 1 y 2, muestran 56 y 23 nucleótidos de diferencia, respectivamente.

Sin embargo, más importante que la neurovirulencia inherente al virus para el desarrollo de la poliomiелitis, podrían ser las capacidades de transmisibilidad y replicativas del mismo (Pallansch y Roos, 2001).

I.2.5.5. Persistencia

Las infecciones causadas por enterovirus suelen tener un carácter agudo y autolimitado, sin embargo se han descrito también múltiples infecciones persistentes en personas con inmunodeficiencias de tipo humoral, que no

consiguen eliminar totalmente el virus. También se han comentado algunas infecciones crónicas que pueden producirse en sujetos inmunocompetentes, posiblemente por inadecuada actuación del sistema inmune (Pallansch y Roos, 2001).

I.3. MANIFESTACIONES CLÍNICAS

Los enterovirus producen un elevadísimo número de infecciones en el hombre, que, si bien suelen resultar asintomáticas, pueden provocar, a veces, graves secuelas en los pacientes. Múltiples síndromes clínicos pueden ser causados por distintos serotipos, e igualmente hay serotipos capaces de causar enfermedades varias. Sin embargo, algunos serotipos concretos sí se han relacionado con alguna enfermedad, conjuntivitis hemorrágica por CVA24v o EV70, parálisis fláccida aguda por EV71 o diabetes asociada a distintos coxsackievirus B (Pallansch y Roos, 2001).

I.3.1. ENFERMEDAD NEUROLÓGICA

I.3.1.1. Parálisis fláccida aguda

La infección por poliovirus es asintomática en más del 90% de los casos, y únicamente el 0,1% de pacientes sufrirá la característica poliomiелitis parálitica, enfermedad de *Heine-Medin* o enfermedad *mayor*. El resto de pacientes (<10%) padecerá la denominada *poliomiелitis abortiva* o enfermedad *menor*, un cuadro febril leve con fatiga, cefalea, mialgias y dolor de garganta, indistinguible de otras enfermedades víricas. Aproximadamente un 10% de pacientes con poliomiелitis abortiva (1% del total) desarrollará una meningitis aséptica concomitante, indistinguible de la producida por los enterovirus no polio (Rotbart, 1997).

El período de incubación de la enfermedad es de 9-12 días para los pródromos y de 11-17 días para el desarrollo de la parálisis. El curso de la misma, sobre todo en niños pequeños, suele ser bifásica, con la enfermedad *menor* precediendo a la enfermedad *mayor*. La parálisis puede ser espinal o bulbar, según se produzca la afectación de nervios periféricos o pares craneales, respectivamente. La causa de la enfermedad es la inflamación y destrucción de la sustancia gris del SNC, inducida por el virus.

El síndrome más frecuente, la parálisis espinal, suele comenzar con mialgias y debilidad muscular que tras 1-2 días se convierte en una parálisis asimétrica y fláccida, que afecta a los músculos proximales de la pierna fundamentalmente. La tetraplejía es poco frecuente y, de aparecer, lo hace en pacientes adultos.

La parálisis bulbar se desarrolla en un 10-15% de pacientes que desarrollan la parálisis y supone un cuadro más grave que el espinal, pudiendo causar disfagia o disnea principalmente, pues los pares craneales más frecuentemente afectados son el IX y X. Se pueden ver afectados los centros de la médula controladores del sistema respiratorio o vasomotor, pudiendo generar compromiso respiratorio y un pronóstico mucho más grave (Modlin, 2000b).

Además de los poliovirus, otros enterovirus pueden dar lugar a este fenómeno de parálisis flácida aguda (PFA), destacando enterovirus 71, que ha provocado brotes de esta enfermedad en Bulgaria (1975) y Malasia (1997), emergiendo en las últimas décadas como el enterovirus más neurovirulento (Pallansch y Roos, 2001). Otros enterovirus capaces de producir PFA han sido EV70, CVA7, CVA9, CVB1-5, E6 y E9, principalmente, aunque otros muchos serotipos podrían estar implicados (Modlin, 2000c).

Síndrome postpolio y esclerosis lateral amiotrófica.

El síndrome postpolio se trata de un nuevo desarrollo de debilidad, dolor, atrofia y fatiga muscular, mucho tiempo después (25-35 años) de la infección aguda por poliovirus en pacientes que se habían recuperado total o parcialmente. Se suelen ver afectados los mismos músculos que en el proceso inicial y como etiología algunos autores han propuesto una infección persistente por enterovirus, aunque otros no han conseguido confirmar esta hipótesis (Pallansch y Roos, 2001; Modlin, 2005b).

En cuanto al desarrollo de la esclerosis lateral amiotrófica, una enfermedad crónica progresiva en la que se produce la muerte de neuronas motoras, también se ha propuesto el papel de los enterovirus como posible causa, y algunos estudios han comunicado la detección del genoma de echovirus 6 y 7 en biopsia cerebral de estos pacientes, aunque se requieren más estudios que corroboren esta idea (Pallansch y Roos, 2001).

I.3.1.2. Meningitis aséptica aguda

Se trata de una inflamación del SNC con fiebre, cefalea, fotofobia y signos de irritación meníngea en ausencia de bacterias u hongos. Se detecta pleocitosis en LCR (10-500 leucocitos/mm³), con predominio de linfocitos normalmente, aunque en las primeras 24-48 horas de la infección pueden ser predominantes los neutrófilos.

Suele afectar a niños menores de 3 meses (grave en las primeras 2 semanas de vida), constituyendo los enterovirus el 85-95% de agentes causales de meningitis asépticas cuando ésta ha podido ser establecida. Por ello, este síndrome es, de los asociados a la infección enteroviral, el más frecuentemente estudiado y atendido (Romero y Rotbart, 2003; Modlin, 2005c).

Los serotipos más vinculados a este síndrome parecen ser CVB5, E4, E6, E9, E11 y E30, aunque, como en los casos de PFA, muchos otros serotipos podrían causar esta enfermedad (Modlin, 2005c).

La meningitis enteroviral, también puede estar asociada a anomalías no neurológicas, como faringitis, diarrea o rash (echovirus 4, 6, 9 y 16). De esta manera, algunos casos de meningitis por E9 se han asociado a la aparición de petequias, por lo clínicamente podría asemejar una meningococemia (Modlin, 2000c).

La sintomatología suele resolverse en 1 semana sin dejar secuelas, aunque en adultos puede prolongarse algo más, ya que parece que la enfermedad es más severa. Simplemente la punción lumbar, puede aliviar mucho por la disminución de la presión intracraneal que se produce (Rotbart, 1997).

I.3.1.3. Encefalitis

La encefalitis es un proceso más grave y menos frecuente que, habitualmente, está originado por virus del grupo herpes y en un 11-22% se debe a enterovirus, constituyendo así la segunda causa viral junto con los arbovirus. La mayoría de pacientes no neonatos suelen curar sin secuelas, aunque algunos casos de muerte han sido comunicados (Modlin, 2005c).

Muchos serotipos podrían estar implicados, aunque habría que resaltar a CVA9, CVB2, CVB5, E6, E9 y EV71. Este último constituyó la causa de un gran brote de herpangina y enfermedad mano-pie-boca en Taiwan en 1999, donde la principal complicación de los 405 pacientes con enfermedad severa fue el desarrollo de encefalitis (Ho *et al.*, 1999). Por otro lado, la utilización cada vez mayor de técnicas de biología molecular puede facilitar el diagnóstico de este síndrome en muestras de LCR, como se ha observado con el virus herpes simplex.

Otras enfermedades centrales que podrían estar asociadas a enterovirus son el síndrome de Guillain-Barré o el síndrome de Reye, con aislamientos del virus en muestras de estos paciente, incluso en muestras cerebrales o de LCR, aunque se requieren más estudios para confirmar estos hechos (Modlin, 2000c).

I.3.2. ENFERMEDADES NO NEUROLÓGICAS

I.3.2.1. Exantemas

Este tipo de exantemas causa baja morbilidad, aunque es importante identificarlos para vigilar la prevalencia de enterovirus en la comunidad, así como para descartar otros tipos de exantemas infecciosos con implicaciones más serias. Según las características del exantema podemos considerar 4 tipos:

Exantemas rubeoliformes o morbiliformes

Rash maculopapular, que aparece simultáneamente con la fiebre, en cara, cuello, torax y extremidades, en epidemias veraniegas (sobre todo por echovirus 9) y recuerda al producido en la infección por el virus de la Rubéola. A diferencia de ésta no aparece prurito en las lesiones, ni tampoco linfadenopatías a nivel cervical. Suele afectar a niños menores de 5 años (Modlin, 2005c).

Exantemas roseoliformes

De forma análoga al exantema súbito o roseola infantil por Virus Herpes Humano tipo 6 (VHH-6), tras un síndrome febril de 24-36 h se desarrolla este exantema no pruriginoso en cara y tórax, que desaparece en menos de 5 días. La diferencia fundamental respecto al exantema rubeoliforme es el tiempo transcurrido para el desarrollo del mismo (Modlin, 2005c).

Exantemas herpetiformes o vesiculares

Destaca en esta forma una de las entidades clínicas más típicas producidas por enterovirus, la **enfermedad mano-pie-boca (MPB)** o estomatitis vesicular con exantema, causada principalmente por coxsackievirus A16 o enterovirus 71. La infección por EV71 presenta más complicaciones que si está producida por CVA16 (32% vs 6%), en forma de meningitis, encefalitis, edema pulmonar o parálisis, además de mayor mortalidad (7,9% vs 0%) (Chang *et al.*, 1999).

La enfermedad MPB se caracteriza por la aparición de fiebre y vesículas en la cavidad oral anterior, que en un 75% de los casos se acompaña de más lesiones vesiculosas en manos, pies, nalgas o genitales. Los enterovirus pueden ser aislados de estas vesículas lo que indica que las lesiones pueden ser fruto de una invasión viral directa de la piel tras la viremia. Esta enfermedad recuerda a otras de mayor entidad como varicela o gingivostomatitis herpética, si bien se diferencia de ellas por su menor gravedad y localización de las vesículas, en la varicela tienen una situación más central sin afectar a palmas y plantas, mientras

que la infección por virus herpes simplex se confina únicamente a la cavidad oral, además de generar una respuesta inmune superior (mayor fiebre, linfadenopatías cervicales) (Rotbart, 1997; Modlin, 2005c).

Otras formas exantemáticas herpéticas se han relacionado con infecciones por CVA9 o E11, sin afectar a la cavidad oral (Modlin, 2005c).

Exantemas petequiales

En algunas infecciones por E9 o CVA9, se ha descrito este tipo de rash, que puede ir acompañado de un cuadro meníngeo y asemejar una meningococemia (Modlin, 2000c).

I.3.2.2. Infecciones respiratorias agudas

Estos virus son la principal causa de síndrome febril sin foco o gripe veraniega con disfagia y tos en ocasiones. Los enterovirus son los microorganismos más comúnmente aislados durante el periodo estival en niños con infecciones del tracto respiratorio superior. Clínicamente da lugar a cuadros indistinguibles de los causados por rinovirus o *Mycoplasma pneumoniae*, y raramente produce neumonía (Romero y Rotbart, 2003; Modlin, 2005c).

Los serotipos más patógenos a nivel respiratorio, productores de una enfermedad tipo resfriado común, pero con mayor incidencia de fiebre parecen ser CVA21, CVA24, E11 y algunos coxsackievirus B (Modlin, 2000c).

Herpangina

Consiste en la aparición de vesículas en paladar blando y fauces, acompañadas de fiebre (37,7-40,5°C) y afectación del tracto respiratorio superior (dolor de garganta y dolor al tragar). Suele aparecer como brotes veraniegos en niños de 3-10 años y los serotipos normalmente recuperados en esta enfermedad son coxsackievirus A1-10, A16 y A22 (Modlin, 2005c).

El enantema aparece horas después que los primeros síntomas respiratorios, en forma de máculas que finalmente se transforman en 2-6 vesículas situadas en la región entre la úvula y la amígdala. Los pacientes únicamente requieren tratamiento sintomático y todos se recuperan sin problemas.

Se trata de un síndrome bastante benigno, que se diferencia de otros más graves por la aparición de las vesículas (no así en faringitis bacterianas o virales), localización de éstas en cavidad oral posterior (gingivoestomatitis herpética o MPB

muestran las vesículas en la zona anterior) y ausencia de toxicidad sistémica o linfadenitis cervical (infección herpética) (Modlin, 2000c).

I.3.2.3. Miopericarditis

Se trata de una inflamación de origen no isquémico, que suele afectar a varones de 20-39 años con una severidad variable, desde una infección asintomática hasta casos fulminantes con desarrollo de una insuficiencia cardiaca intratable y la muerte.

Los enterovirus podrían representar hasta la mitad de todos los agentes causantes de miopericarditis aguda. Según la detección realizada en muestras de miocardio o líquido pericárdico, los serotipos más implicados son todos los coxsackievirus B (CVB3 y CVB5, principalmente), CVA4, CVA16 y E9. Además otros muchos serotipos han sido aislados en este tipo de pacientes en muestras no cardíacas, por lo que no se puede saber con seguridad su papel en este cuadro. Otros virus se han relacionado con esta enfermedad: adenovirus, virus influenza A, virus de la parotiditis o virus vaccinia (Pallansch y Roos, 2001; Modlin, 2005c).

La enfermedad cursa con una viremia que permite la llegada de este microorganismo al corazón. Una vez ahí, se produciría la replicación en las miofibrillas, su necrosis y una infiltración focal leucocitaria. Puede persistir una respuesta inflamatoria crónica durante semanas o meses, inducida por el virus, pero sin el virus presente, mediada por linfocitos T citotóxicos que destruirían los miocitos, según algunos autores (Modlin, 2000c).

La mayoría de los casos son autolimitados, aunque se han probado distintas terapias con inmunoglobulinas e inmunosupresores sin datos concluyentes al respecto. Se puede producir hasta un 4% de mortalidad y un tercio de los pacientes se piensa que podría desarrollar una cardiomiopatía dilatada crónica (Pallansch y Roos, 2001).

I.3.2.4. Enfermedad muscular

La implicación de los enterovirus en estas enfermedades se empezó a examinar cuando se vio el miotropismo de coxsackievirus en ratón lactante. Se han realizado estudios serológicos y otros de microscopía electrónica o biología molecular en biopsia muscular, que sugieren esta asociación causa-enfermedad, sin embargo algunos estudios no han podido corroborarlo (Pallansch y Roos, 2001).

Estos síndromes musculares inflamatorios pueden ser agudos, miositis focal o polimiositis generalizada, y crónicos, que luego serán tratados. La enfermedad aguda se caracteriza por presentar fiebre con mialgia, debilidad y edema muscular, junto con elevación de creatina fosfoquinasa y mioglobinuria (Modlin, 2000c).

Pleurodinia o Enfermedad de Bornholm

Se trata de una infección aguda caracterizada por fiebre y dolor agudo, espasmódico en el tórax y parte alta del abdomen. Fue descrita originalmente en el siglo XVIII, aunque Ejnar Sylvest en 1933 detallaría la enfermedad con más rigor, aludiendo a su experiencia en la isla danesa de Bornholm. Los serotipos más implicados son del grupo coxsackievirus B (CVB3 y CVB5) (Modlin, 2005c).

Esta enfermedad afecta a la musculatura (intercostales, trapecio, oblicuos, transversos), probablemente por invasión vírica directa tras una fase de viremia. Normalmente aparece de forma abrupta con ataques de dolor espasmódico en esas zonas que se suele acompañar de fiebre, pudiendo permanecer sano el paciente entre los distintos ataques paroxístmicos, aunque éstos van disminuyendo en severidad a lo largo del tiempo.

El cuadro suele tener una duración de 4-6 días, afectando más severamente a pacientes adultos, aunque todos suelen recuperarse totalmente y únicamente puede persistir durante unos meses algún tipo de debilidad en los casos más graves (Modlin, 2000c).

I.3.2.5. Conjuntivitis aguda hemorrágica

Enterovirus 70 y una variante de coxsackievirus A24 (CVA24v) son capaces de producir esta enfermedad. Se manifiesta inicialmente como una infección unocular dolorosa que tras unas pocas horas afecta a los dos ojos. Se produce hinchazón del párpado, quemazón, fotofobia y hemorragia subconjuntival (característica sobre todo de EV70) que suele resolver espontáneamente en 1-2 semanas. El diagnóstico directo se debe realizar detectando del virus en muestras conjuntivales, ya que es más difícil hacerlo en muestras faríngeas o fecales (Modlin, 2005c).

La primera pandemia identificada, por EV70, data de 1969-1971 y afectó a millones de personas en todo el mundo, mostrando su alta infectividad. Desde entonces, decenas de millones de casos se han producido en el mundo por estos dos serotipos (fundamentalmente por EV70), por brotes producidos en regiones

costeras superpobladas y de bajo nivel socioeconómico de África y Asia (sobre todo en las estaciones cálidas y lluviosas), aunque también se han descrito casos en Europa y América. Las epidemias más cercanas en el tiempo, debidas a CVA24v, se han producido en países de América Central y del Sur (Puerto Rico, Brasil) con cientos de miles de casos en 2003. En estos brotes se deben extremar las medidas de higiene (lavado de manos) y evitar compartir ropa, toallas, maquillaje u otros objetos personales con estos enfermos para interrumpir el contagio (CDC, 2004).

La enfermedad se manifiesta fundamentalmente en adultos, ya que en niños parece ser más leve o inaparente. De forma infrecuente se pueden producir complicaciones en forma de parálisis motora en los casos de infección por EV70 (Modlin, 2000c).

I.3.2.6. Enfermedad neonatal

Los recién nacidos son un grupo de población más susceptibles a las infecciones por enterovirus, por lo que se tratan en este apartado específicamente, aunque van a sufrir muchas de las enfermedades ya comentadas.

El origen podría ser una infección materna y transmisión en el momento del parto. Aproximadamente un 60-70% de mujeres con un bebe infectado tuvieron un cuadro febril durante la última semana del embarazo. Los niños y los prematuros parecen más susceptibles a la infección, aunque la severidad de ésta varía según el serotipo infectivo. Los serotipos asociados a infecciones sistémicas neonatales son CVB2-5 o E11 (Magnius *et al.*, 1990).

Habitualmente, se van a ver afectados por una infección asintomática y los casos clínicamente detectables van a estar asociados normalmente a enfermedad febril inespecífica. Según distintos estudios, los enterovirus podrían causar hasta un tercio de los casos de meningitis en niños menores de un mes, 15% de las neumonías o un 65% de los fenómenos sépticos en menores de 3 meses. Se han comunicado enfermedades fatales por enterovirus, de carácter multiorgánico, con afectación de hígado, pulmón, corazón, páncreas y cerebro. Concretamente los casos de miocarditis se han relacionado con infección por coxsackievirus y de hepatitis con echovirus. Se puede producir también neumonía asociada a enterovirus, muy grave y casi siempre mortal (Modlin, 2000c; Pallansch y Roos, 2001).

I.3.2.7. Gastroenteritis y otras enfermedades de dudosa etiología enteroviral

Los enterovirus utilizan el tracto gastrointestinal como nicho habitual de replicación, por lo que su detección en muestras fecales debe ser interpretada con cautela. En la mayoría de casos, esto ocurre por la presencia del microorganismo en el cuerpo de forma pasajera y asintomática o asociada a alguna de las enfermedades descritas más arriba.

De todas formas, algunos estudios han catalogado a algunos serotipos (echovirus 11, 14, 18) como agentes etiológicos de cuadros gastrointestinales (Phan *et al.*, 2005). También se ha documentado un brote de diarrea asociada a coxsackievirus A1 en pacientes trasplantados de médula ósea, con una importante morbi-mortalidad (Modlin, 2005c). Sin embargo, muchos de esos estudios se realizaron antes de conocer el papel patógeno de *Escherichia coli* enterotoxigénico, rotavirus, adenovirus o calicivirus. Por tanto, son necesarias más investigaciones con individuos control que permitan confirmar el papel de los enterovirus en este cuadro (Modlin, 2000c).

Además de la gastroenteritis, existen otras muchas enfermedades cuya etiología se ha asociado con enterovirus, aunque sea de forma incierta. El síndrome urémico hemolítico (SUH) y la insuficiencia renal aguda se han relacionado con mecanismos inmunopatológicos relacionados con infección enteroviral previa, posteriormente se ha conocido el importante papel que desempeña *E.coli* enterohemorrágico en el SUH. Otras enfermedades que se han relacionado con infección por enterovirus son: hepatitis (coxsackievirus B), pancreatitis, orquitis (CVB5) o síndrome mononucleósico (echovirus 11). Estas últimas asociaciones son hipotéticas, a partir de trabajos aislados no confirmados, aunque en varios de ellos el agente se ha aislado en cultivo celular a partir del tejido infectado (Modlin, 2000c).

I.3.3. INFECCIÓN PERSISTENTE

Algunos síndromes causados por los enterovirus, ya no de forma aguda, sino tras un período de tiempo más prolongado y habitualmente en inmunodeprimidos se detallan a continuación.

I.3.3.1. Miocardiopatía dilatada crónica

Esta enfermedad se ha asociado a múltiples causas y una infección previa por enterovirus, especialmente coxsackievirus B, se ha sugerido en distintos estudios.

No se ha podido aislar en cultivo celular el enterovirus a partir de muestras cardíacas, como sí sucedía en la enfermedad aguda, pero sí que se ha podido detectar su ARN (Archard *et al.*, 1998). Otros estudios genéticos, sin embargo, no han conseguido encontrar esa evidencia del ARN enteroviral en biopsia cardíaca (de Leeuw *et al.*, 1998).

I.3.3.2. Diabetes mellitus tipo I o insulina dependiente (DMID)

La infección por coxsackievirus B se ha relacionado con este síndrome. Primeramente la observación de patrones estacionales y a veces en pequeños brotes de aparición de nuevos casos de DMID hizo hipotetizar sobre este hecho. Concretamente, muchos nuevos casos de DMID se establecen en los meses fríos, mientras que las infecciones por enterovirus se dan en los meses cálidos, lo que sería consistente con un posible mecanismo inmunopatógeno postinfección (Rotbart, 1997). Además, se han realizado estudios serológicos en niños con esta enfermedad que han permitido observar una mayor incidencia de IgM en enfermos que en controles (Helfand *et al.*, 1995). También se ha estudiado este hecho mediante técnicas moleculares, detectándose el genoma de coxsackievirus B3 y B4 en 64% de pacientes y únicamente en 4% de controles (Clements *et al.*, 1995). Además se ha detectado el genoma del virus en páncreas de casos fatales de DMID por cetoacidosis, cuya inoculación en primates ha mostrado capacidad diabetogénica (Pallansch y Roos, 2001). Aunque parece probable que los enterovirus son capaces de inducir DMID en animales y humanos, se desconoce la frecuencia con que esto ocurre y los mecanismos inmunes implicados, aunque ya hemos descrito algunas de las hipótesis al respecto.

I.3.3.3. Meningoencefalitis crónica en inmunodeprimidos

En los sujetos inmunodeprimidos, particularmente aquellos con defectos en la función de linfocitos B, se ha observado una mayor susceptibilidad para la infección enteroviral persistente del SNC. Concretamente son los niños con agammaglobulinemias ligadas al cromosoma X los pacientes mejor estudiados.

La infección se ha relacionado sobre todo con echovirus. Clínicamente, las manifestaciones de infección del SNC son leves o nulas, aunque pueden fluctuar en severidad. El LCR muestra pleocitosis y se pueden recuperar enterovirus durante meses y años a un título alto, que, sin embargo, resultan más complicados de aislar en las heces. La enfermedad suele tener un resultado fatal (Modlin, 2000c).

I.3.3.4. Enfermedades musculares crónicas: Polimiositis, Dermatomiositis

Se trata de cuadros debilitantes de progresión subaguda o crónica, con hallazgos patológicos en músculo. La dermatomiositis se caracteriza, además, por presentar un exantema característico. Las causas de éstas se desconocen, aunque se han lanzado hipótesis sobre una posible acción viral directa (especialmente por enterovirus) o un mecanismo autoinmune contra el músculo inducido por la infección (Pallansch y Roos, 2001).

También se ha descrito un síndrome tipo dermatomiositis en inmunodeprimidos causado por echovirus, que puede ir acompañado de encefalomiелitis (Pallansch y Roos, 2001).

Síndrome de fatiga crónica

Algunos estudios realizados en Inglaterra han relacionado la infección enteroviral con este síndrome. Estos trabajos, realizados por un mismo equipo, se realizaron mediante serología, detección de antígeno en sangre de pacientes y técnicas de ácidos nucleicos (Rotbart, 1997). Otros investigadores, sin embargo, no han podido confirmarlo utilizando esa misma metodología (Rotbart, 1997).

I.4. DIAGNÓSTICO

La detección de enterovirus en algunas muestras clínicas procedentes de regiones corporales que forman parte de su ciclo viral (respiratorias, heces) puede indicar infección, pero no necesariamente enfermedad. La eliminación del virus en heces y nasofaringe se produce tanto en enfermos, como en individuos asintomáticos, siendo la presencia en heces más prolongada en el tiempo. Por ello, el diagnóstico de enfermedad a partir de esas muestras será muy sensible, aunque con una baja especificidad (mayor en las muestras respiratorias que en heces), pudiendo constituir un diagnóstico posible, pero no definitivo. Por otro lado, existen las llamadas zonas no permitidas para los enterovirus, como LCR, suero o aparato genito-urinario, donde la detección del mismo es altamente sugerente de enfermedad (Rotbart, 1997; Romero, 1999).

Por otro lado, en ciertas situaciones epidemiológicas, un diagnóstico clínico puede tener un alto grado de certeza. De esta manera, una meningitis enteroviral en un niño puede ser fácilmente diagnosticable valorando signos y síntomas del paciente, si se conoce la existencia de una epidemia por un determinado serotipo de enterovirus. Igualmente el hallazgo de un enterovirus en una muestra conjuntival de un paciente,

hace innecesario el estudio pormenorizado de otros enfermos con conjuntivitis aguda hemorrágica.

I.4.1. Recogida, transporte y almacenamiento de las muestras

Estos microorganismos son muy estables en líquidos y capaces de sobrevivir durante semanas en agua o fluidos biológicos. Las mejores muestras para detectar el virus son, en orden de preferencia, heces, aspirado nasofaríngeo y LCR (estas dos últimas serán útiles en la fase temprana de la enfermedad). En los casos de conjuntivitis, se debe buscar el enterovirus en exudados conjuntivales o lágrimas. Las muestras de LCR, heces, sangre y orina pueden ser enviadas en el contenedor original de la muestra, mientras que aquellas recogidas en escobillón procedentes de recto o tracto respiratorio superior, deben ser remitidas en medio de transporte de virus.

La infectividad en cultivo celular suele permanecer inalterada tras años (incluso décadas) de congelación a -70°C (y probablemente a -20°C también). Esa estabilidad viral también continúa constante durante semanas cuando la muestra está refrigerada (4°C), por lo que muestras almacenadas en situaciones “subóptimas” pueden incluso ser adecuadas para estudiar la presencia de enterovirus (Romero y Rotbart, 2003).

I.4.2. DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO

I.4.2.1. Aislamiento en cultivo celular

Esta es la técnica utilizada por la mayoría de laboratorios clínicos. El hallazgo más temprano y característico para detectar el crecimiento es un efecto citopático muy destructivo. Para confirmarlo, se suele realizar una inmunofluorescencia con un anticuerpo monoclonal genérico de enterovirus dirigido frente a la proteína VP1 del virus. También se pueden realizar pruebas físico-químicas, que demuestran la capacidad de este agente para crecer en presencia de cloroformo y pH ácido (Trabelsi *et al.*, 1995).

En la tabla I.4 se muestra el crecimiento relativo de cada grupo de enterovirus en distintas líneas celulares y podemos observar que no hay ningún tipo celular que soporte el crecimiento de todos ellos. Por esta razón se tendrán que utilizar varias líneas celulares en el diagnóstico cuando se sospeche la implicación de enterovirus en la misma (Chonmaitree *et al.*, 1988).

Tabla I.4. Susceptibilidad de líneas celulares utilizadas en el aislamiento de EVs (Romero, 2003)

Línea celular	Susceptibilidad para el aislamiento de:			
	Poliovirus	Virus Coxsackie Tipo A Tipo B		EVs
Riñón de mono				
Rhesus	+++	+	+++	+++
Cynomolgus	++++	+	+++	+++
Búfalo verde (BGM)	+++	+	++++	++
Humanas				
HeLa	+++	+	+++	+
Riñón (HK)	+++	+	++	+++
WI-38	++	++	+	+++
Pulmón de embrión (HELFL)	+++	++	+	+++
MRC-5	+++	+	+	+++
Rabdomiosarcoma (RD)	+++	+++	+	+++
Hep-2	+++	+	+++	+
A549	+++		+++	+++
NCI-H292	+++	+++	+++	+++

Se observa que los poliovirus son capaces de replicarse casi en cualquier tipo de célula, igual que la mayoría de los enterovirus no coxsackie. Como consecuencia de la campaña de erradicación de la poliomielitis se han desarrollado líneas celulares murinas que expresan el exclusivo receptor de los poliovirus (PVR) y de esta manera, poder seleccionar estos virus en presencia incluso de otros enterovirus. Actualmente los laboratorios que participan en la campaña de vigilancia de la poliomielitis utilizan la línea L20B para investigar la presencia de poliovirus en los casos de parálisis flácida aguda (Pallansch y Roos, 2001). De todas formas, algunos coxsackievirus A (CVA8, CVA10) y otros enterovirus no polio son capaces de crecer en L20B, por lo que el crecimiento en esta línea no constituye un diagnóstico definitivo, sino que se deben realizar pruebas confirmatorias (Nadkarni y Deshpande, 2003).

Es ampliamente conocida la dificultad para aislar coxsackievirus A en cultivo celular, siendo las células de rabdomiosarcoma humano las más sensibles para ello. Los serotipos más fácilmente detectables mediante esta técnica parecen ser CVA9 y CVA16, aunque hay algunos otros capaces de crecer *in vitro*. Sin embargo, la única forma de aislar la mayoría de los coxsackievirus A es inoculando la muestra en ratón lactante (Modlin, 2005a).

Habitualmente, los laboratorios de diagnóstico clínico utilizan la combinación de una línea de riñón de mono (Vero, BGM), más otra de fibroblasto humano (MRC-5, WI-38), a la que se puede añadir la línea RD para recuperar más fácil y rápidamente echovirus y aquellos virus pertenecientes al grupo Coxsackie A (Dagan y Menegus, 1986).

Otras líneas celulares han sido ensayadas con éxito en diferentes estudios para el crecimiento de los enterovirus. Algunas líneas tumorales humanas como Caco-2, procedentes de carcinoma de colon (Pinto *et al.*, 1994; Buck *et al.*, 2002), o NCI-H292, carcinoma mucoepidermoide de pulmón, han mostrado una altísima sensibilidad para el aislamiento de enterovirus pertenecientes a cualquier grupo (Hierholzer *et al.*, 1993). La primera de ellas ha sido más ampliamente estudiada y se ha propuesto su utilización en cocultivo de *shell vial* junto a BGM-hDAF, consiguiendo unas tasas excelentes de sensibilidad, muy por encima del cultivo tradicional. La línea celular BGM-hDAF, esta compuesta por células de riñón de mono (BGM) modificadas genéticamente para poder expresar en su superficie un receptor ampliamente utilizado por los enterovirus, el factor de aceleración de la degradación (DAF o CD55) (Huang *et al.*, 2002).

La detección de efecto citopático mediante el cultivo tradicional oscila entre 3,7 y 8,2 días cuando la carga viral es baja, como suele suceder en muestras de LCR. La aplicación de la técnica de *shell vial* en este sentido permite detectar el crecimiento en 48-72 h, con una sensibilidad del 93-94% (Klespies *et al.*, 1996; Pérez-Ruiz *et al.*, 2003). Si bien, para obtener la máxima eficacia de esta técnica es importante también elegir la línea celular correcta (ejemplo: RD). En este sentido se postula que podríamos obtener una sensibilidad máxima mediante la utilización de una mezcla de líneas celulares en *shell vial* compuesta por NCI-H292, BGM, A549 y RD (Huang *et al.*, 2000) o Caco-2 y BGM-hDAF (Huang *et al.*, 2002).

I.4.2.2. Diagnóstico molecular

En los últimos años se han conseguido importantes avances en el diagnóstico molecular de los enterovirus. Actualmente mediante RT-PCR podemos detectar específicamente enterovirus, especies, serotipos o cepas, de forma rápida, sensible y útil para en el diagnóstico clínico y manejo del enfermo.

Como en otros campos del diagnóstico clínico, la RT-PCR se muestra como una técnica posiblemente más sensible que el cultivo tradicional (en torno a un 20% más de sensibilidad), por lo que podría desplazar a éste como técnica de referencia. Si bien, muchos de los estudios realizados para comparar la sensibilidad del cultivo celular frente a la RT-PCR hacen una elección poco adecuada de las líneas celulares, de ahí que las cifras de aumento de

sensibilidad puedan ser muy variables entre los distintos estudios (7-61%) (Romero, 1999).

Se comentó al describir el genoma del enterovirus la importancia de la región 5'-NTR, donde encontrábamos secuencias muy conservadas entre los distintos serotipos. Por ello, se han propuesto múltiples regiones dentro de esa zona susceptibles de ser diana de los *primers* y sondas utilizados en esta RT-PCR diagnóstica.

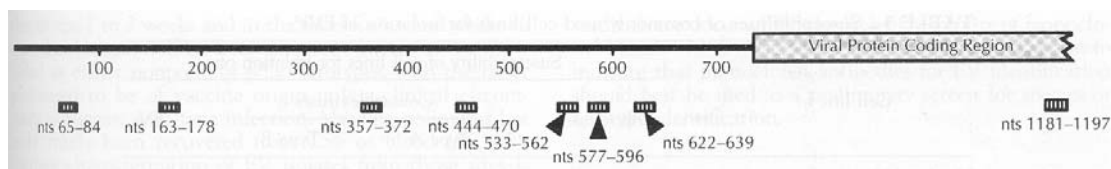


Figura I.3. Regiones de unión en la región 5'-NTR de sondas y *primers* (Romero, 1999)

En la figura I.3, aparecen representadas siete zonas posibles de detección de enterovirus en 5'-NTR. Sin embargo, son las regiones conservadas situadas entre las posiciones 444-468, 542-560 y 577-596 (numeración relativa al genoma del poliovirus 1, cepa Mahoney), las más profundamente estudiadas como reactivas frente a la mayoría de serotipos de enterovirus (Oberste *et al.*, 1999; Romero, 1999). En concreto los *primers* diseñados por Rotbart y colaboradores (1994) han mostrado reactividad frente a más de 60 prototipos distintos de enterovirus, no produciéndose únicamente amplificación de echovirus 16, coxsackievirus A11, A17 y A24, además de los parechovirus 1 y 2 en diferentes estudios (Romero, 1999). Por ello estos oligonucleótidos que generan un producto de unos 150 pb, han sido utilizados para el desarrollo de técnicas comerciales, como el Amplicor EV PCR, o métodos de detección rápida mediante PCR en tiempo real (Watkins-Riedel *et al.*, 2002).

Por otro lado, Chapman y colaboradores (1990) describieron una pareja de *primers* complementarias a las posiciones 444-468 y 622-639 del genoma de enterovirus que también se han mostrado muy válidas para la amplificación de cualquier serotipo, incluido echovirus 16 o parechovirus 2. Casas y colaboradores (1997) desarrollaron una RT-nested PCR que permite el diagnóstico de enfermedades neurológicas de diferentes etiologías (enterovirus y distintos herpesvirus), concretamente las parejas de iniciadores dirigidos a la región 5'-NTR de enterovirus dan lugar a un fragmento de 306-311 pares de bases, cuya secuencia permite conocer la especie de enterovirus humano infectante.

Recientemente, también se ha ofrecido la posibilidad, mediante el empleo de esos *primers*, de detectar el genoma del enterovirus junto a un control interno que permite descubrir falsos negativos por inhibición de la PCR o de la retrotranscripción y minimizar ésta mediante el empleo de α -caseína bovina (probablemente actuando como quelante de iones metálicos inhibidores) (Beld *et al.*, 2004).

Los tests de ácidos nucleicos son cada vez más utilizados por su rapidez y fácil realización. Además muestran una altísima sensibilidad, lo que se traduce en un mejor diagnóstico de la enfermedad por enterovirus.

I.4.2.3. Diagnóstico serológico

El diagnóstico serológico de infección por enterovirus resulta complejo por el gran número de serotipos existentes (impide la disponibilidad de ensayos serológicos para todos ellos), la producción de anticuerpos heterotípicos (reactivos frente a distintos serotipos) y la no disponibilidad de un antígeno genérico de enterovirus para realizar el test. Además es difícil disponer de sueros pareados del paciente para demostrar un aumento significativo del título de anticuerpos. La evidencia de IgM en un suero único indica infección reciente, sin embargo, estos niveles pueden estar aumentados en la población normal, sobre todo en época epidémica (Muir *et al.*, 1998).

En estudios comparativos, se ha estimado una sensibilidad y especificidad de la detección de IgM del 28-34% y 94-96%, respectivamente. Por tanto, la detección única de IgM no parece la aproximación más adecuada y será de utilidad en el diagnóstico de meningitis cuando no haya disponibilidad de LCR o para el diagnóstico de otras enfermedades enterovirales con otra sintomatología como fiebre o exantema (Terletskaia-Ladwig *et al.*, 2000; Craig *et al.*, 2003).

Para la detección de anticuerpos se han descrito varias técnicas: neutralización (poco sensible, no estandarizada y de ardua realización), fijación del complemento (poco específica) e inhibición de la hemaglutinación.

Actualmente, se han desarrollado técnicas de inmunofluorescencia y, más recientemente, de ELISA. Teóricamente estas técnicas permiten diferenciar anticuerpos frente a los grupos Coxsackie A, Coxsackie B y ECHO. Sin embargo se detectan un número considerable de falsos positivos, por la presencia de anticuerpos heterotípicos, que provocan reacciones cruzadas.

Esto dificulta la correcta identificación de respuestas serológicas específicas de cada serotipo, al ir dirigidos contra epítomos comunes de la cápsida (Pallansch y Roos, 2001; de Ory-Manchón, 2005).

Por tanto, aunque la serología puede tener una mayor sensibilidad que el cultivo celular, se deben valorar los datos clínicos y epidemiológicos simultáneamente. De todas formas, estas técnicas tienen poca relevancia en la práctica clínica y normalmente se aplican en estudios epidemiológicos.

I.4.2.4. Caracterización del enterovirus

Normalmente, la determinación de presencia o no de enterovirus en una muestra es el dato más interesante para el manejo clínico del paciente. Por ello, la determinación del serotipo no suele ser práctica habitual en los laboratorios de diagnóstico clínico.

Sin embargo, es importante determinar el serotipo para conocer por ejemplo la presencia de poliovirus en aguas fecales o heces de un niño, y si esa cepa de poliovirus es vacunal (tras la vacunación oral del niño) o salvaje. Se han descrito también casos de poliomielitis asociados a enterovirus no polio, que deben ser caracterizados totalmente. La tipificación es elemental en el campo de la epidemiología, conocer serotipos circulantes en muestras clínicas y medioambientales de distintas regiones, sus relaciones genómicas y las enfermedades asociadas, permite, por ejemplo, reducir los tiempos de hospitalización, la producción de inmunoglobulinas específicas para tratamiento de neonatos o pacientes inmunodeprimidos o la formulación de antígenos para diagnóstico serológico (Muir *et al.*, 1998).

Para la determinación del serotipo podemos hacer uso de varias técnicas, la técnica tradicional, mediante neutralización de efecto citopático (laboriosa y que requiere mucho tiempo) o metodologías más modernas, como la inmunofluorescencia o la secuenciación de una parte del genoma del virus.

I.4.2.4.i. Técnica tradicional (neutralización)

El serotipo de un enterovirus aislado en cultivo se puede determinar mediante la neutralización de su efecto citopático utilizando antisueros específicos frente a cada serotipo. Enfrentar cada uno de los 64 antisueros de referencia con la cepa a investigar sería inviable, por ello en la práctica se usan principalmente las mezclas de antisueros de Lim-Benyesh-Melnick. En este proceso se inoculan diferentes tubos de cultivo con el virus (100 TCID₅₀) y diferentes combinaciones de antisueros. Se incuban unas 2 h a 37°C y se inocula en una línea celular susceptible. Tras unos días de incubación, se observa en cuales de ellos se produce inhibición del crecimiento y se puede deducir de los pools neutralizantes cual es el serotipo cuyo crecimiento se ha anulado (Melnick *et al.*, 1973; Melnick y Wimberly, 1985).

En la figura I.4. se muestra la distribución de los 42 antisueros de Lim-Benyesh-Melnick en 8 pools (A-H). Por ejemplo, si un serotipo es neutralizado por los pools C y E únicamente, se tratará de un coxsackievirus B5.

	E15	A7	B1	E33	B4	E7	E4	E1	E21	E2	B2	P2	E19	A9	E3	E24	E6	B5	P1	B3	E12			
A	■																							A
B																							B	
C			■																				C	
D				■							■												D	
E					■								■										E	
F						■								■									F	
G							■								■								G	
H								■								■							H	
	E25	E13	E14	E16	P3	E11	E18	E17	E22	E27	E20	B6	E31	E23	A16	E29	E5	E26	E9	E30	E32			
A																							A	
B																							B	
C																							C	
D	■																						D	
E																							E	
F																							F	
G																							G	
H																							H	

Figura I.4. Esquema de mezclas de antisueros. Múltiples antisueros están incluidos en cada pool. Una cepa puede ser serotipada por su patrón de neutralización frente a estos 8 antisueros (Melnick *et al.*, 1973).

Actualmente, la capacidad neutralizante de estos antisueros equinos, producidos hace más de 30 años, puede verse disminuida e incluso anulada frente a algunos aislados cuya antigenicidad puede haber variado. De hecho, se pueden obtener enterovirus no tipables por esta deriva antigénica, por constituir un serotipo no descrito o representar una mezcla de serotipos.

I.4.2.4.ii. Inmunofluorescencia

Otra técnica muy utilizada es la inmunofluorescencia con anticuerpos monoclonales. Los estudios realizados han hecho uso de tres mezclas de anticuerpos, para poliovirus (1-3), echovirus (4, 6, 9, 11, 30 y 34) y coxsackievirus B1-6. Además se han aplicado anticuerpos específicos de serotipo, para esos que formaban parte de las mezclas y algunos otros (coxsackievirus A9, A24).

Esta técnica posee una concordancia con la neutralización del 92-97% y permite tipificar en torno al 74% de los aislamientos. En cuanto a las mezclas empleadas, (poliovirus, coxsackievirus B y echovirus) muestran unas cifras de sensibilidad del 73, 85 y 94%, respectivamente y especificidad del 100, 99 y 94%, respectivamente (Bastis *et al.*, 1995; Rigonan *et al.*, 1998).

I.4.2.4.iii. RT-PCR y Secuenciación

La biología molecular ha aportado mucho a la determinación del serotipo de enterovirus, ya que existen cepas no neutralizables mediante los antisueros clásicos, por diferencias notables con su cepa prototipo, como sucede con CVA24v, causante de importantes brotes de conjuntivitis hemorrágica. Además otras cepas no tipables utilizando los antisueros LBM, pueden constituir nuevos serotipos no descritos, hecho que podemos confirmar mediante estas técnicas de ácidos nucleicos.

Para ello se han probado distintas regiones del genoma del enterovirus. Amplificando y secuenciando esas diferentes zonas, se ha observado que regiones como VP2, VP4 o ARN polimerasa, son muy semejantes entre los distintos serotipos, por lo que no permiten discriminar adecuadamente entre sí (Oberste *et al.*, 1998; Casas *et al.*, 2001). Sin embargo, la secuencia de la región VP1 sí aporta las condiciones idóneas, tal como se ha observado en distintos trabajos y permitir un correcto serotipado a través de su secuencia, probablemente porque en ella se encuentran las zonas neutralizables por los anticuerpos. De esta manera, se puede secuenciar ese fragmento de una

cepa problema y al comparar con las bases de datos existentes, deducir el serotipo. Esta región abarca más de mil nucleótidos del genoma, por lo que se han realizado diferentes aproximaciones, hay autores que han trabajado sobre la región 3' (Oberste *et al.*, 1999; Oberste *et al.*, 2000), y otros que han desarrollado técnicas para secuenciar la parte 5' o amino terminal (Casas *et al.*, 2001; Norder *et al.*, 2001).

Esta metodología permite la confirmación de nuevos serotipos de enterovirus, no tipificables mediante la neutralización clásica. Para ello la secuencia parcial de VP1 debe diferenciarse en más de un 25% del resto de genomas de prototipos descritos. Este hallazgo debe ser confirmado posteriormente, comprobando ese porcentaje de no homología en la región P1 completa y, finalmente, en el genoma completo de esa cepa (Oberste *et al.*, 1999). De esta manera, se han descrito algunos nuevos serotipos en los últimos años: EV73 (Oberste *et al.*, 2001), EV 74 y 75 (Oberste *et al.*, 2004), EV 77 y 78 (Norder *et al.*, 2003), EV76, 89, 90 y 91 (Oberste *et al.*, 2005).

I.5. EPIDEMIOLOGÍA

I.5.1. DATOS DEMOGRÁFICOS

Las enfermedades por este tipo de microorganismos son muy prevalentes y tienen una distribución mundial, variable según la estación climática, región, edad y situación socioeconómica. Las infecciones se dan a lo largo de todo el año, pero en zonas de clima templado, como España, las mayores tasas se producen en la época más calurosa (verano y otoño). Este carácter estacional nunca se ha explicado satisfactoriamente, pero las altas temperaturas podrían favorecer la presencia en las aguas de una mayor cantidad de enterovirus en el medio ambiente. Además se ha resaltado la importancia que pueden tener las ropas más cortas y ligeras durante el verano, que podrían favorecer la contaminación fecal. Es importante recordar, la gran cantidad de portadores asintomáticos, que transmiten la infección con la misma eficacia que los enfermos.

Según la Organización Mundial de la Salud, tres cuartas partes del total de enfermedades causadas por enterovirus se producen en niños menores de 15 años, probablemente por la ausencia de contacto anterior con los diferentes serotipos del virus. En un estudio llevado a cabo en Nueva York durante el pico anual de transmisión se observó una tasa de infección de los niños menores de

un mes del 12,8%. Las tasas de infección sintomática decrecen a partir del segundo mes de vida, aunque continúan siendo superiores en niños de corta edad que en niños mayores o adultos. Los niveles socioeconómicos más bajos también presentan aumentadas esas tasas, por el hacinamiento, la falta de higiene y la mayor facilidad de contaminación fecal (Modlin, 2005a).

La frecuencia con la que cada serotipo causa infección puede variar de manera significativa. Algunos serotipos muy prevalentes se aíslan todos los años, mientras que otros pueden surgir o reaparecer tras muchos años de relativa inactividad. En las zonas urbanas, normalmente hay de uno a tres serotipos predominantes cada temporada, que pueden variar entre distintas regiones, ya que sólo ocasionalmente se dan brotes pandémicos por enterovirus (Ej. echovirus 9 a finales de los 50 o conjuntivitis aguda hemorrágica por EV70 o CVA24v en las tres últimas décadas) (Palacios y Oberste, 2005).

No se conocen bien las razones por las que aparecen y desaparecen los distintos serotipos, comportándose de forma endémica o epidémica. Las cepas epidémicas, como echovirus 9, podrían difundirse rápidamente entre la población susceptible, hasta alcanzar un número crítico necesario para la transmisión continuada, mientras que los serotipos endémicos podrían ser menos contagiosos. Las reapariciones periódicas de algunos serotipos se producen porque la nueva cepa es mal neutralizada por anticuerpos desarrollados frente a cepas previas, con variaciones significativas que pueden ser caracterizadas genéticamente.

En la **tabla I.5.** aparecen reflejados los serotipos mayoritariamente aislados entre 1993 y 1996 en áreas diversas como España, Glasgow (Escocia), Túnez y EEUU (Nairn y Clements, 1999; Trallero *et al.*, 2000; Modlin, 2000a; Bahri *et al.*, 2005).

Tabla I.5. Serotipos predominantes de enterovirus (1993-96) en España, Glasgow (Escocia), Túnez y EEUU

Serotipo	% aislamientos			
	España	Escocia	Túnez	EEUU
Echovirus 30	33,4	7,4	3,1	9,5
Echovirus 9	26,3	7,2	1,6	12,7
Echovirus 11	6,0	4,7	2,3	4,5
Echovirus 7	5,7	4,0	0	4,4
Echovirus 5	5,7	1,3	0	-
Echovirus 6	4,2	7,8	4,7	5,1
Poliovirus 1	3,6	9,7	23,4	-
Echovirus 17	1,8	0,2	0	2,7
Coxsackievirus B5	1,5	7,2	1,6	11,5
Echovirus 18	1,5	0,2	0	-
Poliovirus 2	1,5	8,3	13,6	-
Coxsackievirus B1	1,2	4,4	5,5	-
Coxsackievirus B4	1,2	7,6	2,3	4,4
Coxsackievirus B3	0,9	0	0	4,0
Coxsackievirus A9	0,6	11,0	0	6,6
Total	95,1	81,0	58,1	65,4

En los datos estadísticos de la tabla I.5, se observa la gran variabilidad geográfica que presentan los enterovirus. Así, echovirus 30, predominante en nuestro país, circula mucho menos en otros países, y al contrario, algunos coxsackievirus, como A9 ó B5, presentan cifras marcadamente menores en España, que en otros países.

Los serotipos pertenecientes al grupo ECHO representaron en estas cuatro regiones (España, Escocia, Túnez y EEUU), el 88%, 41%, 34% y 42%, respectivamente, es decir, la mayoría de los aislamientos, con excepción del país africano, donde predominaba el aislamiento de poliovirus, ya que hasta 1995 no se interrumpió la transmisión de cepas salvajes.

Las dificultades para el aislamiento de la mayoría de los coxsackievirus A (excepto CVA9 y CVA16), sin duda, infravalora la posible implicación de este grupo de virus en situaciones clínicas. Las infecciones por algunos serotipos, como CVB6, EV68 ó EV69, son poco frecuentes.

Además de la patente variabilidad geográfica, existe una importante variabilidad temporal en esa circulación de enterovirus en cada región. Así hay serotipos que no se suelen apenas detectar, y en un momento dado producen brotes muy significativos. Echovirus 4, por ejemplo, muestra generalmente una prevalencia muy baja, pero en 1990 supuso el 86,2% de enterovirus aislados en Escocia, mientras que en España apareció una temporada más tarde, 32,5% de los enterovirus detectados en 1991 (Nairn y Clements, 1999; Trallero *et al.*, 2000). Algo parecido sucedió en 2000-01 con la eclosión de echovirus 13 como agente etiológico de otro brote de meningitis aséptica, suponiendo el 29,3% de

enterovirus no polio aislados en EEUU en 2001, mientras que en España y el resto de Europa, esa eclosión tuvo lugar un año antes (CDC, 2001).

Sin embargo, en todas estas cifras de vigilancia epidemiológica se observa la presencia constante de unos cuantos serotipos entre los más prevalentes año a año, como son echovirus 6, 7, 9, 11 ó 30, coxsackievirus A9 y B5. En la **tabla I.6** se muestran otros datos de vigilancia epidemiológica, con los serotipos predominantes entre 1993 y 1997 en España, donde se puede constatar esa alta circulación de algunos serotipos durante varios años, como echovirus 5, 6 ó 30. Además se observa que tan sólo 5 serotipos pueden suponer el 69-93% de enterovirus aislados en un mismo año.

Tabla I.6. Enterovirus predominantes entre 1993 y 1997 en España (Trallero *et al.*, 2000)

Año	1º	2º	3º	4º	5º	% del total
1993	E9	E6	E17	E5	PV1	86,5
1994	E30	CVB4	E6	E20	E21	69,0
1995	E7	E30	E5	PV1	E9	87,5
1996	E30	E11	E5	E9	E18	83,7
1997	E6	E30	CVB5	CVA9	E18	92,6

I.5.2. TRANSMISIÓN

El virus en la persona infectada (sintomática o no) es expulsado vía respiratoria y fecal, aunque parece ser más prolongada la emisión de virus desde el tracto gastrointestinal y, por ello, es la ruta fecal-oral la principal vía de transmisión.

A pesar de esto, existen excepciones a lo arriba indicado, ya que ciertos serotipos siguen otras vías de transmisión. La vía respiratorio-oral puede ser de particular importancia en la difusión de poliovirus en entornos con buenas condiciones higiénicas y también en la transmisión de CVA21, causante de infecciones en el tracto respiratorio superior, y probablemente otros coxsackievirus. Por otro lado EV70, agente etiológico de la conjuntivitis hemorrágica aguda, utiliza otros caminos para la extensión de la infección (fomites, dedos, instrumentos oftálmicos contaminados) (Modlin, 2005a).

Además, dada su resistencia a los agentes externos, casi todos los mecanismos de transmisión fecal-oral son posibles (agua potable, piscinas, alimentos contaminados, etc.). Así se ha observado la asociación existente entre el tiempo de baño y la ingestión accidental de agua en una piscina, con el desarrollo de meningitis por echovirus 13 y 30 en Alemania (Hauri *et al.*, 2005). No se han documentado brotes asociados a consumo de marisco.

En el alcantarillado de muchas ciudades se ha comprobado la presencia de distintos serotipos de enterovirus, especialmente en verano. En este sentido, algunos autores han confirmado el paralelismo existente entre los serotipos circulantes en aguas residuales y aquellos detectados infectando a humanos. Este hecho se ha expresado en varios estudios realizados en Wisconsin (EEUU), donde se ha observado que los serotipos más frecuentemente encontrados en las depuradoras cada temporada, coincidían con los más implicados esa temporada en síndromes clínicos (E6 en 1997, E30 en 1998, E11 en 1999, CVB5 en 2000 y E13 en 2001) (Sedmak *et al.*, 2003). Además se podía presagiar qué serotipos iban a estar más implicados clínicamente un verano, por el aislamiento de éstos en aguas residuales durante la primavera (Sedmak *et al.*, 2003). Sin embargo, hay autores que se postulan en contra de este paralelismo al no corresponderse la distribución de serotipos en aguas residuales con la de los pacientes en un estudio llevado a cabo en Finlandia entre 1971 y 1992 (Hovi *et al.*, 1996).

En cuanto a los entornos familiares, algunos estudios han mostrado las altas tasas de infección secundaria en los miembros susceptibles, es decir, aquellos carentes de anticuerpos específicos frente a un determinado serotipo. De esta manera, los poliovirus salvajes, coxsackievirus y echovirus, tienen tasas de infección secundaria del 90-100%, 75% y menos del 50%, respectivamente. El último grupo, al ser eliminado únicamente vía fecal y durante menos tiempo, posee esa menor tasa. Los niños con pañales son la principal fuente de diseminación de enterovirus en la familia, y particularmente son las madres y hermanos más pequeños los más expuestos y por tanto los que tienen mayor riesgo de infección que padres y hermanos mayores. La mayor contagiosidad corresponderá con el período de máxima excreción en heces (Modlin, 2005a).

Cuando se produce una reinfección con el mismo serotipo, la duración de la excreción es significativamente más corta que en la infección primaria (Modlin, 2005a).

El período de incubación puede ser de 2-14 días (normalmente 3-5 días), aunque esto es difícil de determinar ya que la fuente de infección suele ser asintomática y por ello se suele desconocer el tiempo de exposición. La excreción del virus por vía respiratoria y fecal comienza antes del inicio de los síntomas y perdura en heces hasta varias semanas después de remitir éstos. Por tanto, el periodo infectivo es largo, aunque la máxima infectividad parece producirse al iniciarse la enfermedad, cuando la excreción viral es mayor.

I.5.3. PREVALENCIA E INCIDENCIA

Es difícil determinar los datos en cuanto a infecciones producidas por estos virus, ya que se estima que el 95% de infecciones por virus de la polio son asintomáticas, así como el 50-80% de infecciones por el resto de enterovirus. Además, los casos sintomáticos suelen cursar como un síndrome febril sin foco, normalmente acompañado de síntomas respiratorios del tracto superior, indistinguible del ocasionado por otros virus. De hecho, los considerados clásicos síndromes por enterovirus, meningitis aséptica o miopericarditis, son manifestaciones atípicas de la infección.

Al observar la distribución por edad y sexo, podemos indicar que la meningitis aséptica es más frecuente en niños varones (el doble que las niñas), mientras que manifestaciones como la pleurodinia o la miopericarditis aparecen más en adultos jóvenes. Los niños son más susceptibles que las niñas a sufrir la enfermedad, pero no a infectarse (Modlin, 2005a).

Tras la pubertad, aumenta en las mujeres la afectación por la enfermedad, probablemente por su mayor exposición a heces de niños eliminadores de virus. Además el embarazo también parece aumentar la severidad de las infecciones por enterovirus. La incidencia de poliomielitis paralítica se observó que era 2 ó 3 veces más alta en mujeres embarazadas respecto a las que no lo estaban, según un estudio realizado en Boston antes de quedar controlada esta enfermedad (Modlin, 2005a).

Algunos estudios epidemiológicos han relacionado el ejercicio con la aparición y gravedad de estas enfermedades. Este dato ha sido evidenciado en modelos animales ejercitados que sufrían infecciones más severas por coxsackievirus B (Rotbart, 1997).

El análisis serológico de neonatos muestra presencia de anticuerpos maternos que se desaparecen antes de los 6 meses, y a partir de ese momento se produce un aumento progresivo frente a los distintos serotipos estudiados. En población adulta se observa una prevalencia de anticuerpos neutralizantes serotipo específico del 15-90%, según el serotipo y status socioeconómico (Modlin, 2005a).

En los últimos años se han observado algunos serotipos emergentes, E13, E18 ó EV75. Concretamente, E13 ha causado entre 2000 y 2002 numerosos brotes de meningitis aséptica en muy diversos países. Los primeros casos se describieron en Europa (España, Portugal, Francia, Bélgica, Inglaterra,

Alemania, Lituania) a partir de la primavera de 2000, apareciendo esa temporada como primer o segundo serotipo más prevalente, tras E30, en todos esos países (Diedrich y Schreier, 2001; Avellón *et al.*, 2003; Chomel *et al.*, 2003; Pérez *et al.*, 2003; Correia *et al.*, 2004; Narkeviciute y Vaiciuniene, 2004; Thoelen *et al.*, 2004). En 2001, se detectaron los primeros niños afectados por E13 en EEUU (CDC, 2002; Kirschke *et al.*, 2002), mientras que en 2002 se describió en Corea y Japón, la presencia de E13 causante de enfermedad neurológica, cuyo genoma era similar al hallado en los casos descritos en Europa (Cheon *et al.*, 2004; Kobayashi *et al.*, 2005).

Las infecciones por enterovirus tienen una elevada incidencia y prevalencia según se deduce de numerosos estudios, sin embargo, los números exactos se desconocen, ya que el diagnóstico viral sólo se realiza en la investigación de los cuadros sintomáticos, especialmente los más graves.

I.5.4. EPIDEMIOLOGÍA MOLECULAR

Las técnicas de biología molecular como *fingerprinting*, *southern blot* o amplificación y secuenciación del ARN viral mediante PCR han favorecido el desarrollo del campo epidemiológico. El estudio de las secuencias que presentan los distintos aislados de un serotipo a lo largo de un período de tiempo y en distintos lugares, permite detectar de forma fiable las rutas de transmisión de distintos enterovirus o la implicación de cepas vacunales o salvajes en brotes de polio. De esta manera podemos conocer también distintos genogrupos y linajes de un serotipo y su comportamiento epidemiológico.

Así se ha podido conocer la expansión de tres variantes de CVA24v genotipo III causantes de sendos brotes de conjuntivitis hemorrágica en el Este asiático (Taiwan, China, Japón, Tailandia, Singapur) en los períodos 1985-86, 1988-89 y 1990-94 (Lin *et al.*, 1993; Lin *et al.*, 2001). Se ha observado el carácter endémico que presenta este patógeno en esa región, a partir de la cual se han sucedido varias pandemias de este síndrome, el último de ellos en 2002-2004. Los primeros brotes se describieron en junio de 2002 en Malasia (Ghazali *et al.*, 2003), pasando en agosto a Corea (Oh *et al.*, 2003; Park *et al.*, 2006), para meses después aparecer en América Central y del Sur, afectando principalmente a países caribeños (Guayana Francesa, Puerto Rico, México) (Dussart *et al.*, 2005). En España se han detectado también casos en 2004 (Centro Nacional de Microbiología, datos no publicados). Todos los detalles de esta transmisión han sido posibles gracias a la secuenciación del gen VP1 o 3C, ya que este serotipo

no puede ser tipificado con los antisueros clásicos. Además la secuencia de nucleótidos permitió confirmar la reintroducción de esta cepa en Occidente, procedente del Sureste asiático, como ha sucedido en varias ocasiones desde 1970.

También se ha podido observar la reintroducción de una cepa epidémica de coxsackievirus B5 en 1983 en EEUU, que había permanecido durmiente desde otro brote en 1967 (Hamby *et al.*, 1987). Los patrones epidemiológicos de E30 y EV71 han sido también ampliamente estudiados mediante esta metodología, principalmente a través de la secuenciación del gen VP1, describiendo los diferentes genotipos circulantes en distintos países y su asociación con brotes de meningitis aséptica o enfermedad mano-pie-boca, respectivamente (Brown *et al.*, 1999; Palacios *et al.*, 2002). Anteriormente hemos comentado algunas características epidemiológicas de los brotes de meningitis aséptica asociados a E13 entre 2000 y 2002, así como el posible origen europeo de la cepa circulante, al ser comparada con los aislamientos realizados en Corea y Japón (Cheon *et al.*, 2004).

La secuenciación del genoma viral ha demostrado ser el mejor método para caracterizar los aislados y determinar las relaciones epidemiológicas dentro de un serotipo. Se han ensayado distintas regiones del genoma, VP1, VP4, ARN polimerasa, aunque parece ser el fragmento codificante para la proteína VP1 en su porción 5' ó 3' el que mejor define las diferencias entre cepas. Cuando existe una divergencia mayor del 15% entre las secuencias de ARN de un mismo serotipo se considera un genotipo distinto, si la diferencia entre secuencias sobrepasa el 25% se trata de serotipos distintos (Oberste *et al.*, 1999; Modlin, 2005a).

I.6. TRATAMIENTO Y PROFILAXIS

I.6.1. TRATAMIENTO

La mayoría de infecciones por enterovirus son autolimitadas y no requieren terapia antiinfecciosa. Algunas excepciones son aquellos procesos que pueden amenazar la vida del paciente, miopericarditis, infecciones neonatales y las que se producen en individuos inmunodeficientes. Los tratamientos frente a este tipo de virus son bastante limitados. Se han empleado inmunoglobulinas en algunas de esas situaciones más graves, con resultados discrepantes (Modlin, 2005c).

Hasta el momento no existe ninguna sustancia aprobada para el tratamiento de infecciones serias por enterovirus. Sin embargo, se han descrito varios antivirales que en modelos animales y algunos ensayos clínicos han mostrado resultados prometedores. Los compuestos más esperanzadores son un grupo de agentes que se unen al hueco hidrofóbico de la cápsida, capaces de alterar los procesos de fusión y pérdida de esa envoltura proteica viral, esenciales en el proceso infectivo (Racaniello, 2001; Rotbart y Webster, 2001).

El **pleconaril** es el compuesto de ese grupo mejor estudiado, presentando unas características farmacocinéticas (administración oral) y de toxicidad adecuadas, y es capaz de atenuar la meningitis aséptica en niños y adultos, siendo activo frente al 90% de serotipos en concentraciones serológicas $< 0,1 \mu\text{g/mL}$ (Sawyer, 1999). Ensayos clínicos con grupos placebo control han mostrado reducciones significativas en la duración y severidad de la cefalea y otros síntomas, además de un periodo más corto de eliminación del virus en heces cuando la droga era administrada dentro de las primeras 24 h de sintomatología. También se ha utilizado de forma aislada, fuera de ensayos controlados, para tratar pacientes inmunodeficientes con infección persistente, niños y adultos con miopericarditis y poliomiелitis asociada a cepa vacunal (Modlin, 2005c).

La administración de inmunoglobulina preexposición reduce el riesgo de desarrollar poliomiелitis paralítica y probablemente otras enfermedades producidas por EVNP, pero esta estrategia es poco aplicable en la práctica clínica (Lin *et al.*, 2003).

I.6.2. PREVENCIÓN

Ante una situación epidémica en una comunidad o de un paciente hospitalizado con enfermedad enteroviral, se deben cuidar las medidas higiénicas más

simples, como el lavado de manos y eliminación de residuos, incluso autoclavándolos, si están contaminados con heces o secreciones. El uso de mascarillas o el aislamiento del paciente no suelen estar justificados, aunque algunos autores recomiendan aplicar esta medida para evitar brotes nosocomiales entre pacientes recién nacidos, a la vez que se extremen las medidas higiénicas por parte de madres y personal sanitario (Magnius *et al.*, 1990).

I.6.2.1. Vacunas anti-polio

El exponente terapéutico más importante frente a las infecciones por enterovirus lo constituyen las dos vacunas desarrolladas frente al virus de la polio a finales de los 50 y principios de los 60. Estas vacunas han logrado la erradicación de la enfermedad en el continente americano y europeo, centrándose actualmente la política de inmunización en los países subdesarrollados africanos y asiáticos. El número mundial de casos de poliomielitis ha pasado de más de 350000 en 1988 a 918 en 2004. A principios de 2006 únicamente había 4 países con poliovirus salvaje circulando, Afganistán, India, Nigeria y Pakistán, tras controlarse el paso del virus desde el norte de Nigeria hasta varios países de su entorno. En la actualidad hay tres regiones certificadas por la OMS como libres de circulación de poliovirus salvaje, América en 1994, Pacífico Occidental en 2000 y Europa en 2002. Las estrategias para conseguir la erradicación mundial, se basan en mantener alta la cobertura de inmunización y vigilar las infecciones que se produzcan por poliovirus (Trallero *et al.*, 2006).

Existen dos vacunas para prevenir la infección por poliovirus. Por un lado, disponemos de la constituida por el **virus inactivado (Salk)** de administración parenteral, introducida en 1955, que redujo de forma drástica e inmediata las tasas de infección cuando se comenzó a utilizar. Por otro lado, tenemos la integrada por el **virus atenuado (Sabin)** de administración oral, aprobada unos años más tarde (1962), de uso común en el tercer mundo por su fácil utilización y posibilidad de inmunización colectiva a través de los individuos vacunados. En los comienzos, además, la vacuna de Sabin mostraba una mayor inmunogenicidad que la vacuna de Salk. Un estudio realizado en 1959 mostraba que hasta un 17% de niños con poliomielitis habían sido vacunados con el virus inactivado (Modlin, 2005b).

La única desventaja de la cepa Sabin es la esporádica, pero grave posibilidad de producir poliomielitis paralítica asociada a la vacuna, por reversión de la cepa

vacunal a salvaje (habitualmente por el serotipo 3 ó 2). Este síndrome afecta a 1 de cada 2,6 millones de dosis administradas, apareciendo en individuos recientemente vacunados y en un 25% de inmunodeprimidos. Por tanto, en lugares donde ha quedado erradicada la enfermedad y los riesgos de la vacuna oral sobrepasan las ventajas de ésta, se ha reintroducido la vacuna inactivada, más inmunogénica para la inmunización de la población. En España, se aplicó este cambio en enero de 2004 y anteriormente en otros países.

I.7. ANTECEDENTES DEL TEMA EN ESPAÑA

En España se han realizado un importante número de estudios en las distintas vertientes de la infección por enterovirus.

En el campo de la **epidemiología**, Trallero y colaboradores hicieron una descripción muy completa de los serotipos circulantes en nuestro país entre 1988 y 1997 (Trallero *et al.*, 2000), mientras que Moral Gil y colaboradores hicieron lo propio en el periodo 1984-1991 (Moral Gil *et al.*, 1993).

Además el grupo de investigación del Centro Nacional de Microbiología (CNM), coordina la **vigilancia** en España de los casos de **parálisis flácida aguda** (Bernal *et al.*, 1987; Avellón *et al.*, 2004; Trallero *et al.*, 2006) que inicialmente se llevan a cabo en una red primaria de 9 laboratorios, entre los que se encuentra el Laboratorio de Microbiología del Hospital Virgen de las Nieves (Granada). Durante la vigilancia realizada entre 1998 y 2003, se detectaron 196 aislamientos de poliovirus vacunales y ninguno salvaje. Entre ellos se descubrieron dos casos de PFA asociados a la vacuna oral (Trallero *et al.*, 2006). Actualmente, no se utiliza ya la cepa atenuada para la inmunización de los niños, por lo que cualquier aislamiento de polio es significativo. Además, nuestro país, por su situación geográfica, puede ser puerta de entrada de cepas salvajes y dar lugar a casos importados, por lo que es importante mantener una vigilancia continuada de los casos diagnosticados de PFA.

Otros centros españoles han comunicado **datos clínicos** relacionados con la infección por enterovirus en grupos de pacientes varios, trasplantados de médula ósea (González *et al.*, 1999), pediatría (Rubio *et al.*, 1998) o pacientes adultos (Martínez-Martín *et al.*, 1990).

Algunas descripciones de brotes asociados a **serotipos epidémicos** también pueden ser encontrados en la bibliografía; E13 y E30 en 2000 (de la Loma *et al.*, 2002; Pérez *et al.*, 2003; Trallero *et al.*, 2003), E30 en invierno de 1997 en Cabra (Córdoba)

(López Alcalá *et al.*, 1997) y E9 en 1993 en Burgos (Cobos *et al.*, 1994). Algunos autores resaltan la alta circulación de enterovirus en algunas zonas de España en la primavera (Lasarte Velillas *et al.*, 1992; Valdezate *et al.*, 1998).

En el campo **diagnóstico**, se han realizado numerosas investigaciones relacionadas con el crecimiento enteroviral en **cultivo celular** tradicional o *shell vial*, utilizando diferentes líneas celulares (Sanchís y Bayarri, 1963; Olivares, 1974; Pinto *et al.*, 1994; Reina *et al.*, 2000; Otero *et al.*, 2001; Pérez-Ruiz *et al.*, 2003). Esos estudios, al igual que el nuestro, permiten mejorar el diagnóstico de las infecciones por enterovirus, facilitando la utilización de líneas celulares heteroploides, de sencillo mantenimiento en el laboratorio y, de este modo, no tener que recurrir a la utilización de células primarias o animales de experimentación.

Además, el equipo de trabajo del CNM ha desarrollado algunas **técnicas de biología molecular** para mejorar el diagnóstico clínico (Casas *et al.*, 1995; Casas *et al.*, 1997; Casas *et al.*, 1999) o posibilitar la tipificación molecular de los enterovirus (Casas *et al.*, 2001). El desarrollo de estas técnicas de ácidos nucleicos ha permitido la realización de estudios de **epidemiología molecular** relacionados con diferentes serotipos circulantes en España, E13 (Avellón *et al.*, 2003), E30 (Palacios *et al.*, 2002) ó EV75 (Avellón *et al.*, 2006).

II. OBJETIVOS

II. OBJETIVOS:

En el marco de los antecedentes expuestos en el capítulo de Introducción, se ha planteado el trabajo experimental de la presente Tesis, proponiendo los siguientes objetivos.

1. Estudio clínico-epidemiológico de la infección por distintos serotipos de enterovirus en nuestro medio.
2. Optimización de las técnicas de cultivo celular para el diagnóstico de infecciones por enterovirus.

El conocimiento del tipo de paciente infectado y de los serotipos circulantes en nuestro medio a lo largo del tiempo nos permitirá mejorar el diagnóstico clínico de estos síndromes, así como comprender el comportamiento de estos virus en el ambiente, de forma que se puedan adoptar medidas concretas en momentos de alta actividad. Por otro lado, la utilización de nuevas técnicas para el estudio *in vitro* de estos agentes o la combinación de éstas con ensayos tradicionales nos pueden permitir mejorar la sensibilidad y especificidad de los estudios diagnósticos que se llevan a cabo diariamente en un laboratorio de Microbiología hospitalario.

III. MATERIAL Y MÉTODOS

III.1. Estudio clínico-epidemiológico

III.1.1. Pacientes y muestras

El estudio realizado se trata de un modelo **observacional descriptivo**, una aproximación basada en la experiencia clínica de un grupo de pacientes diagnosticados de infección por enterovirus. A partir de ellos podemos obtener información precisa de este cuadro, identificar antecedentes de los pacientes y características inusuales de esta enfermedad, así como lanzar hipótesis sobre la misma (Perea-López, 1998).

En el estudio se incluyen los pacientes en que se aisló enterovirus en alguna de las muestras clínicas que les fueron recogidas para realizar el diagnóstico virológico. Éstas fueron muy variadas, en función del síndrome clínico asociado. En términos generales se recogieron las muestras clínicas mostradas en la tabla III.1 en las distintas enfermedades.

Tabla III.1. Muestras adecuadas para el cultivo de enterovirus en los distintos síndromes clínicos investigados

Enfermedad	Muestra para cultivo viral
Meningitis	Líquido cefalorraquídeo (LCR) Heces Exudado faringoamigdalario (EFA)
Síndrome respiratorio	EFA Aspirado nasofaríngeo (ANF)
Exantema	Líquido vesicular Heces EFA
Parálisis Fláccida Aguda (PFA) (Protocolo erradicación mundial poliomielitis)	LCR Heces
Miopericarditis	Líquido Pericárdico EFA Heces
Otros síndromes	Heces, EFA, Escarificado de lesión

Las muestras de líquido vesicular o aquellas tomadas con escobillón fueron enviadas al laboratorio en medio de transporte adecuado para virus (Medio Mínimo Esencial suplementado con 1% albúmina bovina y antibióticos), mientras que el resto llegaron en contenedor estéril, sin aditivos. El procesamiento se realizó, siempre que fue posible, el día de su recepción en el laboratorio. De lo contrario, se conservaron refrigeradas a 4°C un máximo de 72 h ó congeladas a -80°C si había una demora superior.

El trabajo se llevó a cabo en la Unidad de Virología del Servicio de Microbiología del Hospital Universitario Virgen de las Nieves (Granada), durante el período que abarca desde marzo de 1985 hasta julio de 2006. Este centro forma parte desde 1998 de la Red de Laboratorios para el Plan de Erradicación de la Poliomielitis en la Vigilancia de PFA.

III.1.2. Métodos de diagnóstico

III.1.2.1. Aislamiento en cultivo celular

Para el aislamiento de los enterovirus, la muestra era inoculada en diferentes líneas celulares para permitir el crecimiento de los distintos serotipos de enterovirus o cualquier otro agente vírico implicado en el proceso infeccioso. La búsqueda específica de enterovirus se llevó a cabo mediante la inoculación de la muestra en tres líneas celulares heteroploides: Hep-2 (carcinoma de laringe), Vero (riñón de mono verde africano) y RD (rabdiosarcoma, desde el año 1996); y una línea celular diploide: MRC-5 (fibroblastos de pulmón humano).

La línea MRC-5 era suministrada comercialmente cada 15 días (Biomerieux, Paris) y mantenida en Medio Mínimo Esencial de Eagle (MEM -*Minimal Essential Medium*-), suplementado con 20% de suero fetal bovino (SFB) y una mezcla antibiótica utilizada en todos los medios de cultivo celular (Gentamicina 10 µg/mL, Vancomicina 50 µg/mL y Anfotericina B 1,2 µg/mL). Mientras que las restantes líneas celulares, fueron suministradas originalmente por el Centro Nacional de Microbiología (CNM) y mantenidas indefinidamente en nuestro laboratorio mediante pases semanales, tripsinizando y utilizando MEM suplementado con 10% de SFB y la mezcla antibiótica como medio de crecimiento.

Cada semana se preparaban tubos de cada línea celular con una concentración de 150000 células/mL, que una vez crecidas eran mantenidas en MEM con 1% de SFB (Vero y MRC-5) o sin SFB (RD y Hep-2) hasta su utilización. Siempre se utilizaban tubos de pase reciente (inferior a 7 días), para la inoculación de las muestras.

Las muestras procedentes de áreas corporales no estériles (heces, aspirado de vesículas, ANF, EFA, orina, etc.) se trataban durante 30 minutos a 4°C con 10% de solución antibiótica (Gentamicina 4 mg/mL, Vancomicina 5 mg/mL y Anfotericina B 25 µg/mL) antes de su inoculación en las diferentes líneas para impedir la contaminación de las mismas.

De cada muestra se inoculaban 200 μ L en cada uno de los tubos de cultivo celular. Para ello, se retiraba el medio de mantenimiento de los tubos, se depositaba la muestra sobre la monocapa y se dejaba adsorber durante 90 minutos a 37°C. Posteriormente, se añadían a cada tubo 2 mL del medio de inoculación, MEM suplementado con 1% de SFB. Las muestras así procesadas, se incubaban a 37°C durante 14 días, en gradillas que mantenían una inclinación de 15°, para mantener bañada toda la monocapa con el medio.

Los tubos inoculados eran visualizados diariamente para la detección del efecto citopático (ECP) característico. En general, el ECP producido por los enterovirus se manifestaba 3-10 días tras su inoculación, con destrucción generalizada de la monocapa.

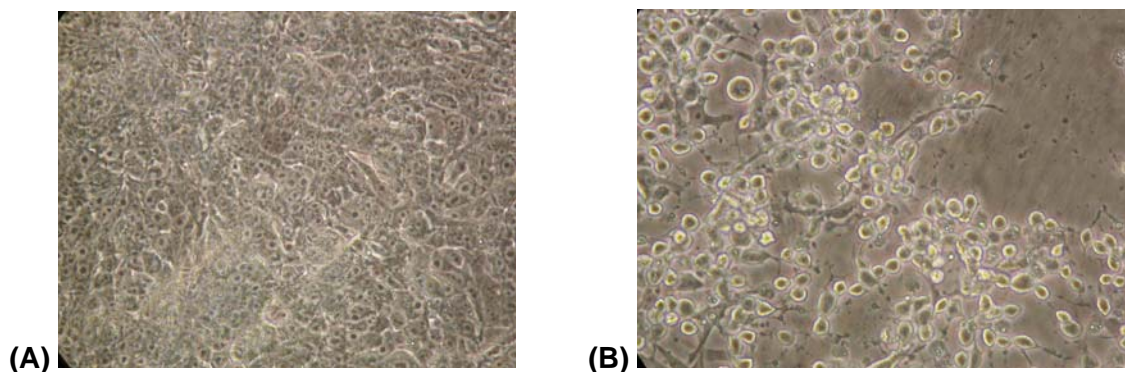


Figura III.1. Línea celular RD. (A) Aspecto normal sin infectar; (B) Efecto citopático característico producido por el crecimiento de enterovirus.

Tras el aislamiento de los virus, los sobrenadantes de los cultivos infectados fueron congelados a -80°C o en nitrógeno líquido para los estudios posteriores.

III.1.2.2. Identificación del enterovirus

Una vez detectado el ECP característico de los enterovirus, se confirmaba la identificación mediante inmunofluorescencia indirecta, pruebas físico-químicas o técnicas de biología molecular.

III.1.2.2.1. Inmunofluorescencia indirecta (IFI) para identificación de enterovirus a partir de líneas celulares infectadas.

Preparación de extensiones

Se disgregaban las células de la pared del tubo con una pipeta Pasteur de plástico sin tirar el medio de cultivo y se pasaba a un tubo de microcentrífuga. A continuación se centrifugaba a 13000 rpm durante 10 minutos. Tras decantar el sobrenadante se resuspendían las células del sedimento en 1 mL de PBS

pH=7,2 (PBS 7,2) y se volvía a centrifugar en las condiciones anteriores. Posteriormente se descartaba el sobrenadante y se resuspendían las células en 200 μ L de PBS 7,2. Finalmente, en un portaobjetos multipocillos para fluorescencia, se depositaban 10 μ L de la suspensión de células preparada. Tras dejar secar a temperatura ambiente, se fijaba con acetona a -20°C durante 10 minutos, colocando los portas en un vaso de Koplík.

Tinción: Inmunofluorescencia Indirecta

Se depositaban 10 μ L del anticuerpo monoclonal sin marcar dirigido frente a la proteína VP1 de enterovirus o anticuerpo pan-enterovirus (clone 5-D8/1; Dako, Glostrup, Denmark) obtenido en ratón. Se incubaba durante 30 minutos a 37°C en cámara húmeda. Posteriormente, se lavaba en agitación ligera con PBS 7,2 durante 10 minutos y se dejaba secar al aire. En un segundo paso, se añadían 10 μ L de anti IgG de ratón (FITC Anti-Mouse IgG, Biomedica Corp, Foster City, CA) marcada con fluoresceína diluida 1/20 en azul de Evans (Azul de Evans 1/10000 en PBS 7,2) y se incubaba igual que en el primer paso, 30 minutos a 37°C en cámara húmeda. Finalmente, se lavaba con agitación en PBS durante 10 minutos y se dejaba secar, se añadía glicerina tamponada y se colocaba un cubreobjetos para observar en el microscopio de fluorescencia a 400x.

Interpretación

Las células positivas (infectadas) mostraban fluorescencia puntiforme fundamentalmente citoplasmática, mientras que las células negativas se podían observar rojas de modo uniforme, como se aprecia en la figura III.2.

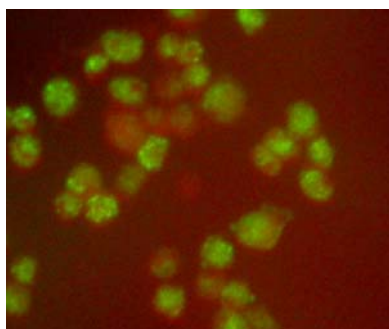


Figura III.2. Inmunofluorescencia Indirecta (IFI) positiva frente a la proteína VP1 de enterovirus sobre la línea celular RD

III.1.2.2.2. Pruebas Físico-químicas

Si la IFI resultaba negativa o dudosa, se realizaba la identificación mediante pruebas físico-químicas. Se emplearon tres pruebas para evidenciar la presencia de enterovirus en los cultivos celulares infectados. Se comprobaba que era un virus ARN (resistente al tratamiento con 5-bromo-2-desoxiuridina), desnudo (insensible al cloroformo) y resistente al pH ácido.

III.1.2.2.2.i. Inhibición de virus ADN con 5-bromo-2-desoxiuridina

Los virus ADN se inactivan por la acción de 5-bromo-2-desoxiuridina (BDU) mientras que los virus ARN son resistentes a este tratamiento.

Para la realización de esta prueba se preparaba inicialmente una placa de 96 pocillos de fondo plano con las células en las que el virus crecía mejor. En cada pocillo de la placa se repartían 200 μ L de la suspensión celular en MEM con 1% de SFB a una concentración de 150000 células/mL. La placa se sellaba con parafina para evitar contaminaciones, así como la evaporación del medio de crecimiento y se incubaba a 37°C en atmósfera con 5% CO₂ durante 24-48 horas. Una vez formada la monocapa celular se cambiaba el medio de crecimiento por MEM sin SFB (medio de mantenimiento).

Como control de crecimiento se usaba un virus ADN (virus herpes simplex tipo 1 –VHS1-) y como control negativo un virus ARN (poliovirus 3 vacunal cepa Sabin –PV3-).

Realización de la técnica:

- **Preparación de tubos y diluciones.** Se ponían en una gradilla, para cada virus control o problema a inocular, 2 series de 4 tubos estériles. Rotulábamos la primera serie (N: normal) con el número de aislamiento o control y N1, N2, N3 y N4, respectivamente. La otra serie (D: desoxiuridina) se designaba de forma análoga, con el número de aislamiento o control, y D1, D2, D3 y D4, respectivamente. El esquema de tubos era el siguiente:

N1	D1	N1	D1	N1	D1
N2	D2	N2	D2	N2	D2
N3	D3	N3	D3	N3	D3
N4	D4	N4	D4	N4	D4
Herpes		Poliovirus		Virus problema	

Preparábamos una solución de BDU 40 µg/mL en MEM suplementado con 1% de SFB.

Colocábamos 0,9 mL de MEM suplementado con 1% SFB en todos los tubos de la serie N, y 0,9 mL de solución BDU en los de la serie D.

Dispensábamos 0,1 mL del sobrenadante del cultivo del virus problema y de los controles en sus respectivos tubos N1 y D1, y realizábamos diluciones seriadas desde 10^{-1} hasta 10^{-4} (tubos N2, N3, N4 y D2, D3, D4)

- **Inoculación en placa de microtiter con línea celular adecuada:** se rotulaban pocillos para cada tubo preparado anteriormente. Se retiraba el medio de cultivo de todos los pocillos seleccionados e inoculábamos 200 µL de cada dilución preparada previamente.

Tras sellar la placa con parafina incubábamos en estufa de CO₂ hasta que se detectase crecimiento del virus (al menos 48 horas).

- **INTERPRETACIÓN:** si el virus problema era un enterovirus, éste no se inactivaría y crecería por igual en las dos series, con y sin tratamiento de BDU. Mientras que los virus ADN, no crecerían o lo harían en diluciones más bajas de BDU frente a los pocillos sin tratar.

III.1.2.2.2.ii. Tratamiento con cloroformo

Distingue virus envueltos (con cubierta lipídica) de virus desnudos, ya que el cloroformo disuelve la cubierta lipídica de los virus envueltos, inactivándolos.

Para la realización de esta prueba, se usaba un control de crecimiento (PV3) y como control negativo, un virus envuelto (VHS-1).

Realización de la técnica:

- Se homogeneizaba con pipeta Pasteur estéril el tubo de células en el que había crecido el virus a identificar, así como los controles. Se preparaban 2 mL de una dilución 1/10 de los virus problema y control, diluyendo la suspensión inicial (0,2 mL) en MEM con 1% SFB (1,8 mL).

- En un tubo de cristal, se trataba 1 mL de esa dilución con 0,05 mL de cloroformo, agitábamos vigorosamente durante 10 minutos y se centrifugaba a 35 g durante 5 minutos.

- Se seleccionaban 3 tubos con la línea celular adecuada para cada muestra y para cada control, se retiraba el medio de mantenimiento y se sustituía por 2 mL de MEM suplementado con 1% de SFB. Estos 3 tubos se identificaban como **tratado**, **sin tratar** y **control de células**, respectivamente.

- En el tubo *sin tratar*, se inoculaban 200 µL de la dilución 1/10 inicial de los virus sin tratar. En el tubo *tratado* se inoculaban 200 µL de la fracción superior acuosa resultante de centrifugar el tubo de cristal con cloroformo, y en el *control de células* no se inoculaba nada.

- Se incubaban los tubos a 37°C. Al cabo de unos días aparecería ECP en los tubos sin tratar, el control de células debía permanecer inalterado y se observaría el desarrollo o no de ECP en los tubos tratados.

- **INTERPRETACIÓN:** si se trataba de un virus envuelto, no se produciría ECP en el tubo inoculado con la suspensión viral tratada con cloroformo. Si por el contrario, era un virus desnudo sí se observaría ECP, ya que el cloroformo no habría inactivado el virus. Además se debía comprobar que el control positivo (PV-3) mostraba ECP en el tubo tratado, mientras que el control negativo (VHS-1) quedaba inactivado y no crecía.

III.1.2.2.2.iii. Crecimiento en pH ácido

Distingue enterovirus (resistentes a pH ácido) de rinovirus y otros virus sensibles a este pH. Como controles positivo y negativo, utilizábamos los nombrados anteriormente, PV-3 y VHS-1, respectivamente.

Realización de la técnica

- En primer lugar se preparaba MEM a pH 2,2. Para ello, al MEM sin ningún tampón, se le añadía HCl 1 N hasta ajustar el pH a 2,2.

- Se mezclaba en tubo estéril 0,1 mL de suspensión de células infectadas por el virus problema con 0,9 mL de MEM pH 2,2 e incubábamos a temperatura ambiente al menos 10 minutos (dilución 1/10 del **virus tratado**). En otro tubo se colocaban 0,1 mL de células infectadas con 0,9 mL de MEM 1% (dilución 1/10 del **virus sin tratar**). Esto mismo se realizaba con los controles positivo y negativo, PV-3 y VHS-1, respectivamente.

- Se seleccionaban 3 tubos con línea celular adecuada para cada virus (en total 9 tubos), se retiraba el medio de mantenimiento y se sustituía por 2 mL de

MEM suplementado con 1% de SFB. Esos 3 tubos se identificaban como ***tratado, sin tratar y control de células.***

- En el tubo *sin tratar*, se inoculaban 200 µL de la dilución 1/10 del virus sin tratar. En el tubo *tratado* se inoculaban 200 µL de la suspensión del virus mantenida a pH 2,2, y en el *control de células* no se inoculaba nada. Esto se realizaba para los tres virus, problema, control positivo y control negativo.

- Se incubaban los tubos a 37°C. Al cabo de unos días aparecería ECP en el tubo sin tratar, el control de células debía permanecer inalterado y se observaría el desarrollo o no de ECP en los tubos tratados.

- **INTERPRETACIÓN:** en un virus resistente al pH ácido (enterovirus) se observaba ECP en el tubo inoculado con la suspensión de células tratada con MEM pH 2,2. Si el virus era sensible al pH ácido, sólo se producía ECP en el tubo sin tratar. Los controles positivo (PV-3) y negativo (VHS-1) debían mostrar presencia y ausencia de crecimiento, respectivamente, en los correspondientes tubos tratados.

III.1.2.2.3. Diagnóstico molecular

Desde enero del año 2005, se implantaron técnicas de biología molecular para detectar la presencia de enterovirus en cultivos celulares. Estas pruebas se realizaban a los cultivos que no mostraban ECP, antes de ser descartados como negativos, o en aquellos con ECP, en los que la IFI y/o las pruebas físico-químicas no eran concluyentes.

Concretamente, se aplicaron dos técnicas de amplificación de ácidos nucleicos, una RT-PCR en tiempo real y una RT-nested PCR.

III.1.2.2.3.i. Extracción de ácidos nucleicos

Se utilizó para este primer paso el kit comercial QIAamp Viral RNA de QIAGEN (Hilden, Alemania), realizándose la técnica siguiendo las instrucciones del fabricante.

Este método está basado en el uso de centrifugación y el empleo de membranas de sílica gel capaces de unir selectivamente ARN. La lisis de la muestra se realizaba bajo condiciones desnaturalizantes para inactivar las RNAasas. Para aumentar el rendimiento de la extracción, el buffer de lisis incluía un *carrier* de ARN.

El proceso reflejado en la figura III.3, constaba de un primer paso de lisis de la muestra. Para ello, en un tubo de microcentrífuga de 1,5 mL, se colocaban 560 μ L del tampón de lisis (AVL) y 140 μ L de muestra o sobrenadante de cultivo, se agitaba e incubaba durante 10 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se añadían 560 μ L de etanol y se transfería toda la mezcla a la columna Qiamp. Se centrifugaba durante 1 minuto a 6000 g y ya teníamos el ácido nucleico unido a la columna. A continuación, se realizaban dos lavados consecutivos con los tampones AW1 y AW2, añadiendo en cada paso 500 μ L de cada uno a la columna y centrifugando. Finalmente, el ARN se eluía con 60 μ L de tampón AVE, añadiendo éste a la columna y centrifugando.

El líquido obtenido contenía el ARN extraído y purificado, que se conservaba a 4°C hasta su procesamiento antes de 24 h, o a -80°C si la amplificación no se realizaba antes de ese tiempo.

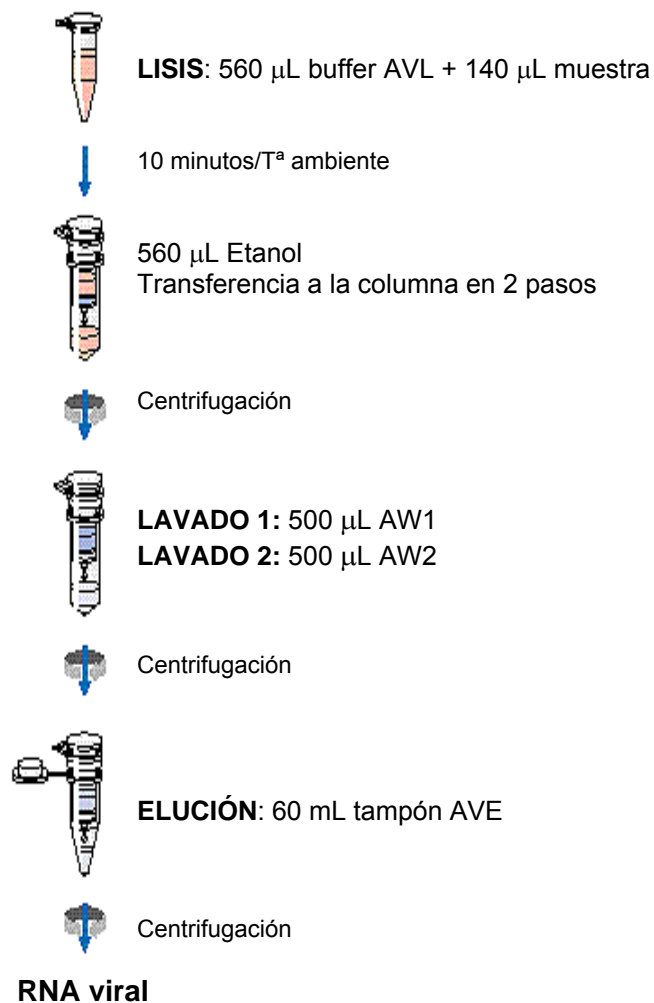


Figura III.3. Esquema de extracción del ARN viral

III.1.2.2.3.ii. Retrotranscripción

Para la amplificación del ARN enteroviral a partir del material extraído, había que transformar previamente el ARN en ADN complementario (ADNc), mediante un proceso de retrotranscripción (RT) o transcripción inversa.

El protocolo de RT requería que 22 μ L de los ácidos nucleicos extraídos se añadieran a 18 μ L de mezcla de RT, compuesta por: agua libre de nucleasas, Buffer de RT 1X (10mM Tris-HCl, 50mM KCl, 0,1% Triton® X-100), $MgCl_2$ 4 mM, dNTPs 1 mM, pdN₆ *Random Primers* 1,25 mM, Inhibidor de Ribonucleasas RNAsin 20U y Transcriptasa Inversa del virus de la mieloblastosis aviar (AMV) 10U (Promega Corporation, Madison, WI, EEUU). Esta mezcla se incubaba a 37°C, durante 60 minutos, para generar el ADNc, seguido de 10 minutos a 95°C, para inactivar el enzima. El proceso se llevaba a cabo en un termociclador GeneAmp®, PCR System 9700, Applied Biosystems.

III.1.2.2.3.iii. RT-PCR en Tiempo Real

Para la amplificación del ARN enteroviral a partir del material extraído, se empleó como primera opción una técnica de PCR en tiempo real tras el proceso inicial de retrotranscripción, usando un agente intercalante como el SYBR Green I para la detección del ADN amplificado. La pareja de *primers* utilizados en este test fueron desarrollados por Rotbart et al (Rotbart *et al.*, 1994) y estaban dirigidos hacia la región conservada no codificante 5'NTR. Estos cebadores, con capacidad de amplificación de la mayoría de serotipos de enterovirus, eran los siguientes:

<i>Primer</i>	Secuencia	Posición ^a	Polaridad
EV1	5' GGCCCCTGAATGCGGCTAAT 3'	449-468	Sentido
EV2	5' CAATTGTCACCATAAGCAGCCA 3'	576-597	Antisentido

^a Posiciones relativas de los primers en poliovirus 1 (cepa Mahoney)

El proceso de amplificación y detección en tiempo real fue llevado a cabo en Lightcycler (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania). Para ello, se inoculaban 4 μ L del ADNc obtenido previamente junto a 16 μ L de mezcla de reacción en cada capilar. Los componentes de la mezcla de PCR eran los siguientes: agua libre de nucleasas, $MgCl_2$ 4mM, 10 pmol *primer* EV1, 10 pmol *primer* EV2 y 2 μ L del reactivo Master Mix SYBR green I (LightCycler® FastStart DNA Master PLUS SYBR Green I, Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania). El protocolo utilizado en esta PCR permitía detectar el genoma viral y determinar la temperatura de fusión de los productos de

amplificación (T_m : *temperatura melting*) en un tiempo de 50 minutos. Este proceso incluía los siguientes tiempos y temperaturas de incubación:

Desnaturalización inicial		95°C/10min
Activación		
Amplificación (45 ciclos)	Desnaturalización	95°C/5seg
	Hibridación	60°C/10seg
	Elongación	72°C/10seg
Determinación T_m		40-95°C (0,1°C/seg)
Enfriamiento final		30°C

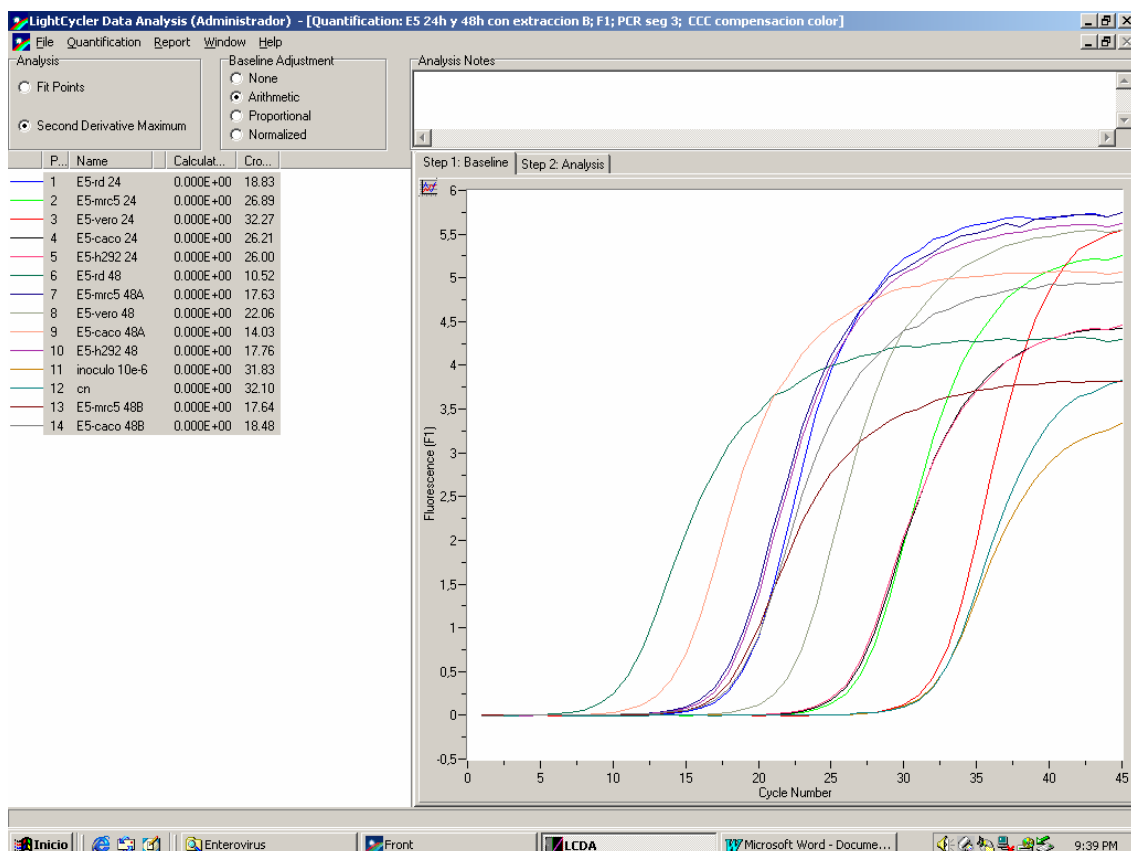


Figura III.4. RT-PCR en tiempo real utilizando la tecnología SYBR green I. Ensayo de evaluación de replicación de echovirus 5 en cinco líneas celulares tras 24 h y 48 h de incubación en *shell vial*.

INTERPRETACIÓN

El proceso de cuantificación de la fluorescencia indicaba el ciclo a partir del cual se detectaba positividad en el proceso de amplificación. Sin embargo, la inespecificidad en la unión del SYBR green I al producto de amplificación, hacía necesario el estudio de las curvas de T_m para la confirmación de una muestra como positiva. Concretamente, la T_m de nuestro producto de amplificación se situaba entre 87-90°C, ya que ésta podía variar para los distintos serotipos de enterovirus, pero

nunca por debajo de ese valor. En la figura III.5, se observa la T_m de nuestro producto amplificado a 87°C , mientras que aparecen otros productos, como dímeros de *primers*, con T_m en torno a 80°C , en las muestras negativas, lo cual nos permitía descartar también una inhibición de la PCR en esos casos negativos.

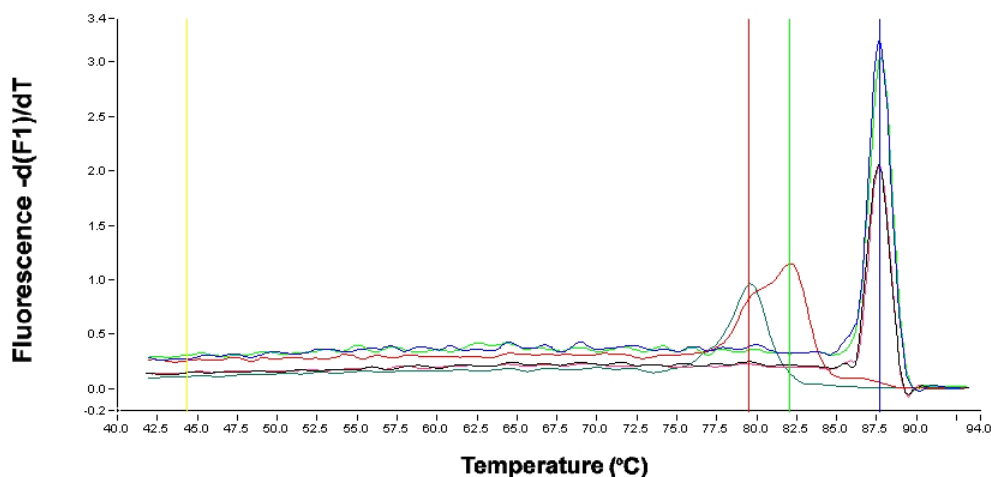


Figura III.5. Temperaturas de fusión (T_m) de los productos de amplificación en la RT-PCR en tiempo real de enterovirus

Además, en caso de duda, se comprobó también el resultado de la amplificación mediante electroforesis en gel de agarosa 2,5% con 0,5 mg/mL de bromuro de etidio, preparado con tampón TBE 1x (Tris-Bórico-EDTA). Para ello, se recuperaban los productos de los amplicones desde sus capilares y se colocaban 8 μL de cada amplicón junto con 1 μL de buffer de carga en cada pocillo, además de un marcador de pesos moleculares. Posteriormente se analizaba el gel bajo luz UV. El tamaño de banda de nuestro producto de amplificación contenía aproximadamente 146-150 pb, según el serotipo implicado.

De esta forma, con el valor de T_m y la visualización de la banda de electroforesis, se podía confirmar la detección inespecífica que a veces se producía.

III.1.2.2.3.iv. RT-Nested PCR 5'NTR

Se optimizó una segunda alternativa de detección del genoma de enterovirus mediante un método de PCR clásica, cuyo producto de reacción podía ser además secuenciado, para conocer la especie de enterovirus implicada (Poliovirus, EV-A, EV-B, EV-C, EV-D). Esta técnica fue optimizada en nuestro laboratorio a partir de trabajos publicados (Casas *et al.*, 1997).

El proceso de RT se realizó de la manera descrita anteriormente (apartado III.1.2.2.3.ii.). Sin embargo, la amplificación del ADNc generado, se llevó a cabo mediante una nested PCR, utilizando una pareja externa de *primers* en la primera reacción (EV1+ *-sense-* y EV1- *-antisense-*) y otra pareja de oligonucleótidos en la segunda reacción (EV2+ *-sense-* y EV2- *-antisense-*). Todos ellos hibridaban, como en la PCR en tiempo real, en la región 5' conservada no codificante (5'NTR). Los cebadores utilizados fueron los que se detallan a continuación.

Primer	Secuencia	Posición^a	Polaridad
EV1+	5' CGGTACCTTTGTRCGCCTGTTTTA 3'	65-88	Sentido
EV1-	5' GAAACACGGACACCCAAAGTAGTCG 3'	544-568	Antisentido
EV2+	5' CAAGCACTTCTGTTTCCCCG 3'	163-182	Sentido
EV2-	5' GGATTAGCCGCATTCAGGG 3'	453-471	Antisentido

^a Posiciones relativas de los *primers* en poliovirus 2 (cepa Sabin)

El protocolo de amplificación consistía en una primera PCR donde se añadían 10 µL del ADNc a 40 µL de mezcla de reacción, compuesta por: agua libre de nucleasas, Buffer PCR 1x, MgCl₂ 2mM, 20 pmol EV1+, 20 pmol EV1- y *Thermus aquaticus* (Taq) polimerasa 1,5U (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania). El proceso de amplificación de esta primera reacción duraba aproximadamente 2,5 h e incluía los siguientes períodos de incubación: 94°C/2 min + 43 ciclos (94°C/30 seg + 60°C/1 min + 72°C/30 seg) + 72°C/10 min. Este proceso se llevaba a cabo en un termociclador GeneAmp®, PCR System 9700, Applied Biosystems.

Posteriormente, se realizaba la segunda reacción, añadiendo 2 µL del producto de amplificación de la primera PCR al tubo de mezcla de nested-PCR, conteniendo agua libre de nucleasas, Buffer de PCR 1X, MgCl₂ 2 mM, 20 pmol *primer* EV2+, 20 pmol *primer* EV2-, dNTPs 200 µM, Taq polimerasa 1,5U (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania). Esta segunda parte tenía una duración aproximada de 2 horas, repartidas de la siguiente manera: 94°C/2 min + 29 ciclos (94°C/1 min + 60°C/1 min + 72°C/1 min) + 72°C/10 min. El proceso se llevaba a cabo en el mismo termociclador que la primera reacción.

Finalmente, se realizaba la detección de amplicones mediante electroforesis en gel de agarosa 1%, con 0,5 mg/mL de bromuro de etidio, El tamaño de banda de nuestro producto de PCR oscilaba entre 306-311 pares de bases, ya que éstas podían variar entre los distintos serotipos de enterovirus. En la figura III.6 se presenta la imagen de una electroforesis de RT-nested PCR 5'NTR.

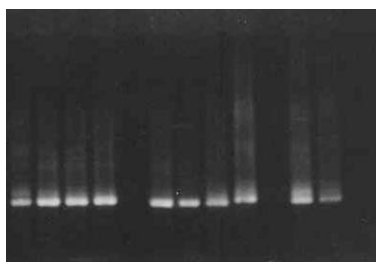


Figura III.6. Electroforesis en gel de agarosa 1% con bromuro de etidio de los productos de amplificación de la RT-nested PCR de la región 5'NTR de enterovirus; 11 muestras, control positivo y control negativo

III.1.3. Métodos de serotipificación

Para estudiar la epidemiología de los serotipos de enterovirus circulantes en nuestro medio, tras el aislamiento de los mismos se procedió a determinar los serotipos encontrados. Para dicho estudio se partió de las cepas que se mantuvieron congeladas en nitrógeno líquido o en congelador de -80°C . Gracias a la viabilidad que presentan estos virus durante años en estas condiciones, pudieron ser recuperados en cultivo celular, utilizando las líneas celulares RD, Vero y MRC-5.

Para ello, se inoculaban $200\ \mu\text{L}$ de la cepa descongelada en cada línea celular, una vez le era retirado el medio de mantenimiento (MEM suplementado con 1% SFB), procediendo según lo indicado en el apartado III.1.2.1. para el aislamiento en cultivo celular. Los tubos se incubaban a 37°C hasta observar el ECP.

Tras ello y en el siguiente orden, se realizó el ensayo de serotipado mediante IFI, secuenciación del genoma viral o neutralización.

III.1.3.1. Inmunofluorescencia indirecta (IFI)

La IFI permite la rápida determinación de 16 serotipos distintos de enterovirus, para los que existen anticuerpos comerciales específicos: echovirus 4, 6, 9, 11 y 30, coxsackievirus B1-6, coxsackievirus A9 y A24, y poliovirus 1, 2 y 3 (Light Diagnostics, Chemicon Internacional, Barcelona). La técnica fue realizada siguiendo la metodología descrita anteriormente (Rigonan *et al.*, 1998).

Para ello, se requería la preparación de extensiones de las células infectadas en portaobjetos multipocillos. Se utilizaba un portaobjetos con 21 pocillos para cada cepa, depositando y fijando las células en cada uno de ellos, según el procedimiento descrito en el apartado III.1.2.2.1.

La tinción se realizaba depositando en una primera fase 5 μ L de cada anticuerpo murino específico sin marcar en su pocillo correspondiente del portaobjetos, e incubando 30 minutos a 37°C en cámara húmeda. Posteriormente, se lavaba en agitación ligera con PBS 7,2 durante 10 minutos y se dejaba secar al aire. En una segunda fase, se añadía en cada pocillo 5 μ L de anti IgG de ratón marcada con fluoresceína (FITC Anti-Mouse IgG, Biomedica Corp, Foster City, CA) diluida 1/20 en azul de Evans (1/10000), y se incubaba otra vez 30 minutos a 37°C en cámara húmeda. Finalmente, se lavaba con agitación en PBS durante 10 minutos y se dejaba secar, se añadía glicerina tamponada y se colocaba un cubreobjetos para observar en el microscopio de fluorescencia a 400x.

Además de la IFI específica de serotipo, se realizaba la IFI genérica de enterovirus con el anticuerpo pan-enterovirus (apartado III.1.2.2.1.). La lectura de la fluorescencia nos permitía determinar los 16 serotipos mencionados. En caso de que la IFI fuera únicamente positiva para el anticuerpo pan-enterovirus, significaba que nuestra cepa no podía ser caracterizada mediante esta metodología y se catalogaba como no tipable (NT) por IFI. Estas cepas NT eran sometidas a alguno de los otros dos métodos para su completa caracterización.

III.1.3.2. RT-PCR gen codificante de VP1

En los últimos años se han propuesto diferentes técnicas para el serotipado de los enterovirus, mediante secuenciación de parte de su genoma. La región codificante para la proteína VP1 de la cápsida parece que es la que mejor cumple este cometido. En nuestro trabajo se adaptó el protocolo publicado anteriormente por Casas y colaboradores (2001) que consigue amplificar la región 3' de ese gen y cuya posterior secuenciación permite deducir el serotipo de enterovirus infectante.

El proceso de retrotranscripción se realizaba de la manera descrita en el apartado III.1.2.2.3.ii. La amplificación del ADNc generado, se ejecutaba mediante una nested PCR, utilizando dos parejas de *primers* degenerados, PE1+ y PE1- en la primera reacción, PE2+ y PE2- en la segunda, los cuales se detallan a continuación.

Primer	Secuencia^a	Posición^b	Polaridad
PE1+	5' TAYWYRMGGTTYGAYITIGARITIAAC 3'	2764-2809	Sentido
PE1-	5' TGKGAYTGRTAYCTIKYKGGRTARTA 3'	3612-3637	Antisentido
PE2+	5' CARWTWATGTAYRTICCCICGIG 3'	2874-2898	Sentido
PE2-	5' CCIGTKKWRCAIYKRCAYCTIGC 3'	3507-3529	Antisentido

^a Posiciones degeneradas; I:Deoxiinosina, Y:T/C, R:A/G, M:A/C, W:T/A, K:T/G.

^b Posición relativa de los *primers* en echovirus 9 cepa Barty

El protocolo de amplificación consistía en una primera PCR donde se añadían 10 μ L del ADNc a 40 μ L de mezcla de reacción, compuesta por: agua libre de nucleasas, Buffer PCR 1X, $MgCl_2$ 2mM, 20 pmol *primer* PE1+, 20 mol *primer* PE1- y Taq polimerasa 1,5U (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania). El proceso de amplificación de esta primera reacción duraba aproximadamente 3,5 h e incluía los siguientes períodos de incubación: 94°C/2 min + 43 ciclos (94°C/30 seg + 50°C/2 min + 72°C/30 seg) + 72°C/10 min. Este proceso se llevó a cabo en un termociclador GeneAmp®, PCR System 9700, Applied Biosystems.

Posteriormente, realizábamos la segunda reacción, añadiendo 2 μ L del producto de amplificación de la primera PCR al tubo de mezcla de nested-PCR, conteniendo agua libre de nucleasas, Buffer PCR 1X, $MgCl_2$ 2mM, 30 pmol *primer* PE2+, 30 pmol *primer* PE2-, dNTPs 200 μ M, Taq polimerasa 1,5U (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania). Esta segunda parte tenía una duración aproximada de 3,5 horas, repartidas de la siguiente manera: 94°C/2 min + 39 ciclos (94°C/30 seg + 50°C/3 min + 72°C/30 seg) + 72°C/10 min. Este proceso se llevó a cabo en el mismo termociclador que la primera reacción.

Finalmente, se realizaba la detección de amplicones mediante electroforesis en gel de agarosa 1%, con 0,5 mg/mL de bromuro de etidio. El tamaño de banda de nuestro producto de PCR tenía aproximadamente 609 pares de bases, aunque podía variar entre los distintos serotipos de enterovirus.

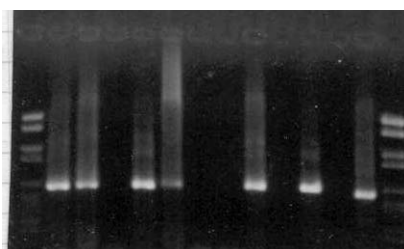


Figura III.7. Electroforesis en gel de agarosa 1% con bromuro de etidio de los productos de amplificación de la RT-nested PCR región VP1 de enterovirus; 10 muestras, control negativo y control positivo

Una vez comprobada la amplificación de las cepas, los amplicones eran enviados al Laboratorio de Enterovirus del Centro Nacional de Microbiología (CNM), Instituto de Salud Carlos III (Majadahonda, Madrid), para su secuenciación.

Purificación del ADN previa a la secuenciación

Antes de realizar la secuenciación del producto obtenido en la RT-PCR, se procedía a purificar los amplicones obtenidos, en aquellos casos en que la banda obtenida en el

gel era poco intensa. La purificación se llevaba a cabo para mejorar los resultados de la reacción de secuenciación ya que conseguía eliminar restos de iniciadores, nucleótidos, enzimas y sales. Para ello, se utilizó el método comercial Quiaquick (QIAGEN, Hilden, Alemania), siguiendo las instrucciones del fabricante.

Esta técnica empleaba un sistema de columnas que unían selectivamente el ADN gracias a una membrana de sílica gel capaz de retener el ácido nucleico. La adsorción del ADN a las columnas de sílica gel se producía en presencia de alta concentración de sales caotrópicas. La eficiencia de las columnas era óptima a pH 7,5 o menor, siendo la adsorción del ADN en esas condiciones del 95%. La unión de ADN a las columnas de sílica gel se reducía drásticamente a pH básico.

Reacción de Secuenciación

La secuenciación se realizaba mediante el método enzimático de síntesis abortiva o de los dideoxynucleótidos marcados con BigDye (ABI Prism BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit; Perkin-Elmer Applied Biosystems). En esta reacción se incorporan los nucleótidos habituales (dATP, dCTP, dGTP y dTTP), así como sus correspondientes 2'-3'-dideoxynucleótidos (ddATP, ddCTP, ddGTP y ddTTP), cada uno de estos últimos marcados con una molécula emisora de fluorescencia a una longitud de onda distinta (rojo, amarillo, verde y azul). Estos dideoxynucleótidos carecen de radical hidroxilo en posición 3', impidiendo la adición de más nucleótidos a la cadena cuando ellos se incorporan. De esta manera, tiene lugar la polimerización en sentido 5'-3', hasta la incorporación de estos ddNTP, produciéndose cadenas de longitud variable acabadas en cada uno de ellos. Tras la reacción enzimática, los productos generados se someten a electroforesis, lo cual permite deducir la secuencia problema a partir del electroferograma generado tras la detección y análisis de las bandas de secuenciación en el secuenciador automático ABI PRIMS 377 (Applied Biosystems). En la figura III.8 se muestra un ejemplo del electroferograma obtenido por nosotros, en el que cada pico corresponde a un nucleótido diferente.

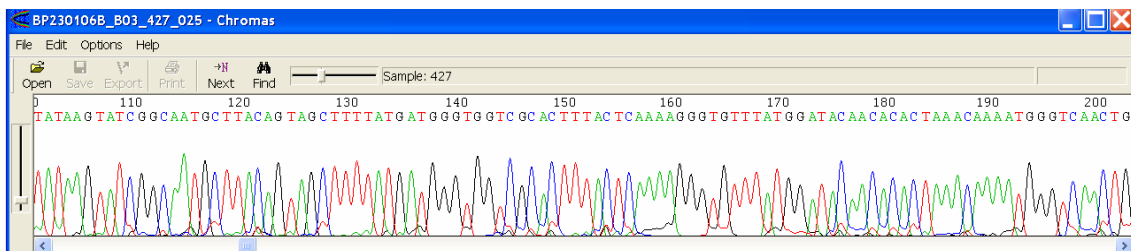


Figura III.8. Electroferograma correspondiente a secuencia del fragmento VP1 de echovirus 5

Para la obtención de la secuencia sentido, se inoculaban 4 μ L del producto obtenido en la nested-PCR (diluido 1/10 en caso de producir banda intensa en el gel o puro en caso de banda débil) junto con la mezcla compuesta por 4 μ L del reactivo BigDye (ABI Prism BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit; Perkin-Elmer Applied Biosystems, Foster City, CA) y 20 pmol del *primer* interno sense (PE2+). En caso de querer secuenciar el producto de la nested-PCR del fragmento 5'NTR, se procedía igual pero inoculando 20 pmol del *primer* correspondiente (EV2+). En algunos casos interesaba también obtener la secuencia antisentido, para lo cual cambiábamos el iniciador de esa mezcla por el *primer* interno antisense (PE2- ó EV2-).

Esta mezcla se sometía a la reacción de polimerización en el termociclador PTC-200, aplicando una desnaturalización inicial a 94°C durante 3 minutos, seguida de 25 ciclos consistentes en 96°C/10seg, 55°C/10seg y 60°C/4min.

III.1.3.3. Neutralización

Se basa en la capacidad de los antisueros de neutralizar específicamente la infectividad de un virus, el cual no producirá su ECP característico. Constituye este, el método clásico y de referencia para detectar el serotipo de enterovirus infectante. Sin embargo, esta técnica requiere mucho tiempo y abundante manipulación, por lo que se utiliza poco en la actualidad.

La realización de esta técnica requiere conocer previamente la Dosis Infecciosa 50% del virus en Cultivo Celular (TCID₅₀), ya que se deben utilizar 100 TCID₅₀/0,1 mL (ver anexo III.5.1.).

Existen dos posibilidades para realizar el ensayo, de forma individualizada (cuando se sospecha un serotipo concreto) o utilizando todos los antisueros disponibles (cuando se desconoce totalmente el serotipo implicado).

III.1.3.3.1. Neutralización en tubo con antisueros individualizados.

Se preparaban 4 tubos por cada antisuero a probar de la línea celular adecuada. Posteriormente, se mezclaban 200 μ L de una dilución del virus que contenía 100 TCID₅₀/0,1 mL con 200 μ L de antisuero que contenía 10 unidades neutralizantes (UN). Una unidad neutralizante equivale a la mayor dilución de suero que neutraliza 100 TCID₅₀ de infectividad viral. Se dejaba a temperatura ambiente durante una hora, para luego inocular esos 400 μ L en 2 de los 4 tubos preparados. Los dos restantes se usaban como controles de crecimiento, por lo que en ellos se inoculaban 200 μ L de la suspensión viral con 100 TCID₅₀/0,1 mL.

A partir de las 48 h de incubación a 37°C se procedía a la lectura. La inhibición completa del ECP de 100 TCID₅₀ del virus frente a un determinado antisuero indicaba que el anticuerpo específico lo había neutralizado y se obtenía así la identidad del enterovirus.

Este proceso se podía realizar sin valorar previamente la TCID₅₀ del inóculo. Para los enterovirus, que son de crecimiento rápido (48-72 h), se probaban las diluciones 1/100 y 1/100000. La técnica se realizaba como la descrita para el virus titulado, inoculando en paralelo las dos diluciones neutralizadas y sin tratar con el antisuero, para observar si se prevenía el desarrollo del ECP por parte del enterovirus, y así conocer la identidad del serotipo.

III.1.3.3.2. Neutralización en placa usando pools de antisueros.

Si no se sospechaba el serotipo de enterovirus, se realizaba la neutralización del enterovirus con los antisueros de los 49 serotipos de enterovirus más prevalentes. Para no tener que realizar 49 neutralizaciones individuales, se preparaban 14 pools o mezclas de 7 antisueros cada una, de manera que la combinación de dos de ellas, capaces de neutralizar nuestro virus, nos indicaría el serotipo implicado.

Primero, se preparaban los 14 pools de 7 antisueros cada uno. Para ello, se diluía cada antisuero (en PBS) de forma que en 30 µL de dicha dilución hubiera 50 UN, completando alícuotas de 200 µL de cada pool para su posterior utilización. En la tabla III.2, se muestra el contenido de cada pool o mezcla de antisueros.

Tabla III.2. Pools de antisueros utilizados en el ensayo de neutralización de enterovirus.
PV: poliovirus; CV: coxsackievirus; E: echovirus; EV: enterovirus

Pool de sueros (nº)	8	9	10	11	12	13	14
1	PV1	PV2	PV3	CVA7	CVA9	CVA16	CVB1
2	CVB2	CVB3	CVB4	CVB5	CVB6	E1	E2
3	E3	E4	E5	E6	E7	E8	E9
4	E28	E11	E12	E13	E14	E15	E16
5	E17	E18	E19	E20	E21	E22	E23
6	E24	E25	E26	E27	E29	E30	E31
7	E32	E33	EV68	EV69	EV70	EV71	

La realización del test se llevaba a cabo en una placa de microtiter de fondo plano con la línea celular sensible al virus a analizar. Se necesitaban 30 pocillos para

cada virus a probar, 28 para cada uno de los 14 pools probados por duplicado y 2 como control de crecimiento del enterovirus.

Se mezclaban en tubo estéril, 200 μ L de la dilución del virus que contenía 100 TCID₅₀/0,1mL con 200 μ L de cada uno de los pools de antisueros. Se incubaba 1 hora a temperatura ambiente, tras lo cual, se inoculaban 100 μ L de cada mezcla enterovirus-pool en dos pocillos. Por otro lado, en los dos pocillos control positivo de crecimiento, se colocaban 50 μ L de la dilución del virus. Finalmente, se añadía a todos los pocillos 100 μ L del medio de inoculación (MEM suplementado con 1% SFB), excepto en los pocillos control, donde se añadían 150 μ L.

La incubación se realizaba a 37°C en atmósfera con 5% CO₂ y a partir de las 48 h se leía para detectar la aparición del ECP. Para la interpretación de los resultados, se observaban qué 2 pocillos presentaban una monocapa inalterada por no producirse ECP, al quedar neutralizada la actividad del virus. A continuación se muestra como se identifica el serotipo infectante con un ejemplo.

Ejemplo:

Pool de sueros (nº)	8	9	10	11	12	13	14
1							
2							
3							
4				E13			
5							
6							
7							

Ejemplo: si se neutralizaba el ECP con el pool 11 y el pool 4 identificábamos nuestro enterovirus como echovirus 13

Por último, para visualizar los pocillos en que se había producido destrucción de la monocapa por el enterovirus no neutralizado, se teñía la placa con Cristal Violeta (ver anexo III.5.1.) y, de esta manera, se confirmaba macroscópicamente el resultado de la neutralización observada en el microscopio invertido.

III.2. Optimización del cultivo celular para el aislamiento de enterovirus

Entre los objetivos de este trabajo, se quería investigar como mejorar las condiciones aplicadas en el cultivo celular para el aislamiento de los enterovirus, estudiando la capacidad de cada serotipo para crecer en diferentes líneas celulares.

III.2.1. Serotipos estudiados

Se estudió la capacidad replicativa de 32 serotipos de enterovirus. La mayoría de serotipos provenían de aislamientos realizados en nuestro laboratorio, aunque también se estudiaron algunos serotipos no aislados en nuestro medio y suministrados por otros centros: Laboratorio de Enterovirus del CNM (Majadahonda), Servicio de Microbiología del Hospital de Donosti (San Sebastián) y Servicio de Microbiología del Hospital Universitario Dr.Negrín (Las Palmas de Gran Canaria).

Los 31 serotipos de enterovirus estudiados y su laboratorio de origen fueron los siguientes:

- Granada: echovirus 3, 4, 5, 6, 7, 9, 11, 13, 14, 17, 18, 20, 21 y 30; coxsackievirus A4, A9, A16, B1, B2, B3, B4 y B5; enterovirus 75.
- Majadahonda: echovirus 1, 24, coxsackievirus A24 y B6, enterovirus 69.
- Las Palmas de Gran Canaria: echovirus 20 y 33; enterovirus 71
- San Sebastián: echovirus 25

III.2.2. Líneas celulares empleadas

Las líneas celulares empleadas para valorar la capacidad de crecimiento de cada serotipo fueron: RD, MRC-5, Vero, Caco-2 (carcinoma de colon humano) y NCI-H292 (carcinoma de pulmón humano mucoepidermoide). Las tres primeras son utilizadas de forma habitual en nuestra unidad para el aislamiento viral a partir de muestras clínicas. Las líneas Caco-2 y NCI-H292 fueron incorporadas a este estudio por ser consideradas en la bibliografía revisada células con una sensibilidad alta y un amplio espectro para el cultivo de distintos enterovirus (Hierholzer *et al.*, 1993; Pinto *et al.*, 1994; Buck *et al.*, 2002; Huang *et al.*, 2002).

La línea celular Caco-2 fue suministrada por el Servicio de Microbiología del Hospital de Donosti (San Sebastián), y la línea NCI-H292 por el CNM (Majadahonda,

Madrid). Estas líneas se conservaron congeladas en nuestro laboratorio en nitrógeno líquido hasta su utilización.

Durante el tiempo que duró el estudio, se realizaron pases semanales de las líneas celulares investigadas para mantener su viabilidad, utilizando MEM suplementado con 10% SFB como medio de crecimiento.

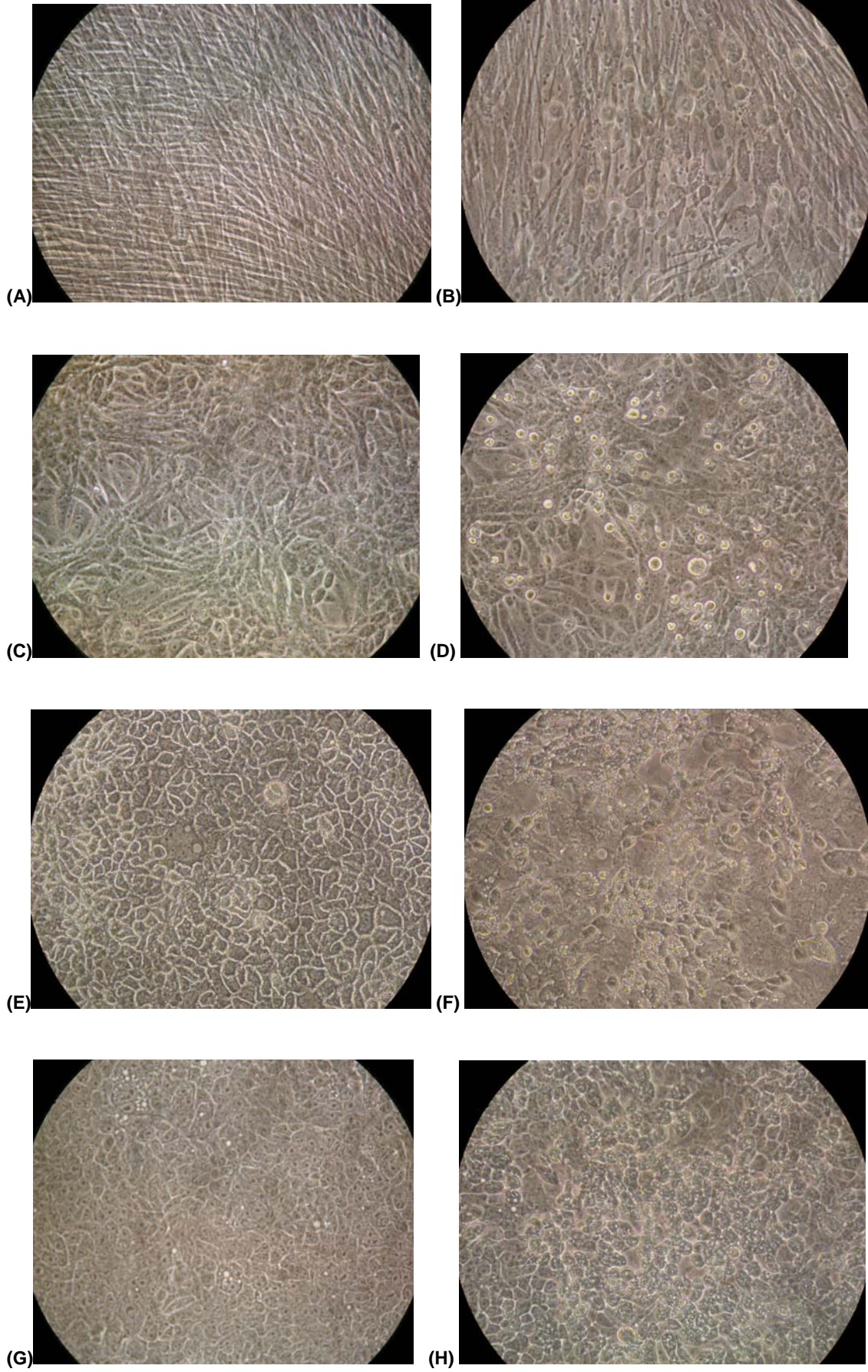
La realización de estos ensayos fue llevada a cabo en tubos de cultivo tradicional (TC) y en *shell vials* (SV). Para la preparación de los tubos o viales, se colocaba 1 mL de la suspensión de células en cada uno (150000 células/mL) y se utilizaban una vez se comprobaba que se había formado la monocapa. Para el TC, se empleaban tubos de 12 mL que se incubaban a 37°C con 15° de inclinación, y para el SV se disponían tubos de fondo plano con un cubreobjetos circular estéril de 12 mm de diámetro, donde se hacía crecer la monocapa. Se preparaban dos SV y un TC por cada línea y serotipo a estudiar, de la manera que se indica en el siguiente esquema.

Esquema de tubos y *shell vials* inoculados para el ensayo de crecimiento de cada serotipo

RD			MRC-5			Vero			Caco-2			NCI-H292		
SV1	SV2	TC	SV1	SV2	TC	SV1	SV2	TC	SV1	SV2	TC	SV1	SV2	TC

Para valorar el crecimiento en cada línea, se evaluó la aparición de ECP en TC, que se confirmó mediante IFI. Las muestras negativas fueron sometidas a RT-PCR, para confirmar su negatividad. Por otro lado, los SV fueron teñidos mediante IFI y el sobrenadante sometido a RT-PCR en tiempo real, para estimar el grado de replicación viral.

Figura III.9. Líneas celulares empleadas (A) MRC-5, aspecto normal; (B) MRC-5, efecto citopático; (C) Vero, aspecto normal; (D) Vero, efecto citopático; (E) Caco-2, aspecto normal; (F) Caco-2, efecto citopático; (G) NCI-H292, aspecto normal; (H) NCI-H292, efecto citopático



III.2.3. Estudio comparativo mediante cultivo tradicional

La inoculación de cada serotipo se realizó preparando inicialmente una dilución 1/100000 en MEM sin SFB de la cepa original disponible. Posteriormente, se depositaron 200 μ L de esa dilución en cada tubo. La incubación de estas cepas en TC se prolongó durante 10 días, revisando cada día la producción de ECP. En los casos en que la dilución 1/100000 era demasiado elevada y no se conseguía observar el crecimiento viral tras los 10 días de incubación, el experimento era repetido utilizando una dilución menor (1/10000 ó 1/1000).

Se adoptó el criterio mostrado en la tabla III.3 (McIntosh, 1996), para valorar la capacidad de crecimiento de cada serotipo en las distintas líneas, según el porcentaje de células que mostraban efecto citopático.

Tabla III.3. Criterio para valorar la sensibilidad de cada línea celular según la proporción de células que manifiestan ECP (McIntosh, 1996)

-	No ECP
+	ECP 0-25%
++	ECP 25-50%
+++	ECP 50-75%
++++	ECP 75-100% Monocapa destruida

Una vez se producía la destrucción total de la monocapa, se realizó la confirmación del crecimiento mediante IFI, a la vez que se congeló una alícuota del aislado a -80°C. Las cepas que no producían ECP se incubaron hasta los 10 días y en ese momento, se realizó también la IFI de identificación de enterovirus y se congeló igualmente una alícuota para la confirmación de negatividad mediante PCR en tiempo real, en caso de no haber mostrado ECP y que la IFI fuera también negativa.

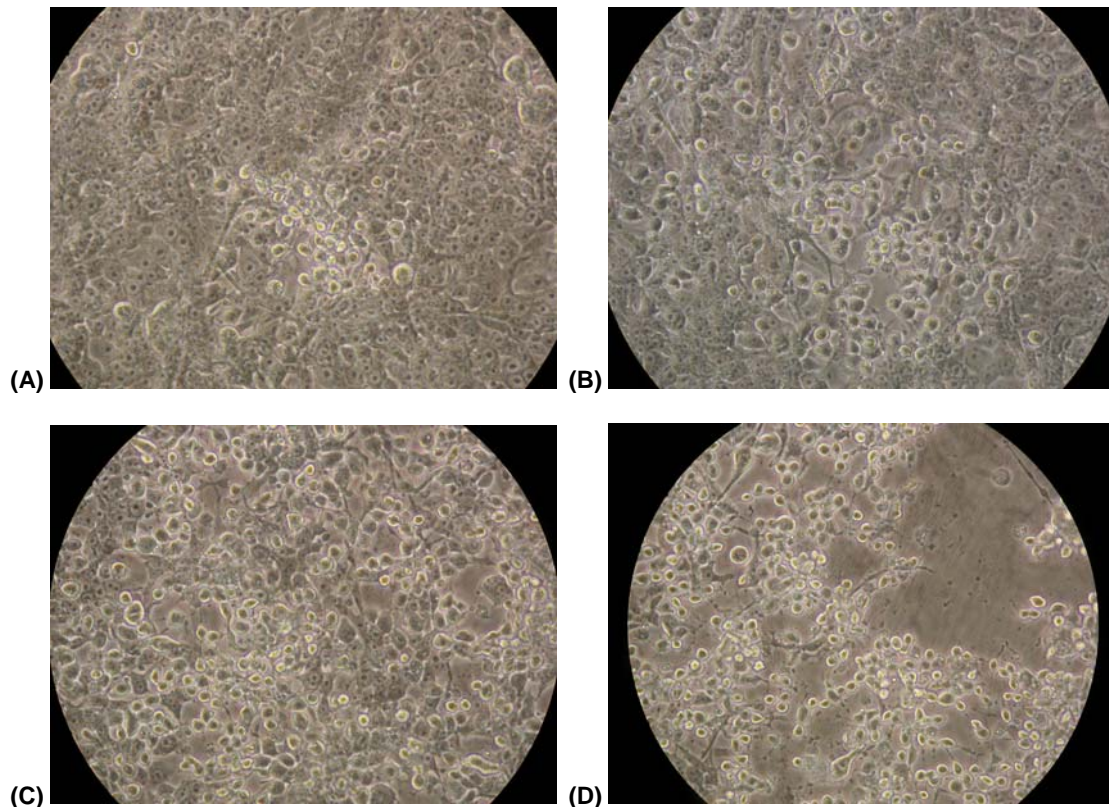


Figura III.9. Línea celular RD mostrando distintos niveles de ECP, según la proporción de células afectadas. (A) 0-25%; (B) 25-50%; (C) 50-75%; (D) 75-100%.

III.2.4. Estudio comparativo mediante cultivo en *shell vial*

Se prepararon dos SV por cada serotipo y línea a ensayar. Para la inoculación de los mismos, se añadieron 200 μ L de la dilución 1/100000 de la cepa en cada tubo de fondo plano, tras retirar el medio de mantenimiento. Se centrifugó a 800 g durante 45 minutos y posteriormente se dejó reposar 1 hora a 37°C.

Después de este tiempo, se añadieron 2 mL del medio de inoculación (MEM con 1% SFB) y se incubó a 37°C. Uno de los SV se incubó durante 24 h y el otro 48 h.

Tras ese período de incubación, se realizó la tinción de las monocapas mediante IFI siguiendo el proceso que se detalla a continuación:

- Retirar el medio de crecimiento de los tubos de fondo plano con pipeta estéril, conservando 1 mL en tubo estéril, que se conservó a -80°C para la realización de los posteriores ensayos moleculares.
- Lavar los SV dos veces con 2 mL de PBS, aspirando con pipeta Pasteur todo el PBS tras cada lavado.
- Fijación con 2 mL de acetona a -20°C durante 10 minutos.

- Retirar los cubreobjetos circulares del tubo, donde se encontraba ya la monocapa fijada, secarlos y pegarlos sobre un portaobjetos con pegamento DPX, con la monocapa hacia arriba.
- Depositar 25 μ L del anticuerpo monoclonal sin marcar dirigido frente a la proteína VP1 de enterovirus (clon 5-D8/1; Dako, Glostrup, Denmark). Incubar 30 minutos a 37°C en cámara húmeda, para posteriormente lavar en agitación ligera con PBS 7,2 durante 10 minutos. En el segundo paso de la IFI, añadir 25 μ L de anti IgG de ratón (FITC Anti-Mouse IgG, Biomedica Corp, Foster City, CA) marcada con fluoresceína diluida 1/20 en azul de Evans (Azul de Evans 1/10000 en PBS 7,2) e incubar 30 minutos a 37°C en cámara húmeda. Finalmente, lavar con agitación en PBS durante 10 minutos y dejar secar, añadir glicerina tamponada y colocar un cubreobjetos presionando ligeramente para observar en el microscopio de fluorescencia a 400x.

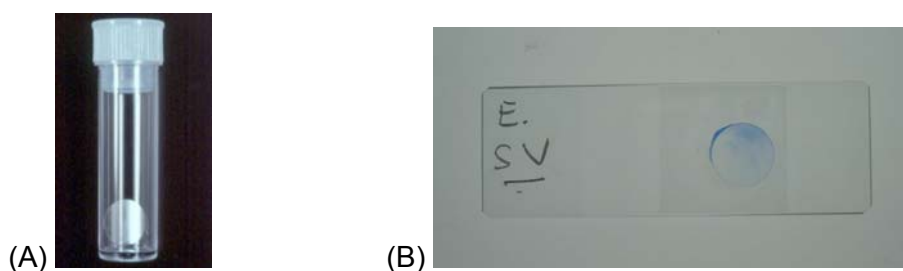


Figura III.10. (A) Tubo de *shell vial*; (B) Portaobjetos con IFI realizada sobre los cubreobjetos con monocapa celular procedentes del *shell vial*.

Junto a la positividad o negatividad de las tinciones, se anotaba el número de focos fluorescentes/campo 400x observado (tras valorar la fluorescencia en un mínimo de 25 campos). De esta manera, se podía cuantificar la mayor o menor susceptibilidad de cada línea para ser infectada por un serotipo, metodología empleada anteriormente para valorar la susceptibilidad de varias líneas celulares para permitir el crecimiento del virus BK (Marshall *et al.*, 1990).

Además se conservaba el sobrenadante de cada SV inoculado, para la realización de PCR en tiempo real, según se detalla en el apartado III.2.5.

Si la dilución utilizada no permitía la recuperación del enterovirus, se repetía la prueba con un inóculo menos diluido (1/10000 ó 1/1000).

III.2.5. Semicuantificación por PCR tiempo real

El tercer método para comparar la susceptibilidad de las distintas líneas para cada serotipo fue la realización de una PCR en tiempo real, utilizando como muestra el sobrenadante de los SV previamente congelados.

Para obtener información sobre la cantidad de virus presente en cada sobrenadante según el ciclo en que se detectaba amplificación viral, se utilizó una modificación del método empleado por Deffrasnes para comparar tres líneas celulares distintas en el crecimiento de Metapneumovirus (Deffrasnes *et al.*, 2005).

Para cada serotipo se realizaron 13 reacciones, utilizando controles negativo y positivo, identificando las muestras de la manera que mostramos a continuación:

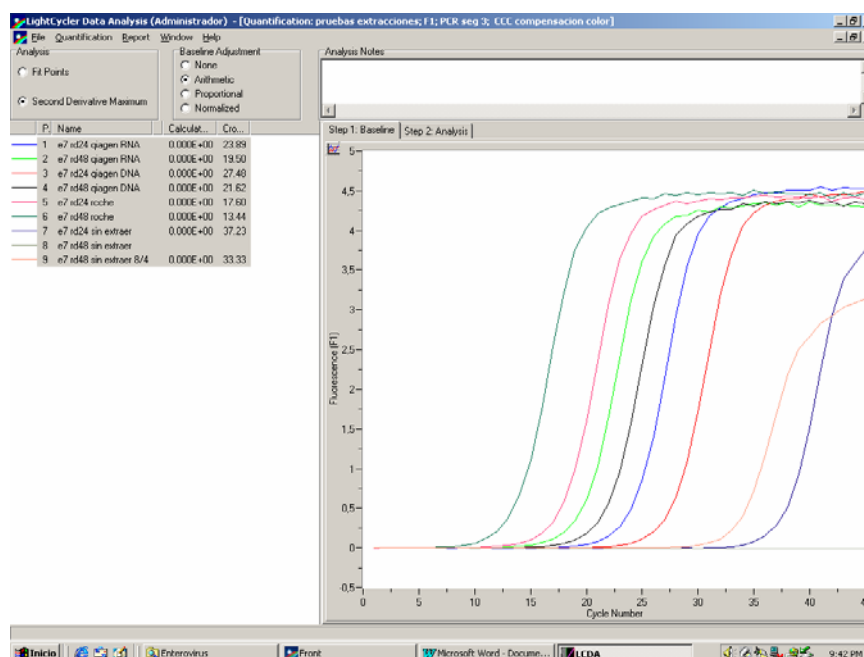
Identificación	Línea Celular	Período de Incubación
1	RD	24 h
2	MRC-5	
3	Vero	
4	Caco-2	
5	NCI-H292	
6	RD	48 h
7	MRC-5	
8	Vero	
9	Caco-2	
10	NCI-H292	
11	Inóculo inicial de cada SV (dilución 1/100000 de la cepa original)	
12	Control Negativo (agua)	
13	Control Positivo del serotipo ensayado	

En la figura III.4 del apartado III.1.2.2.3.iii. aparece un ejemplo con echovirus 5, cultivado en las cinco líneas celulares a evaluar tras 24 h y 48 h de incubación en SV.

Para seleccionar el método de extracción más adecuado, se compararon varios métodos comerciales de extracción: QIAamp Viral RNA (QIAGEN, Hilden, Alemania), QIAamp DNA (QIAGEN, Hilden, Alemania) y High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania). Se observó que el tercero

de ellos ofrecía la mayor sensibilidad, es decir, para un mismo inóculo la extracción con este reactivo ofrecía los ciclos más bajos de detección de la amplificación como se observa en la figura III.11.

Figura III.11.
RT-PCR en tiempo real
donde se comparan tres
métodos de extracción de
echovirus 7 cultivado en
línea celular RD durante
24 h y 48 h.



El proceso de extracción High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania) se realizaba siguiendo las instrucciones del fabricante, utilizando columnas de silicatos, al que se une específicamente el material nucleico. Para ello se partía de 200 μ L de sobrenadante, que se mezclaba con 40 μ L de Proteinasa K y 200 μ L de *Binding Buffer* en un tubo de microcentrífuga. Este preparado se incubaba 10 minutos a temperatura ambiente para conseguir la lisis viral y, posteriormente, se depositaban 100 μ L de Isopropanol. Esta mezcla era transferida a la columna, que se centrifugaba a 14000 rpm durante un minuto. Tras ello, se realizaban tres lavados para la purificación del ARN unido a la columna. El primero con 500 μ L de *Inhibitor Removal Buffer* y los dos siguientes con 500 μ L de *Washing Buffer*, añadiendo en cada caso el correspondiente tampón a la columna y centrifugando a 14000 rpm. Finalmente, el ARN se recuperaba de la columna con 60 μ L de buffer de elución, añadiendo éste a la columna y centrifugando.

El líquido obtenido contenía el ARN extraído y purificado, que era utilizado inmediatamente, aunque luego se conservaba a -80°C por si había que repetir el proceso de RT o amplificación.

Una vez obtenido el material nucleico se realizaba la retrotranscripción y la PCR en tiempo real, de la manera detallada en el apartado III.1.2.2.3.iii.

En los sobrenadantes que contenían el enterovirus ensayado, se podía detectar su presencia mediante esta técnica. Además, en esta reacción se obtenía el valor del ciclo umbral de amplificación que significaba PCR positiva. Este valor umbral era inversamente proporcional a la cantidad de virus presente en cada sobrenadante. Por ello, la comparación de este valor para los distintos sobrenadantes y el inóculo común empleado (dilución 1/100000 de la cepa original) nos permitía saber en qué línea se había producido una mayor replicación del serotipo objeto del ensayo.

Criterio de interpretación de la PCR en tiempo real.

Para valorar la reproducibilidad de nuestros ensayos, así como el significado de la diferencia del número de ciclos en que se detectaba positividad se realizó este proceso de PCR en tiempo real por triplicado para distintas diluciones de un prototipo de enterovirus elegido. El serotipo utilizado para estos ensayos fue echovirus 7, utilizando como cepa original el sobrenadante procedente del SV de la línea RD incubado durante 48 h, del que era sabido que contenía una alta carga viral. A partir de ese inóculo se prepararon diluciones por triplicado 1/10, 1/100 y 1/1000 en MEM sin suplementar con SFB.

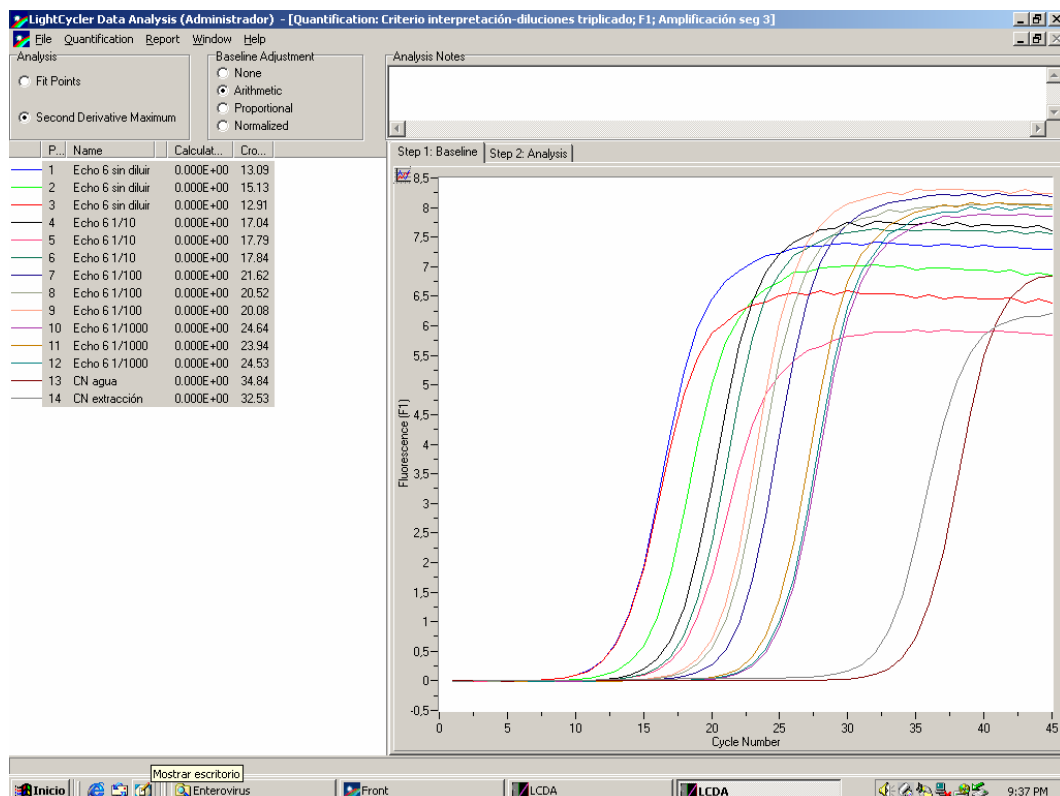


Figura III.12. RT-PCR en tiempo real de 4 diluciones de E6 ensayadas por triplicado para reproducibilidad del ensayo y desarrollar criterio de interpretación

Los doce inóculos (puro y tres diluciones por triplicado) preparados para crear este criterio de interpretación se trabajaron independientemente, realizando los procesos de extracción, RT y PCR por separado para cada uno de ellos.

De esta manera, se obtuvo la variabilidad intraensayo al utilizar cada inóculo en tres experimentos por separado y conocimos como podía variar el ciclo de detección en función de la carga viral de partida. El inóculo puro resultaba positivo en el ciclo $13,40 \pm 0,47$, la dilución 1/10 en el ciclo $17,62 \pm 0,31$, la dilución 1/100 en el ciclo $20,94 \pm 0,76$ y la dilución 1/1000 en el ciclo $24,37 \pm 0,38$. Por ello, diferencias superiores a 1,5 ciclos entre dos inóculos de virus procedentes de la incubación en diferentes líneas celulares fue considerado significativo para comparar el nivel de replicación en cada una.

III.3. Análisis de secuencias de los productos amplificados

Las secuencias obtenidas fueron analizadas inicialmente con el software CHROMAS (versión 1.3; McCarthy, 1996, Griffith University, Queensland, Australia). Estas secuencias fueron comparadas con otras depositadas en GenBank, realizando una búsqueda BLAST (*basic local alignment search tool*), lo que permitía deducir el serotipo de enterovirus problema cuando se analizaba una secuencia de VP1.

En el caso de haber secuenciado el fragmento del genoma viral correspondiente a 5'NTR, la información que se podía obtener era la especie de enterovirus (HEV-A a D). Para ello, era necesario relacionar nuestra secuencia problema con las secuencias de esa región correspondientes a miembros de las 4 especies de enterovirus humanos. Esto era posible mediante el uso de varios programas informáticos que finalmente nos permitían obtener el árbol filogenético que las relacionaba entre sí y permitía agrupar las distintas cepas, haciendo posible el análisis de las mismas. Esto mismo se realizó con las secuencias de la región VP1 para confirmar los datos obtenidos en el BLAST.

Las secuencias conseguidas eran alineadas y cortadas con el programa Seq Man (DNASTAR, software, Madison, WI, EEUU), mediante el cual se generaban fragmentos de nucleótidos de igual longitud y pertenecientes a la misma región del genoma del virus.

Una vez realizado esto se hizo uso de otro programa (Clustal X 1.8) para alinear nuevamente las secuencias ya arregladas y transformar a otro formato

compatible con el siguiente programa a utilizar (MEGA 3.0) que nos permitía construir el árbol filogenético de la serie estudiada.

III.4. Análisis estadístico de los datos

En el estudio clínico-epidemiológico, los datos obtenidos de los pacientes y para cada una de las cepas fueron introducidos en una base de datos, utilizando para ello el programa informático Microsoft Access. Se recogieron los siguientes datos de los pacientes: fecha y número del aislamiento, muestra, diagnóstico clínico, serotipo, línea celular original de crecimiento y datos demográficos (nombre, edad, procedencia, número de historia clínica). La antigüedad de algunos aislados hizo imposible la recuperación de algunos de estos datos y finalmente se consiguió rescatar la información relativa al diagnóstico clínico y datos demográficos del paciente, en 256 y 267 pacientes, respectivamente, del grupo estudiado.

Los análisis estadísticos descriptivos y comparativos (chi cuadrado) de los datos del estudio clínico-epidemiológico se realizaron utilizando el programa SPSS 12.0.1. Software (SPSS, Chicago, IL). En los análisis comparativos de poblaciones, una $p < 0,05$ fue considerada estadísticamente significativa con una probabilidad del 95%.

Para valorar la sensibilidad del crecimiento enteroviral en las líneas celulares evaluadas se plasmaron los datos obtenidos en diagramas de caja que resumen una única variable numérica (nº de focos fluorescentes, ciclo umbral de detección mediante RT-PCR o nivel de ECP) dentro de las categorías de otra variable (cada línea celular) y muestran la mediana, el rango intercuartil, los valores atípicos y los casos extremos. Sobre estos datos generales, se aplicaron las pruebas de normalidad (tests de Kolmogorov-Smirnov y Shapiro-Wilk). Cuando estas pruebas resultaron significativas los datos obtenidos con las diferentes líneas en distintos procedimientos, fueron comparados mediante la prueba no paramétrica de Mann-Whitney.

III.5. Anexo

III.5.1. Cálculo de la Dosis Infecciosa 50% de un virus en Cultivo Celular (TCID₅₀). Métodos de Reed-Muench y Kärber.

Para titular un inóculo viral y obtener su TCID₅₀, es decir, aquella dilución que contiene la cantidad de virus necesaria para infectar el 50% de los cultivos celulares con los que se pone en contacto, se deben enfrentar diluciones crecientes del virus con una línea celular susceptible y luego aplicar el cálculo matemático de Reed y Muench o de Kärber.

El ensayo se realiza de la siguiente manera:

- Congelar en nitrógeno líquido 4 alícuotas de la suspensión del virus a titular.
- Preparar placa de microtiter de fondo plano, conteniendo células sensibles al virus a probar.
- Descongelar una alícuota de la suspensión de virus y preparar diluciones en MEM sin suplementar desde 10⁻² a 10⁻⁸ (1 mL de cada dilución).
- Retirar el medio de mantenimiento de la placa microtiter y, por cada dilución de virus, inocular en la placa 4 pocillos a razón de 200 µL por pocillo.
- Incubar a 37°C en atmósfera con 5% de CO₂ durante 3-5 días.
- A partir de las 72 horas, y diariamente, proceder a la lectura de la microplaca hasta que se observe el ECP típico.
- Anotar los resultados de infectividad para cada dilución como en el ejemplo siguiente:

Infectividad

Dilución	A	% cultivos infectados	B	C	Razón	%
10 ⁻³	4/4	1	9	0	9/9	100
10 ⁻⁴	3/4	0,75	5	1	5/6	83
10 ⁻⁵	2/4	0,5	2	3	2/5	40
10 ⁻⁶	0/4	0	0	7	0/7	0

A: n° de pocillos con ECP/ n° inoculados

B: n° acumulativo de infectados

C: n° acumulativo de no infectados

Según el **método de Reed y Muench**, realizaríamos el siguiente cálculo matemático:

$$\frac{\text{Infectividad sobre el 50\% - 50\%}}{\text{Infectividad sobre el 50\% - Infectividad bajo el 50\%}}$$

Siguiendo el ejemplo: $83-50/83-40= 0,7$. Esta cifra se sumaría al exponente de la dilución que quedaba por encima del 50% (10^{-4}), obteniendo una TCID₅₀/0,1 mL (dosis de virus que infecta a la mitad de los cultivos celulares en que se inocula) de $10^{-4,7}$.

Para calcular la dilución de virus que contiene 100 TCID₅₀ se aplica la siguiente fórmula:

Log título TCID₅₀ + 2 = Log de la suspensión que contiene 100 TCID₅₀.

Ejemplo: $100 \text{ TCID}_{50} / 0,1\text{mL} = 10^{-2,7}$

Si se realiza el cálculo de la TCID₅₀ mediante el **método de Kärber**, se procedería aplicando la siguiente fórmula:

$$\text{Log TCID}_{50} = L - d (S - 0,5)$$

L: log de la dilución más baja utilizada en el test. En nuestro ejemplo, L=3

d: diferencias entre los logaritmos de diluciones realizadas. En el ejemplo, d=1

S: suma de proporciones de tests positivos (mostrando ECP). En el ejemplo, S=2,25

Siguiendo el ejemplo planteado: $\text{Log TCID}_{50} = - 3 - 1 (2,25-0,5)$

$$\text{Log TCID}_{50} = - 4,75, \text{ por tanto } \text{TCID}_{50}/0,1\text{mL} = 10^{-4,75}$$

Se observó la validez de ambos métodos para el cálculo del título viral, siendo quizás el método de Kärber de más sencilla realización.

Tinción de Microplacas con Cristal Violeta

Una vez finalizado el periodo de incubación y para confirmar los resultados del ECP observado en el microscopio invertido se realizaba la tinción de las placas. Para ello, se decantaba el contenido de la misma en el contenedor adecuado y se añadían 100 µL de Cristal Violeta en cada pocillo. Se dejaba 2 minutos a temperatura ambiente y se lavaba la microplaca bajo el grifo. De esta manera, las monocapas intactas se observaban teñidas totalmente con el colorante, mientras que los pocillos donde se había producido ECP aparecían sin teñir o con una coloración no uniforme.

III.5.2. Programas Informáticos utilizados

- Microsoft Word, Excel, Access, Powerpoint
- EndNote 9.0
- Adobe 6.0
- SPSS 12.0
- Chromas 2.31
- Macaw 2.0.5.
- DNASTar: Seqman, EditSeq
- NCBI BLAST
- Clustal X 1.8
- MEGA 3.0

IV. RESULTADOS

IV.1. ESTUDIO CLÍNICO-EPIDEMIOLÓGICO

IV.1.1. DATOS GENERALES DE LAS INFECCIONES POR ENTEROVIRUS DIAGNOSTICADAS

IV.1.1.1. Aislamientos totales durante el periodo 1985-2006

En este estudio se recogen los datos de los 679 aislamientos de enterovirus realizados en el Servicio de Microbiología del Hospital Virgen de las Nieves (Granada) entre 1985 y 2006. Se conocía la muestra de origen en 579 de esos aislamientos (tabla IV.1), correspondientes a 362 casos o pacientes distintos, cuya cepa infectante se conservaba congelada. Se pudo recabar información sobre los datos clínicos de los pacientes en 256 casos.

Tabla IV.1. Muestras en que se aisló enterovirus entre 1985 y 2006 en el laboratorio del Microbiología del Hospital Virgen de las Nieves (Granada)

Muestra	n (%)
LCR	212 (36,6)
Heces	149 (25,7)
Exudado faringoamigdalares	121 (20,9)
Aspirado nasofaríngeo	70 (12,1)
Otras muestras respiratorias	14 (2,4)
Otras muestras*	12 (2,2)
TOTAL	579

* Líquido pericárdico, exudado úlcera corneal, escarificado lesiones exantemáticas

El número de enterovirus detectados cada año aparece representado en la figura IV.1. Se puede observar la variable incidencia de este tipo de infecciones a lo largo del período de estudio, advirtiendo los años 1991, 1995, 2000 y 2006, como aquellos en los que tuvo lugar un mayor número de casos.

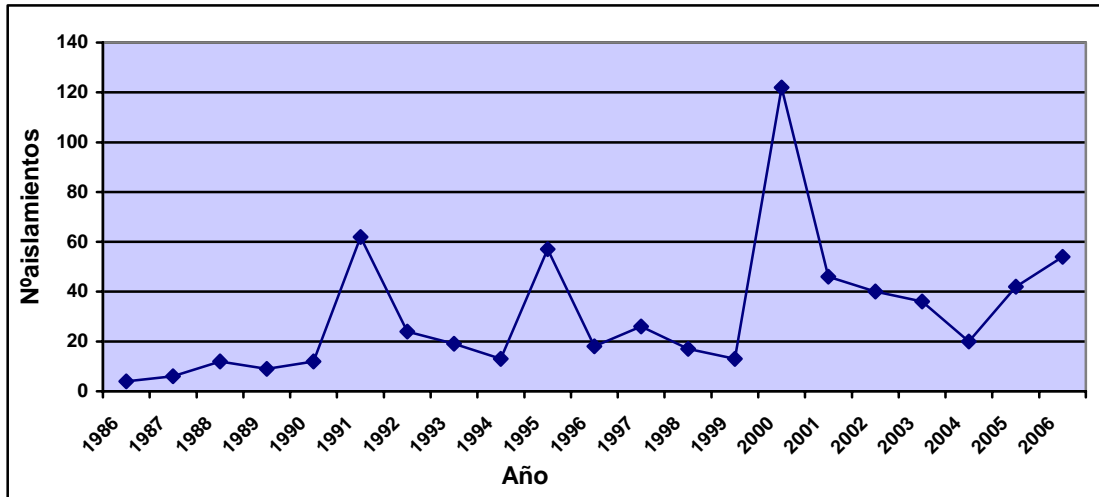


Figura IV.1. Distribución del número de aislamientos de enterovirus entre 1985 y 2006.

IV.1.1.2. Procedencia de los pacientes

La mayoría de los pacientes estaban hospitalizados en el Servicio de Pediatría de nuestro centro, aunque se estudiaron también numerosos casos procedentes de hospitales de otras localidades, principalmente, Motril, Baza y Almería. En la figura IV.2 se puede observar la distribución de casos en función de su procedencia geográfica.

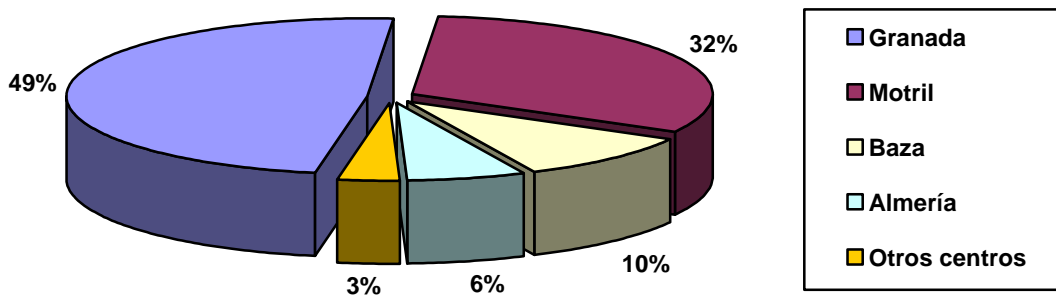


Figura IV.2 Procedencia geográfica de los casos estudiados de infección enteroviral

IV.1.1.3. Distribución por edad y sexo de los pacientes

En la tabla IV.2 aparece la afectación por edades entre los 267 pacientes cuyo dato era conocido. Se pudo observar una importante tasa de infección en menores de 1 año (19,9%) y que más de la mitad de los casos tuvieron lugar en menores de 5 años (50,9% entre 0 y 5 años). Los pacientes por encima de los 30 años sólo supusieron el 7,1% de los casos.

La edad de los pacientes afectados estaba comprendida entre los 26 días de edad y los 76 años, siendo la media de 9,9 años (desviación estándar = 13,59) y la mediana de 5 años.

En cuanto a la distribución por sexos, la infección por enterovirus se presentó más frecuentemente en varones, con un ratio 1,54:1 (162 hombres: 105 mujeres), siendo esta diferencia estadísticamente significativa ($p=0,001$). Este predominio de enfermedad en el paciente masculino se produjo en todos los grupos de edad, excepto en el que engloba a pacientes de 30-59 años de edad donde las mujeres representaron el 69,2% de los cuadros clínicos (tabla IV.3).

Tabla IV.2. Distribución por edades de la infección enteroviral (n=267)

EDAD (años)	Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje acumulado
<1	53	19,9	19,9
1	12	4,5	24,3
2	10	3,7	28,1
3	13	4,9	33,0
4	26	9,7	42,7
5	22	8,2	50,9
6	15	5,6	56,6
7	15	5,6	62,2
8	8	3,0	65,2
9	11	4,1	69,3
10	7	2,6	71,9
11-15	25	9,4	81,3
16-20	12	4,5	85,8
20-29	19	7,1	92,9
30-45	11	4,1	97,0
46-60	3	1,1	98,1
>60	5	1,9	100,0
Total	267	100,0	

Tabla IV.3. Distribución de pacientes por sexo en distintos grupos de edad (n=267)

Edad (años)	Hombres (%)	Mujeres (%)	p
<1	30 (56,5)	23 (43,5)	0,336
1-4	41 (67,3)	20 (32,7)	0,007
5-9	47 (66,2)	24 (33,8)	0,006
10-15	18 (55,6)	14 (44,4)	0,480
16-29	18 (56,7)	13 (43,3)	0,369
30-59	4 (30,8)	10 (69,2)	0,109
>60	4 (80,0)	1 (20,0)	0,180
TOTAL	162 (60,5)	105 (39,5)	0,001

IV.1.1.4. Situación clínica asociada a los enterovirus aislados

En la tabla IV.4 se muestran los diferentes síndromes clínicos valorados en esta serie, donde priman los procesos de afectación neurológica, con un 82,4% (211 casos) del total de casos detectados.

Tabla IV.4. Diagnóstico clínico asociado a infecciones por enterovirus (1985-2006) (n=256)

	Nºcasos estudiados	Porcentaje
Meningitis	211	82,4
Sd.Respiratorio	18	7,0
Sd.Febril	17	6,6
Exantema	4	1,6
Gastroenteritis	2	0,8
Encefalitis	1	0,4
Miopericarditis	1	0,4
PFA	2	0,8
Total	256	

Se observa que las enfermedades principalmente relacionadas con los aislamientos de enterovirus son aquellas asociadas con el SNC, meningitis aséptica primordialmente y, en menor medida, dos casos de PFA y uno de encefalitis asociados a EVNP.

Hubo 42 pacientes sin afectación neurológica. Estos pacientes tenían una edad media de 5,7 años (mediana 1 año) y se presentaba en el grupo de edad de 0 a 4 años con una mayor frecuencia que en individuos por encima de esa edad, de forma estadísticamente significativa ($p=0,0002$). En el caso de clínica no neurológica no hubo diferencias significativas entre sexos, 23 hombres y 19 mujeres se vieron afectados ($p=0,537$).

En la figura IV.3 se recoge la distribución porcentual de los síndromes neurológicos y no neurológicos causados por enterovirus en los diferentes grupos de edad. La afectación del SNC se produjo mayoritariamente en niños de 5-9 años, mientras que los cuadros extrameníngeos se dieron fundamentalmente en menores de 4 años.

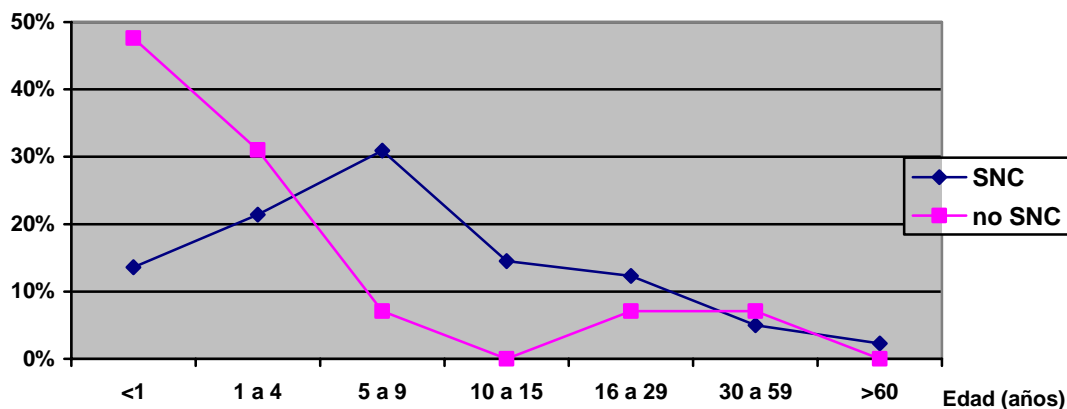


Figura IV.3. Síndromes clínicos causados por enterovirus en diferentes grupos de edad. Pacientes afectados por síndromes neurológicos (n=220) y no neurológicos (n=42)

IV.1.1.5. Aislamientos de enterovirus por mes

La periodicidad mensual de los aislamientos también fue analizada durante los 21 años estudiados, observando una mayor tasa de los mismos en los meses de junio y agosto. En la figura IV.4 se recogen las cifras de esta distribución de aislamientos de enterovirus a lo largo del año, observándose otro pico en el mes de noviembre, asociado a un brote de meningitis aséptica por E4 en 1991, que supuso un importante número de casos dentro de la serie.

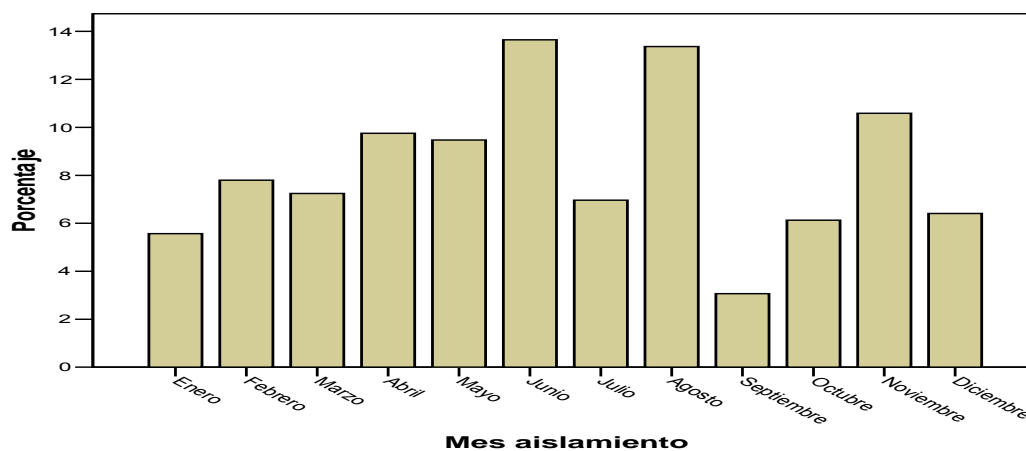


Figura IV.4. Distribución porcentual de aislamientos de enterovirus a lo largo del año (1985-2006)

IV.1.2. EPIDEMIOLOGÍA DE SEROTIPOS AISLADOS (1985-2006)

IV.1.2.1. Distribución temporal y geográfica de los serotipos aislados

De los 679 aislamientos realizados entre 1985 y 2006, se conservaron congeladas 362 cepas pertenecientes a 579 muestras clínicas, ya que en ocasiones se estudiaron varias muestras por paciente. De esas 362 cepas de enterovirus aisladas en cultivo celular, 301 correspondían a 29 serotipos distintos determinados por alguno de los métodos descritos. Por otro lado, 61 de las cepas identificadas mediante alguno de los métodos explicados (pruebas físico-químicas, IFI o RT-PCR), no pudieron ser caracterizadas a nivel de serotipo. Estos aislados fueron catalogados como no tipables (NT).

De las 301 cepas caracterizadas a nivel de serotipo, la IFI determinó 210 serotipos, la secuenciación de VP1 97 y la neutralización se realizó sobre 14 aislados; algunas cepas fueron estudiadas con más de un método. En la figura IV.5 se pueden observar los diferentes serotipos circulantes en nuestro medio entre 1985 y 2006, así como el número de infecciones causadas por cada uno de ellos.

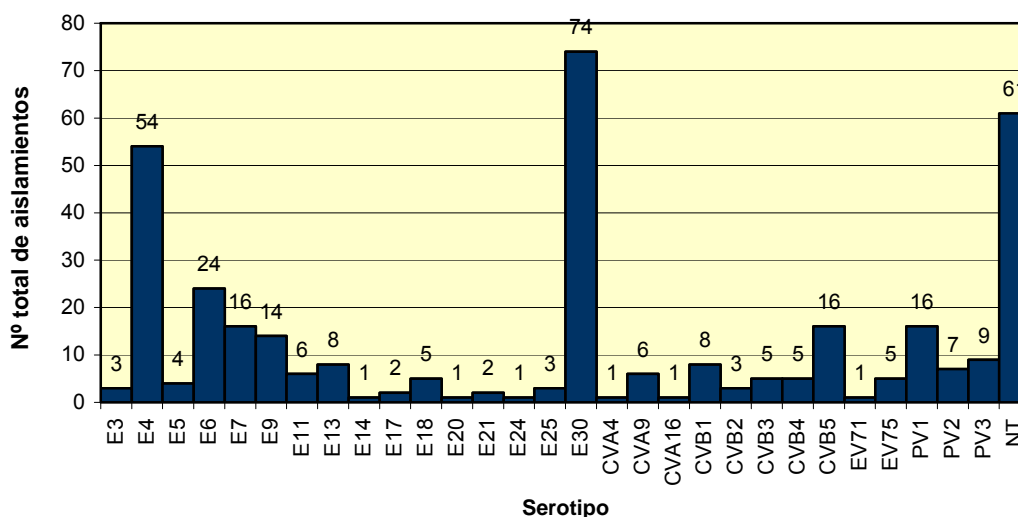


Figura IV.5. Serotipos de enterovirus aislados entre 1985 y 2006 (n=362)

Los agentes de EVNP pertenecían en su mayoría al grupo echovirus (72,4%), seguidos de los coxsackievirus B (12,3%) y en menor número se consiguieron aislar otros enterovirus. Se percibió un serotipo endémico que producía el mayor número de infecciones, E30, aislado en mayor o menor medida casi todos los años del estudio, aunque se presentan brotes importantes de manera cíclica cada 2-3 años (tabla IV.5). Además E4 es el segundo serotipo más numeroso de esta serie, aunque su circulación se produjo casi de manera exclusiva en el año 1991. Otros serotipos detectados en alto número fueron E6, E7 y E9, además de CVB5.

En este estudio, aparecen descritas, además, 32 cepas vacunales de poliovirus 1, 2 y 3, aisladas hasta el año 2004, procedentes de niños vacunados.

Los serotipos infectantes desglosados por año de detección aparecen representados en la tabla IV.5 (las cifras más significativas se muestran en negrita). De las 362 cepas cuyo serotipo se estudió, conocíamos el año de aislamiento para 346 de ellas, que son las que se muestran en la tabla. Estos datos nos indican algunos periodos puntuales donde prevaleció la circulación de serotipos concretos.

Tabla IV.5. Distribución de serotipos de enterovirus entre 1985 y 2006

Serotipo	1985	1986	1987	1988	1989	1990	1991	1992	1993	1994	1995	1996	1997	1998	1999	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	Total	
E3	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	3
E4	0	0	1	0	0	0	43	3	0	0	0	1	0	0	0	0	0	4	1	0	0	0	0	53
E5	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	1	0	0	0	4
E6	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	2	5	0	2	7	1	0	0	2	3	24	
E7	0	0	0	0	0	0	0	4	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	3	7	0	15	
E9	0	1	1	0	0	1	0	1	2	0	0	0	1	0	0	0	1	0	4	0	0	2	14	
E11	2	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	5
E13	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	8	0	0	0	0	0	0	0	8
E14	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1
E17	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2
E18	0	0	0	0	0	0	0	3	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	5
E20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1
E21	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	2
E24	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
E25	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	2
E30	0	0	0	2	0	0	0	3	0	3	16	0	6	0	0	11	4	3	3	1	0	20	72	
CVA4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1
CVA9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	2	0	0	1	2	0	0	6
CVA16	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
CVB1	0	0	0	0	0	7	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	8
CVB2	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2
CVB3	0	0	0	2	0	0	1	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5
CVB4	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5
CVB5	0	1	2	1	0	1	0	2	0	0	0	0	0	0	1	4	0	0	0	2	0	1	15	
EV71	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1
EV75	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	4	5
PV1	0	0	1	0	0	1	0	0	2	5	1	2	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	14
PV2	0	0	0	0	2	0	0	2	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	6
PV3	0	0	0	4	2	0	0	1	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	9
NT	3	0	1	2	3	1	2	1	12	2	0	0	0	0	0	5	3	1	3	2	10	5	56	
Total	3	2	4	12	9	12	51	22	19	13	19	5	10	7	1	31	18	9	17	13	26	37	346	

Echovirus 30, el agente más frecuente, constituyó el serotipo circulante mayoritario en muchos momentos del periodo estudiado, con especial incidencia en los años 1995, 1997, 2000 y 2006. El segundo agente más detectado fue E4, con 54 aislamientos totales, 43 de los cuales se produjeron en 1991 debido a un importante brote de meningitis aséptica que afectó principalmente a la zona de la costa mediterránea granadina (Motril).

En la tabla IV.5 se puede observar la gran variedad de serotipos circulantes y el desplazamiento de unos por otros a lo largo de los años. Hay algunos que aparecen puntualmente, como CVB1 en 1990 ó E13 en 2000, y otros que muestran un carácter más endémico con una distribución bastante homogénea a lo largo de estos años (E30, E6, E9, CVB5). Algunos de éstos pueden causar también epidemias en algunos periodos, como las citadas para E30. Por otro lado se observa como E7 se presenta de forma epidémica y constituye el serotipo mayoritario en 1992, 2004 y 2005.

En la figura IV.6, se han representado gráficamente las oscilaciones en la circulación de los 8 serotipos más representativos de nuestra serie, comprobando los diferentes picos de cada uno de ellos a lo largo de 16 años (1990-2006).

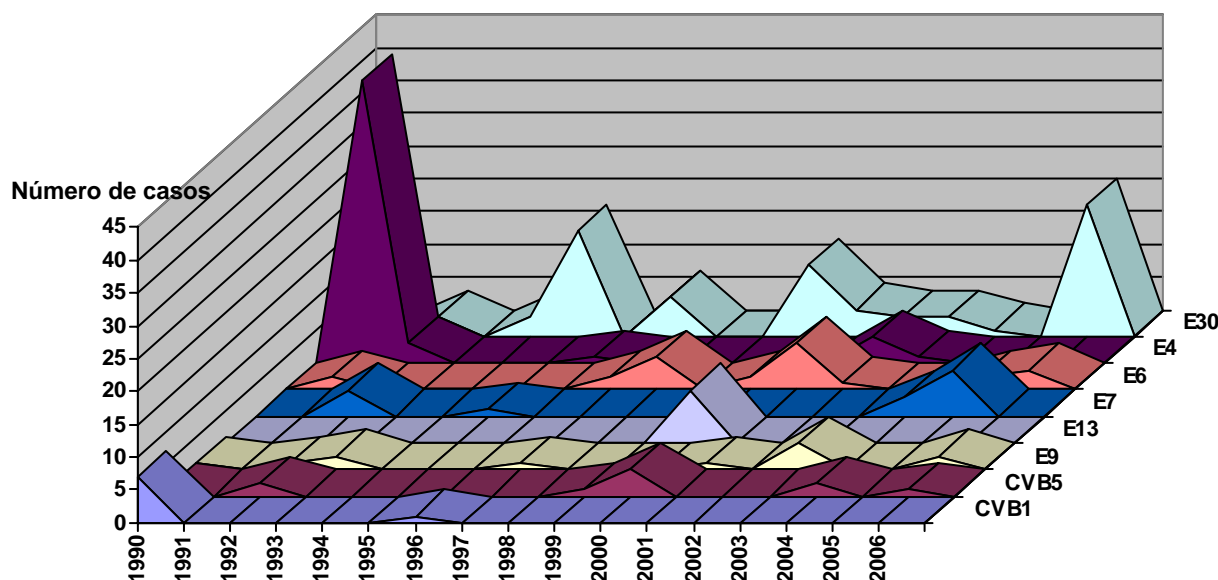


Figura IV.6. Circulación de 8 serotipos de enterovirus en nuestra región (1990-2006)

En cuanto al origen geográfico de los aislados, en Motril se localizaron casi de manera exclusiva las infecciones por E4, CVB5 ó E13, mientras que en Baza se produjo un importante número de cuadros por E6 y E9. Casi la mitad de los enterovirus procedían de pacientes de Granada capital, por lo que estudiando la distribución de serotipos, la mayoría de ellos también se aislaron en esos pacientes.

De forma particular, se puede apreciar también la circulación en nuestra región de EV75, serotipo de reciente descripción, entre finales de 2005 y los primeros meses de 2006. Este ha sido el segundo serotipo más frecuente, tras E30 durante el presente año, con 5 casos detectados (2 meningitis y 3 cuadros no neurológicos), como se detalla en la tabla IV.6.

Tabla IV.6. Principales datos clínico-epidemiológicos asociados a la infección por EV75 en nuestro medio

EV75 nº de caso	Muestra	Edad	Sexo	Fecha aislamiento	Síndrome clínico	Evolución
407	ANF	2 meses	Mujer	Diciembre 2005	IRA	Curación
465	ANF	2 meses	Hombre	Enero 2006	GEA	Curación
466	LCR	1 mes	Mujer	Enero 2006	Meningitis	Curación
578	ANF	1 mes	Hombre	Febrero 2006	S. febril	Curación
735	LCR	12 años	Hombre	Mayo 2006	Meningitis	Curación

Abreviaturas: EV75, enterovirus 75; IRA, infección respiratoria aguda; GEA, gastroenteritis aguda.

Todos los casos, excepto uno, se dieron en pacientes menores de dos meses. Filogenéticamente se relacionó con otras cepas aisladas en España, a diferencia de las cepas aisladas en otros países, con una diferencia del 14,6-17,2% en la secuencia de nucleótidos de la proteína VP1 utilizada (figura IV.7)

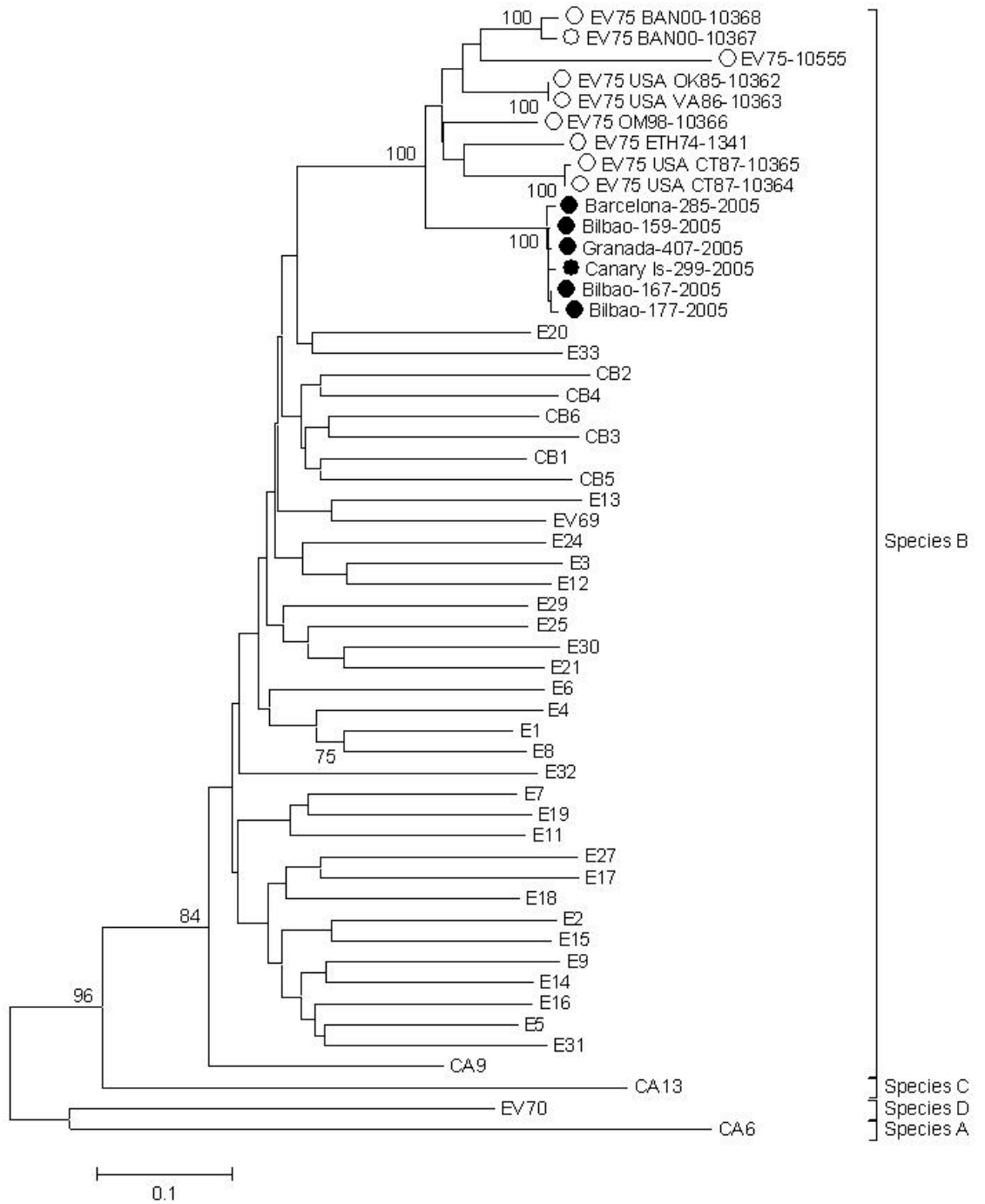


Figura IV.7. Árbol filogenético de los EV75 aislados en nuestro medio y de otros aislados del resto del mundo

IV.1.2.2. Distribución mensual de los grupos de enterovirus

Estudiando la aparición temporal de los distintos grupos de enterovirus (figura IV.8.) se observa que echovirus apareció principalmente en junio y agosto, siguiendo la tendencia general habitual. Sin embargo, poliovirus y coxsackievirus B, tenían una distribución distinta, fundamentalmente en invierno y primavera. Existen más discrepancias con respecto a la tendencia general, como la que ocurre con EV75, ya que todos los casos se dieron en los meses fríos. El grupo coxsackievirus A no se valoró por presentar únicamente 8 casos, que no permitían hacer un análisis adecuado.

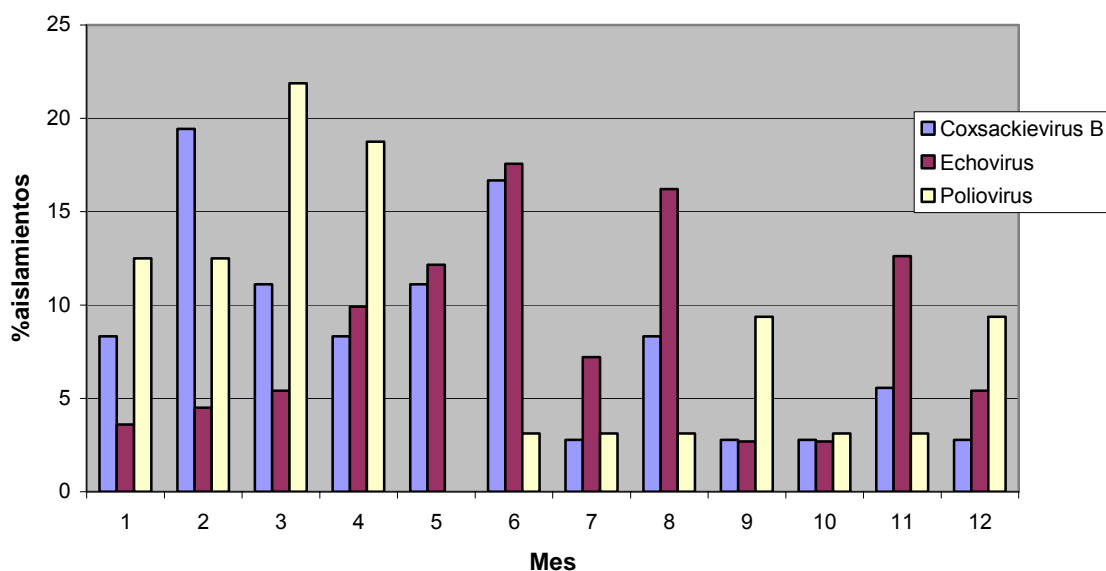


Figura IV.8. Distribución mensual porcentual de EV aislados

IV.1.2.3. Relación de los serotipos aislados con los síndromes clínicos

La implicación de los distintos serotipos en estas enfermedades se ha distinguido según éstos afectaban o no al SNC y así aparece reflejado en la tabla IV.7.

Tabla IV.7. Serotipos asociados a infección o no del SNC

Serotipo	SNC	No SNC	Total
E3	0	1	1
E4	53	0	53
E5	2	1	3
E6	19	1	20
E7	6	3	9
E9	9	2	11
E11	2	0	2
E13	7	1	8
E14	1	0	1
E17	0	1	1
E18	4	1	5
E20	1	0	1
E21	2	0	2
E25	0	2	2
E30	61	5	66
CVA4	1	0	1
CVA9	6	0	6
CVA16	1	0	1
CVB1	1	4	5
CVB2	0	1	1
CVB3	0	2	2
CVB4	2	0	2
CVB5	9	2	11
EV71	1	0	1
EV75	2	3	5
NT	25	5	30
Polio 1,2,3	0	6	6
Total	214	42	256

Los serotipos aislados en mayor número, E4, E6, E9, E13, E30 ó CVB5, lo fueron precisamente por la investigación de cuadros de afectación neurológica. Como se detallaba en la tabla IV.2 la mayoría de estos procesos enterovirales fueron meningitis; hubo un caso de encefalitis por una cepa NT y dos casos de PFA por CVA4 y E21.

Hay otros serotipos, como CVB1-3, E25 ó EV75 que se encontraron principalmente asociados a cuadros no localizados en el SNC. En la tabla IV.8 se aporta una descripción más detallada de estos cuadros que no afectaban al SNC, donde hay que destacar que el 64% de los casos se produjeron en pacientes menores de 1 año.

Tabla IV.8. Características clínico-epidemiológicas de las 42 infecciones no neurológicas por enterovirus (1988-2006)

Serotipo EV	Nº aislados	Edad (años)	Fecha aislamiento	Síndrome clínico
CVB1	4	1	Feb 1990	IRA
		<1	Feb 1990	Síndrome febril
		<1	Mar 1990	Síndrome febril
		30	May 1990	Síndrome febril
CVB2	1	6	Jun 1988	IRA
CVB3	2	42	Ene 1988	IRA
		<1	Jun 1991	IRA
CVB5	2	55	Feb 1990	Exantema
		2	Mar 2004	Síndrome febril
E3	1	1	Ene 2006	Síndrome febril
E5	1	<1	Nov 2004	IRA
E6	1	1	Sep 1991	Síndrome febril
E7	3	<1	Mar 2005	Síndrome febril
		<1	Abr 2005	Síndrome febril
		<1	May 2005	IRA
E9	2	6	Abr 1990	Síndrome febril
		1	Jun 2006	IRA
E13	1	17	Ago 2000	IRA
E17	1	5	Abr 1991	Síndrome febril
E18	1	<1	Ago 2004	Síndrome febril
E25	2	<1	Nov 1991	IRA
		<1	Sep 2005	Síndrome febril
E30	5	2	Jun 1988	Síndrome febril
		<1	May 2000	IRA
		<1	May 2000	IRA
		<1	May 2000	Síndrome febril
EV75	3	22	Mar 2004	Exantema
		<1	Dic 2005	IRA
		<1	Ene 2006	Diarrea
		<1	Feb 2006	Síndrome febril
PV1	3	<1	Mar 1990	IRA
		<1	Sep 1998	IRA
		2	Mar 2004	IRA
PV2	2	<1	Feb 1992	Diarrea
		<1	Dic 2001	IRA
PV3	1	<1	Dic 1988	IRA
NT	6	2	Nov 2000	Síndrome febril
		25	Abr 2004	Exantema (MPB)
		<1	Ago 2005	Síndrome febril
		2	Ago 2005	Exantema
		<1	Ago 2005	Miopericarditis
		4	Jun 2006	IRA

Abreviaturas: IRA, infección respiratoria aguda; CVB coxsackievirus B; E, echovirus; EV75, enterovirus 75; PV, poliovirus; NT, no tipable; MPB, enfermedad mano-pie-boca.

IV.2. OPTIMIZACIÓN DEL CULTIVO CELULAR

IV.2.1. Comparación de líneas celulares valorando la producción de efecto citopático (ECP) en cultivo tradicional

IV.2.1.1. Evaluación de IFI y RT-PCR para la detección del crecimiento en cultivo celular

Para constatar la viabilidad de las 31 cepas utilizadas en los ensayos, se realizó cultivo tradicional en todas las líneas celulares empleadas y se incubó durante 10 días. Los 31 serotipos distintos evaluados crecieron en alguna de las líneas celulares tras 10 días de incubación.

La RT-PCR del sobrenadante de cultivo fue la técnica que detectó un mayor número de serotipos en todas las líneas celulares; todas las cepas positivas por RT-PCR incluían aquellas que fueron positivas por alguno de los otros procedimientos (ECP o IFI). El número de serotipos detectados mediante RT-PCR fue considerado el **número total de referencia** capaz de crecer en cada línea celular, es decir, 31 para RD y Caco-2, 26 para Vero y NCI-H292 y 23 para MRC-5.

Las cifras de la detección del crecimiento enteroviral mediante ECP, IFI o RT-PCR se muestran en la tabla IV.9. Se reflejan los agentes detectados de los 31 ensayados en cada caso, así como el porcentaje de crecimiento en cada línea celular. Además se muestra el porcentaje de detección de cada técnica (IFI, RT-PCR) en función del número de referencia capaz de crecer en cada línea celular.

Tabla IV.9. Crecimiento de serotipos en cada línea celular. Porcentaje de crecimiento respecto a 31 serotipos utilizados (a) y respecto a serotipos capaces de crecer en cada línea (b)

	ECP	IFI	RT-PCR	TOTAL CULTIVABLE A LOS 10 DIAS
RD	28	29	31	31
(a)	90,3%	93,5%	100%	
(b)	90,3%	93,5%		
MRC5	20	14	23	23
(a)	64,5%	45,2%	74,2%	
(b)	87,0%	60,9%		
Vero	20	19	26	26
(a)	64,5%	61,3%	83,9%	
(b)	76,9%	73,1%		
Caco-2	31	29	31	31
(a)	100%	93,5%	100%	
(b)	100%	93,5%		
NCI-H292	22	21	26	26
(a)	71,0%	67,7%	83,9%	
(b)	84,6%	80,8%		

Se puede comprobar la existencia de serotipos que, a pesar de crecer, no manifestaban ECP. Estas cepas podían ser detectadas al final del periodo de incubación por IFI o PCR. Además la IFI no mostró positividad para algunas cepas que mostraban ECP, pero la PCR sí permitió detectar el crecimiento de estos virus.

Con respecto a la RT-PCR, la IFI mostró una sensibilidad general del 79,4%. El 90,3% (28/31) de los serotipos detectados por PCR fueron visualizados mediante IFI en RD, el 60,9% (14/23) en MRC-5, 73,1% (19/26) en Vero, 83,9% (26/31) en Caco-2 y 84% (21/25) en NCI-H292.

IV.2.1.2. Sensibilidad analítica de cada línea celular valorando el ECP

El primer ensayo realizado para valorar la capacidad de las cinco líneas celulares a estudiar para permitir el crecimiento de los distintos enterovirus, se basó en el cultivo tradicional y la visualización del ECP producido a lo largo de 10 días de incubación, utilizando 31 serotipos diferentes de enterovirus. Se establecieron 4 categorías de manifestación del ECP, dato que fue registrado cada día del estudio, para luego permitir el análisis.

Los datos generales de crecimiento se muestran en los gráficos de las figuras IV.9.a y IV.9.b. Estos diagramas de caja representan los resultados obtenidos para los 31 serotipos ensayados con respecto a la sensibilidad de las 5 líneas para manifestar ECP. Concretamente en la figura IV.9.a se describen los datos referentes al día de detección del ECP que se manifestaba en el 0-25% de las células del cultivo, es decir, el día que aparecía cualquier tipo de ECP en los ensayos. En la figura IV.9.b se muestran los datos correspondientes al día que se detectaba un ECP máximo, que afectaba al 75-100% de la monocapa.

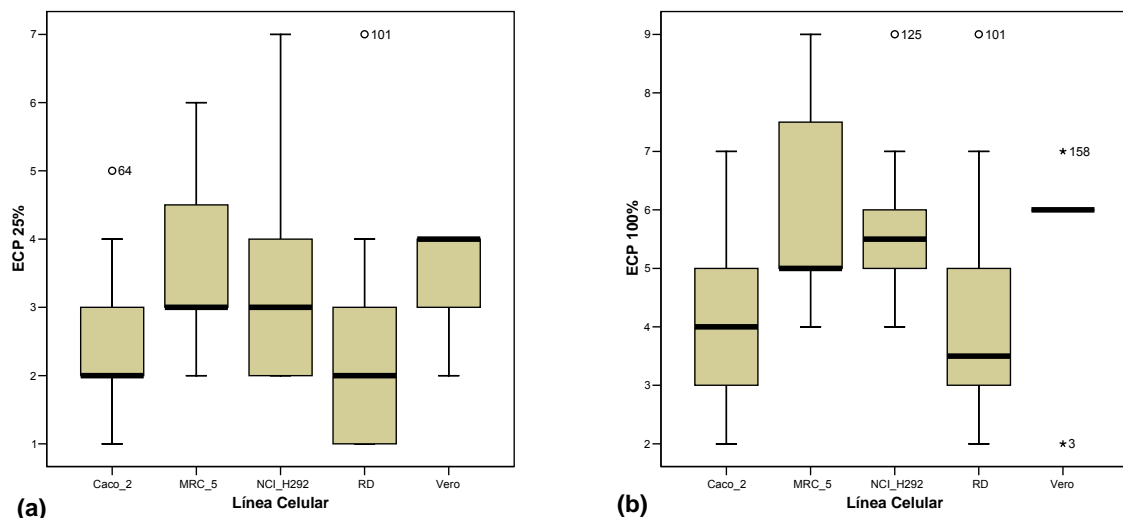


Figura IV.9. (a) Día de detección de ECP 0-25% en las cinco líneas celulares
(b) Día de detección de ECP 75-100% en las cinco líneas celulares

Las cajas del diagrama representan los datos situados entre los percentiles 25 y 75, junto con la mediana en forma de línea más gruesa.

En general, RD y Caco-2 son las líneas celulares donde aparece más precozmente el ECP y éste progresa más rápidamente. La aparición del ECP se produce mayoritariamente antes de los 3 días en Caco-2 y RD con los 31 serotipos estudiados, mientras que la línea celular Vero, parece ser donde más difícilmente se manifiesta cualquier tipo de ECP.

Los datos referentes al ECP 75-100% (figura IV.9.b) se pueden interpretar de manera similar a la gráfica IV.9.a, con RD y Caco-2 destacadas por encima de las otras tres líneas ensayadas.

Cuando se compara de modo general el comportamiento de las diferentes líneas entre sí (test no paramétrico de Mann-Whitney), se obtuvieron las cifras mostradas en las tablas IV.10.a y IV.10.b. En estas tablas se muestra la línea celular que mejor se comportó en la parte superior y en el lateral izquierdo con la que se confrontó en el test.

Tabla IV.10.a. Comparación GENERAL de la manifestación de ECP 0-25% entre las cinco líneas ensayadas con 31 serotipos distintos de enterovirus

p	RD	MRC-5	Vero	Caco-2	NCI-H292
RD	-	-	-	0,533	-
MRC-5	0,012	-	-	0,003	-
Vero	<0,001	<0,001	-	<0,001	0,013
Caco-2	-	-	-	-	-
NCI-H292	0,004	0,471	-	0,002	-

Tabla IV.10.b. Comparación GENERAL de la manifestación de ECP 75-100% entre las cinco líneas ensayadas con 31 serotipos distintos de enterovirus

p	RD	MRC-5	Vero	Caco-2	NCI-H292
RD	-	-	-	0,171	-
MRC-5	<0,001	-	-	0,011	-
Vero	0,006	0,213	-	0,019	0,152
Caco-2	-	-	-	-	-
NCI-H292	<0,001	0,623	-	0,011	-

RD y Caco-2 fueron significativamente mejores que las tres líneas restantes ($p=0,019-0,001$). Sin embargo, entre estas dos líneas no hubo diferencias estadísticamente significativas ($p=0,171$).

Al estudiar los distintos grupos de enterovirus ensayados por separado (tablas IV.11, IV.12 y IV.13), estos datos se mantuvieron, constatando que RD y Caco-

2 eran las mejores líneas que podíamos emplear para detectar el ECP producido por echovirus, coxsackievirus A y otros enterovirus. En el caso de coxsackievirus B, Caco-2 se mostró mejor de forma significativa ($p=0,003-0,004$) respecto a RD, para manifestar el crecimiento en forma de ECP.

Tabla IV.11.a. Comparación (ECHOVIRUS) manifestación ECP 0-25% entre las cinco líneas ensayadas (n=18)

p	RD	MRC-5	Vero	Caco-2	NCI-H292
RD	-	-	-	0,117	-
MRC-5	<0,001	-	-	0,002	-
Vero	<0,001	0,006	-	<0,001	0,038
Caco-2	-	-	-	-	-
NCI-H292	0,002	0,932	-	0,017	-

Tabla IV.11.b. Comparación (ECHOVIRUS) manifestación ECP 75-100% entre las cinco líneas ensayadas (n=18)

p	RD	MRC-5	Vero	Caco-2	NCI-H292
RD	-	-	-	0,114	-
MRC-5	<0,001	-	-	0,002	-
Vero	<0,001	0,002	-	<0,001	0,062
Caco-2	-	-	-	-	-
NCI-H292	<0,001	0,241	-	<0,001	-

Tabla IV.12.a. Comparación (COXSACKIEVIRUS A) manifestación ECP 0-25% entre las cinco líneas ensayadas (n=4)

p	RD	MRC-5	Vero	Caco-2	NCI-H292
RD	-	-	-	0,671	-
MRC-5	0,558	-	-	0,543	0,374
Vero	0,036	0,083	-	0,024	0,376
Caco-2	-	-	-	-	-
NCI-H292	0,651	-	-	0,539	-

Tabla IV.12.b Comparación (COXSACKIEVIRUS A) manifestación ECP 75-100% entre las cinco líneas ensayadas (n=4)

p	RD	MRC-5	Vero	Caco-2	NCI-H292
RD	-	-	-	0,743	-
MRC-5	0,729	-	-	0,572	-
Vero	0,053	0,134	-	0,054	0,134
Caco-2	-	-	-	-	-
NCI-H292	0,432	0,635	-	0,309	-

Tabla IV.13.a. Comparación (COXSACKIEVIRUS B) manifestación ECP 0-25% entre las cinco líneas ensayadas (n=6)

p	RD	MRC-5	Vero	Caco-2	NCI-H292
RD	-	-	-	0,004	-
MRC-5	0,022	-	0,007	0,001	0,059
Vero	0,627	-	-	0,003	-
Caco-2	-	-	-	-	-
NCI-H292	0,315	-	0,411	0,003	-

Tabla IV.13.b. Comparación (COXSACKIEVIRUS B) manifestación ECP 75-100% entre las cinco líneas ensayadas (n=6)

p	RD	MRC-5	Vero	Caco-2	NCI-H292
RD	-	-	-	0,003	-
MRC-5	0,317	-	0,140	0,002	0,140
Vero	0,528	-	-	0,008	-
Caco-2	-	-	-	-	-
NCI-H292	0,598	-	0,924	0,003	-

IV.2.1.3. Espectro de crecimiento en cada línea celular valorando el ECP

No todas las líneas celulares fueron capaces de soportar el crecimiento del mismo número de serotipos evaluados, por ello, hay que considerar, además de la sensibilidad evaluada anteriormente, el espectro que presenta cada línea celular para permitir la replicación de los diferentes serotipos.

En la tabla IV.9 se observaba que los 31 serotipos sólo fueron capaces de crecer en RD y Caco-2, mientras que en MRC-5, Vero y NCI-H292, crecieron 23, 26 y 26 de estos agentes, respectivamente. Comparando como y cuando aparecía el ECP a lo largo del periodo de incubación en los diferentes ensayos, se vió que RD era más susceptible a ser infectada por 16 de los 31 serotipos, Caco-2 para 12 de ellos, MRC-5 para uno y hubo dos serotipos que crecieron por igual en RD y Caco-2, como se detalla en la tabla IV.14.

Tabla IV.14. Línea celular óptima para la manifestación de ECP de 31 serotipos de enterovirus

Línea celular óptima por serotipos	RD	Caco-2	MRC-5	RD y Caco-2
	16 serotipos	12 serotipos	1 serotipo	2 serotipos
	E1, 3-7, 9, 13, 14, 17, 21, 25, 30	E18, 20, 24	CVA24	E11, E33
	CVA4, EV69, EV71	EV75		

En las figuras IV.10 (a-d) se pueden observar cuatro ejemplos de los distintos patrones de crecimiento observados, según la línea celular más proclive a la infección por un determinado serotipo.

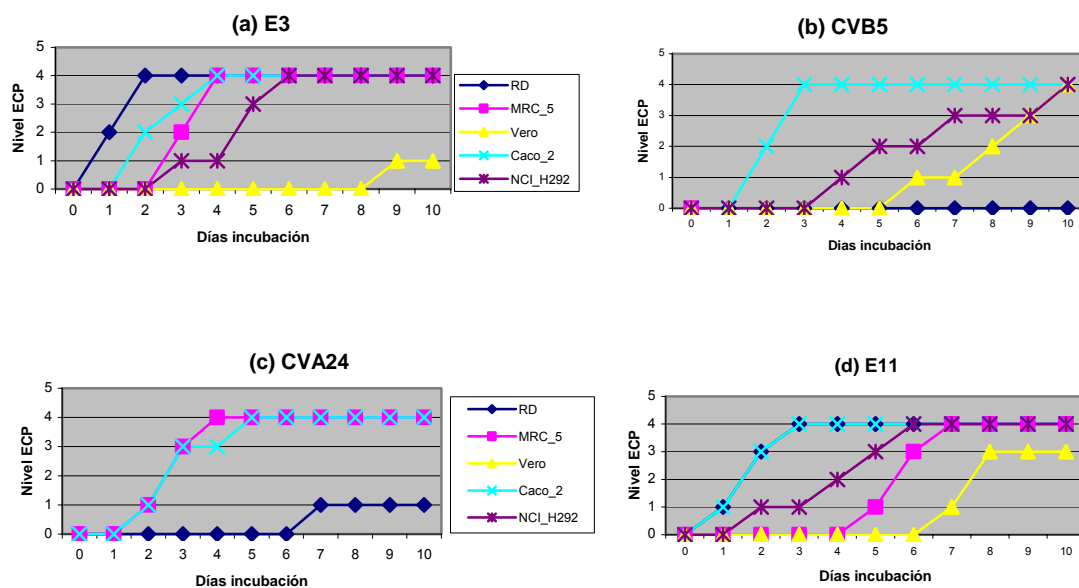


Figura IV.10. Manifestación de ECP durante 10 días de incubación, según 4 categorías establecidas: 1 (0-25%), 2 (25-50%), 3 (50-75%), 4 (75-100%) (a) E3, mejor línea RD (b) CVB5, mejor línea Caco-2 (c) CVA24, mejor línea MRC-5 (d) E11, igual comportamiento de RD y Caco-2

Contrastando por tanto los datos de sensibilidad y de espectro de infección se puede decir que RD y Caco-2 son las líneas celulares más adecuadas para estudiar la presencia de enterovirus en muestras clínicas, cuando el cultivo se realiza en tubo tradicional y valorando la aparición de ECP.

IV.2.2. Comparación de líneas celulares mediante inmunofluorescencia indirecta (IFI) valorando el número de focos fluorescentes en *shell vial* (SV)

IV.2.2.1. Sensibilidad analítica de cada línea celular según IFI

El segundo método empleado para comparar la sensibilidad de las cinco líneas celulares fue la detección del crecimiento mediante IFI. El estudio comparativo se realizó mediante cuantificación de focos fluorescentes en la monocapa teñida tras 24 h y 48 h de incubación de los cultivos. Se registró el carácter negativo o positivo de cada preparación, así como el número de células positivas por campo de 40x según esta técnica, para luego permitir el análisis.

En los gráficos IV.11.a y IV.11.b, se muestran los datos generales obtenidos en estos ensayos, mediante diagramas de cajas que recogen la distribución de las cuantificaciones realizadas para cada línea celular en los estudios realizados con los 31 serotipos de enterovirus. Los diagramas de caja resumen una única variable numérica (nº de focos fluorescentes) dentro de las categorías de otra variable

(cada línea celular) y muestran la mediana, el rango intercuartil, los valores atípicos y los casos extremos.

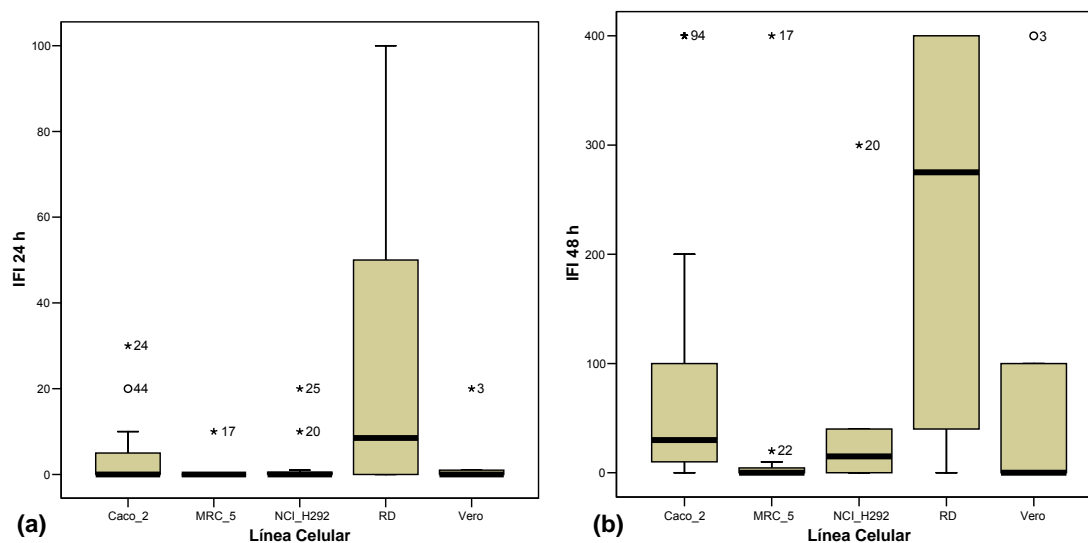


Figura IV.11. (a) Número de focos fluorescentes visualizados en las cinco líneas celulares (24 h)
(b) Número de focos fluorescentes visualizados en las cinco líneas celulares (48 h)

La gráfica que representa los datos obtenidos a las 24 h, muestra la línea celular RD como aquella donde aparece un mayor número de ensayos positivos, con un gran porcentaje de los mismos mostrando cifras de positividad entre 10 y 50 focos fluorescentes por campo. Caco-2 mostró algunos ensayos positivos, con un menor rango de puntos fluorescentes visualizables, mientras que las restantes líneas celulares no mostraron positividad en la mayoría de estos experimentos incubados únicamente 24 h.

Los datos obtenidos tras 48 h de incubación, corroboraron que RD fue la línea más susceptible a ser infectada y detectada mediante IFI, con unas cifras cuya mediana se situó en 275 focos fluorescentes y un 50% de tinciones que mostraron alta positividad (275-400 focos fluorescentes/campo). Además la incubación durante 48 h, incrementó las diferencias entre las restantes líneas, mostrando a Caco-2 como la segunda mejor línea y en un tercer lugar a NCI-H292 y Vero, que parecían mejores que MRC-5.

Al igual que en la valoración de la sensibilidad en función de la manifestación del ECP, los datos mostrados en los gráficos fueron sometidos al test no paramétrico de Mann-Whitney, para comparar las cifras de focos fluorescentes/campo 40x obtenidas en los diferentes ensayos con los 31 serotipos inoculados sobre cada una de las líneas celulares. En las tablas IV.15.a y IV.15.b aparecen representadas las

cifras de significación estadística obtenidas de modo general tras la aplicación de este test sobre los datos obtenidos tras 24 h y 48 h de incubación. En las tablas se muestra la línea celular que mejor se comportó en la parte superior y en el lateral izquierdo con la que se confrontó en el test.

Tabla IV.15.a. Comparación GENERAL de la cuantificación de focos fluorescentes entre las cinco líneas (24 h) con 31 serotipos distintos de enterovirus

p	RD	MRC-5	Vero	Caco-2	NCI-H292
RD	-	-	-	-	-
MRC-5	<0,001	-	0,558	0,004	0,306
Vero	<0,001	-	-	0,011	0,644
Caco-2	0,039	-	-	-	-
NCI-H292	<0,001	-	-	0,033	-

Tabla IV.15.b. Comparación GENERAL de la cuantificación de focos fluorescentes entre las cinco líneas (48 h) con 31 serotipos distintos de enterovirus

p	RD	MRC-5	Vero	Caco-2	NCI-H292
RD	-	-	-	-	-
MRC-5	<0,001	-	-	<0,001	0,102
Vero	<0,001	0,164	-	<0,001	0,010
Caco-2	0,080	-	-	-	-
NCI-H292	<0,001	-	-	0,001	-

RD mostró de manera significativa las mejores cifras de sensibilidad tanto a las 24 h ($p=0,001-0,039$), como a las 48 h ($p<0,001$) de incubación, respecto a las cuatro líneas celulares restantes, excepto al confrontarla con Caco-2 tras 48 h de incubación, donde la diferencia a su favor no logró significación estadística ($p=0,08$).

En cuanto al resto de líneas celulares, Caco-2 fue también significativamente mejor que el resto de líneas (MRC-5, Vero y NCI-H292) tanto en los ensayos realizados a las 24 h ($p=0,004-0,033$), como en aquellos practicados a las 48 h ($p\leq 0,001$). Entre las tres líneas celulares restantes, NCI-H292 parecía mostrar las mejores cifras en la comparativa por IFI, sin embargo, esa mejora únicamente fue significativa respecto a Vero en el experimento en el que se incubaron los cultivos 48 h ($p=0,01$). Por lo demás, no hubo diferencias importantes entre los resultados obtenidos con MRC-5 y Vero, de hecho a las 24 h esta segunda línea parecía mejorar los resultados de la primera, mientras que a las 48 h se invertía la tendencia, siendo $p=0,558$ y $p=0,164$, respectivamente, no significativos.

En las tablas IV.16 y IV.17 se muestran los resultados referentes a la IFI, atendiendo a los distintos grupos de enterovirus (echovirus y coxsackievirus B),

observándose las mismas tendencias que en los datos generales. Si bien, hay que resaltar el mejor comportamiento que presentó Caco-2 para permitir el crecimiento de CVB, ya que en los resultados obtenidos a las 48 h mostró cifras mejores que MRC-5, Vero y NCI-H292 de forma estadísticamente significativa ($p=0,007$). Sin embargo, aunque la cuantificación mediante IFI fue mayor que en RD, esa diferencia no fue significativa ($p=0,29$). Los resultados obtenidos con coxsackievirus A no se muestran ya que no resultaron significativos para ninguna línea celular.

Tabla IV.16.a. Comparación con ECHOVIRUS de la cuantificación de focos fluorescentes entre las cinco líneas tras 24 h de incubación (n=18)

p	RD	MRC-5	Vero	Caco-2	NCI-H292
RD	-	-	-	-	-
MRC-5	<0,001	-	-	0,020	0,297
Vero	<0,001	0,553	-	0,053	0,636
Caco-2	0,023	-	-	-	-
NCI-H292	0,001	-	-	0,138	-

Tabla IV.16.b. Comparación con ECHOVIRUS de la cuantificación de focos fluorescentes entre las cinco líneas tras 48 h de incubación (n=18)

p	RD	MRC-5	Vero	Caco-2	NCI-H292
RD	-	-	-	-	-
MRC-5	<0,001	-	-	<0,001	0,198
Vero	<0,001	0,282	-	<0,001	0,060
Caco-2	0,046	-	-	-	-
NCI-H292	<0,001	-	-	0,002	-

Tabla IV.17.a. Comparación con COXSACKIEVIRUS B de la cuantificación de focos fluorescentes entre las cinco líneas tras 24 h de incubación (n=6)

p	RD	MRC-5	Vero	Caco-2	NCI-H292
RD	-	-	-	0,591	-
MRC-5	0,14	-	-	0,058	-
Vero	0,14	-	-	0,058	-
Caco-2	-	-	-	-	-
NCI-H292	0,14	-	-	0,058	-

Tabla IV.17.b. Comparación con COXSACKIEVIRUS B de la cuantificación de focos fluorescentes entre las cinco líneas tras 48 h de incubación (n=6)

p	RD	MRC-5	Vero	Caco-2	NCI-H292
RD	-	-	-	0,290	-
MRC-5	0,022	-	-	0,007	-
Vero	0,022	-	-	0,007	-
Caco-2	-	-	-	-	-
NCI-H292	0,022	-	-	0,007	-

Por tanto, la sensibilidad evaluada mediante IFI demostró que RD era la mejor línea celular para ser infectada por los distintos serotipos ensayados, excepto para CVB, donde RD y Caco-2 tuvieron un comportamiento similar.

IV.2.2.2. Espectro de crecimiento en cada línea celular utilizando IFI

Además de la sensibilidad de cada línea, hay que tener en cuenta el espectro de infección que permite cada una, para hacer un uso adecuado de las mismas en la práctica clínica.

Entre los 31 serotipos ensayados, el conjunto de líneas empleadas pudo detectar 27. Hubo 4, EV71, CVB4, A4 y A24, que no pudieron ser valorados mediante IFI, ya que no hubo ninguna línea celular en la que se detectara crecimiento tras 24 h ó 48 h, tiñendo con los anticuerpos fluorescentes. Estos cuatro agentes pudieron ser detectados en cultivos incubados durante más días o cuando se empleó la RT-PCR para revelar el crecimiento.

En la tabla IV.18 se pueden observar los porcentajes de los 31 serotipos detectables mediante IFI a las 24 h y a las 48 h en cada línea celular. Además se expresa el porcentaje detectable respecto a los serotipos cultivables en cada línea celular, según los datos del apartado IV.2.1.1 obtenidos tras incubación durante 10 días y detección mediante RT-PCR.

Tabla IV.18. Serotipos detectados mediante IFI en cada línea celular. Porcentaje de crecimiento respecto a 31 serotipos utilizados (a) y respecto a serotipos capaces de crecer en cada línea (b)

	IFI 24 h	IFI 48 h	TOTAL CULTIVABLE A LOS 10 DIAS
RD	16	26	31
(a)	51,6%	83,9%	100%
(b)	51,6%	83,9%	
MRC-5	1	6	23
(a)	3,2%	19,4%	74,2%
(b)	4,3%	26,1%	
Vero	2	2	26
(a)	6,5%	6,5%	83,9%
(b)	7,7%	7,7%	
Caco-2	10	24	31
(a)	32,3%	77,4%	100%
(b)	32,3%	77,4%	
NCI-H292	3	11	26
(a)	9,7%	35,5%	83,9%
(b)	11,5%	42,3%	

A partir de estos datos se puede comprobar el importante incremento de detección a las 48 h, respecto a la incubación durante 24 h en todas las líneas celulares, excepto en Vero. Además se observa que RD y Caco-2 son las líneas celulares que permiten el crecimiento de un mayor número de serotipos en estos ensayos, RD un 83,9% y Caco-2 el 77,4% de cepas utilizadas. Las tres líneas celulares restantes mostraron unos porcentajes de detección muy bajos mediante IFI, incluso después de incubar 48 h.

De los 27 serotipos que pudieron ser cultivados en SV y detectados mediante IFI tras 48 h, 26 fueron detectados en RD (todos excepto CVB2) y 24 en Caco-2 (E17, E18 y EV75 fueron negativos).

En la tabla IV.19 se detallan las líneas celulares donde cada serotipo mostró un mayor nivel de multiplicación según el recuento de focos fluorescentes. Se puede observar que RD era la línea más susceptible para ser infectada por 19 de los 31 serotipos, Caco-2 para 6 de ellos, NCI-H292 para uno. El serotipo E11 fue detectado en igual medida en RD y Caco-2.

Tabla IV.19. Línea celular óptima para el cultivo de 27 serotipos de enterovirus. Evaluación realizada por IFI

Línea celular óptima por serotipos	RD	Caco-2	NCI-H292	RD y Caco-2
	19 serotipos	6 serotipos	1 serotipo	1 serotipo
	E1, 3-7, 9, 13, 17, 18, 20, 24, 21, 25, 30 CVB6, A16, EV69, EV75	E14, E33 CVB1-3, B5	CVA9	E11

IV.2.3. Comparación de líneas celulares valorando la detección mediante RT-PCR en tiempo real del sobrenadante del SV

IV.2.3.1. Sensibilidad de cada línea celular utilizando RT-PCR en tiempo real

El tercer método para valorar el grado de crecimiento de los distintos enterovirus en estas cinco líneas celulares, fue la aplicación de RT-PCR en tiempo real al sobrenadante de los cultivos realizados en SV durante 24 h y 48 h.

Se han expuesto los resultados obtenidos en diagramas de caja (figuras IV.12.a y IV.12.b). Los resultados de los experimentos se refieren al ciclo umbral de amplificación de cada ensayo (cifra inversamente proporcional a la carga vírica del sobrenadante).

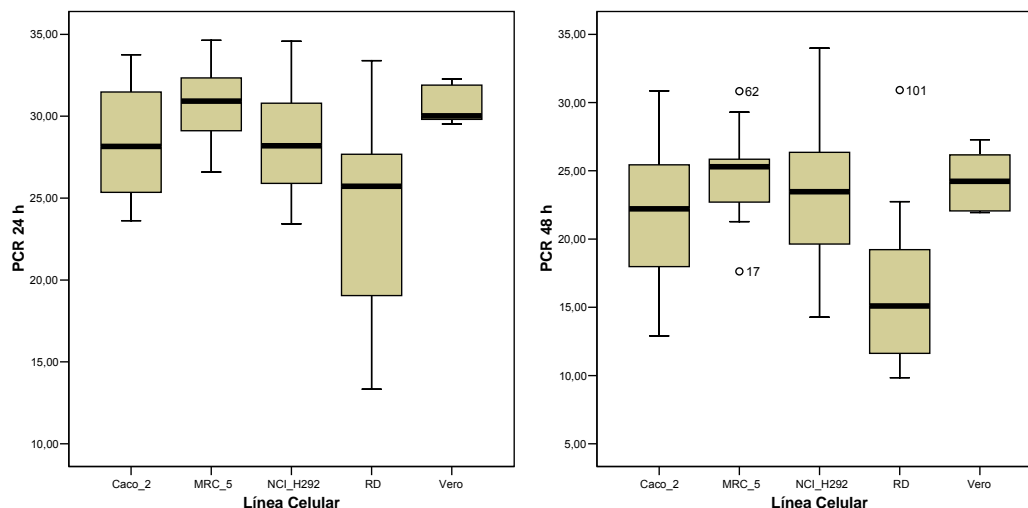


Figura IV.12. (a) Ciclo umbral de detección por PCR en tiempo real en las 5 líneas celulares (24 h)
(b) Ciclo umbral de detección por PCR en tiempo real en las 5 líneas celulares (48 h)

Los datos de estas gráficas muestran, tanto a las 24 h como a las 48 h, a la línea celular RD como aquella en que se produce una replicación más intensa de las cepas ensayadas. Al igual que sucedía en la comparación con IFI, las diferencias se incrementan a las 48 h de incubación. En ese punto se puede observar que la mediana de los datos obtenidos en RD se situó en torno al ciclo 15 y la mayoría de resultados positivos de los experimentos donde se detectó crecimiento consiguieron mostrar amplificación por debajo del ciclo 20. En un segundo lugar en cuanto a este nivel replicativo se situó Caco-2 con una mediana en torno al ciclo 22 y el grueso de datos por debajo del ciclo 25. La línea NCI-H292 mostró también importantes niveles de replicación de los 31 serotipos de enterovirus ensayados, casi a la par que Caco-2. MRC-5 y Vero, mostraron un grado de replicación menor, ya que los ciclos umbrales de detección eran más altos.

Se compararon las cifras de detección mediante PCR en tiempo real obtenidas en los diferentes ensayos con los 31 serotipos inoculados sobre cada una de las líneas celulares, mediante el test no paramétrico de Mann-Whitney. En las tablas IV.20.a y IV.20.b aparecen representadas las cifras de significación estadística obtenidos tras la aplicación del test sobre los datos obtenidos a las 24 h y 48 h de incubación. En las tablas se muestra la línea celular que mejor se comportó en la parte superior y en el lateral izquierdo con la que se confrontó en el test.

Tabla IV.20.a. Comparación GENERAL del ciclo umbral de detección por PCR en tiempo real entre las 5 líneas (24 h) con 31 serotipos distintos de enterovirus

p	RD	MRC-5	Vero	Caco-2	NCI-H292
RD	-	-	-	-	-
MRC-5	<0,001	-	-	0,019	0,617
Vero	<0,001	0,829	-	0,006	0,384
Caco-2	0,010	-	-	-	-
NCI-H292	<0,001	-	-	0,080	-

Tabla IV.20.a. Comparación GENERAL del ciclo umbral de detección por PCR en tiempo real entre las 5 líneas (48 h) con 31 serotipos distintos de enterovirus

p	RD	MRC-5	Vero	Caco-2	NCI-H292
RD	-	-	-	-	-
MRC-5	<0,001	-	-	0,002	0,533
Vero	<0,001	0,351	-	<0,001	0,049
Caco-2	0,003	-	-	-	-
NCI-H292	<0,001	-	-	0,008	-

Según estos datos, RD mostró de manera significativa las mejores cifras de sensibilidad tanto a las 24 h ($p \leq 0,001-0,010$), como a las 48 h ($p \leq 0,001-0,003$) de incubación, respecto a las cuatro líneas celulares restantes. Mediante PCR se observó que RD resultó más eficiente para la replicación enteroviral, que incluso Caco-2, de forma estadísticamente significativa.

La línea celular Caco-2 fue la segunda mejor en cuanto al nivel de replicación de los 31 serotipos ensayados, de forma significativa tanto a las 24 h ($p=0,006-0,019$), como a las 48 h ($p \leq 0,001-0,008$), aunque la mejora respecto a NCI-H292 sólo fue importante a las 48 h.

Entre las tres líneas celulares restantes, NCI-H292 pareció mostrar las mejores cifras en la comparativa por PCR en tiempo real, sin embargo, esa mejora únicamente fue significativa respecto a Vero en el experimento donde se incubaron los cultivos 48 h ($p=0,049$). En las restantes comparaciones realizadas, NCI-H292 pareció mejorar los resultados obtenidos con MRC-5, y éstos los conseguidos con Vero, pero sin existir diferencias significativas entre ellas ($p=0,351-0,829$).

La aplicación del este test estadístico a las cifras obtenidas por grupos de enterovirus (tablas IV.21-23), arrojaron datos similares de significación estadística a los indicados de forma general en las tablas IV.20.a y IV.20.b. Sin embargo, los datos referentes a CVB1-6 decían que la línea celular Caco-2 parecía ser aquella donde se producía una mayor replicación viral, con resultados estadísticamente superiores a los obtenidos con MRC-5, Vero y NCI-H292 en el ensayo realizado a las 48 h ($p=0,004$).

La mejora respecto a RD no se mostró superior en el test aplicado ($p=0,150$). Esta línea, RD, únicamente mostró, en los ensayos con CVB, mayor replicación que MRC-5 de forma estadísticamente significativa ($p=0,042$).

Tabla IV.21.a. Comparación con ECHOVIRUS del ciclo umbral de detección por PCR en tiempo real entre las 5 líneas tras 24 h (n=18)

p	RD	MRC-5	Vero	Caco-2	NCI-H292
RD	<0,001	-	-	-	-
MRC-5	<0,001	-	-	0,28	0,986
Vero	0,044	0,304	-	0,004	0,248
Caco-2	-	-	-	-	-
NCI-H292	0,001	-	-	0,105	-

Tabla IV.21.b. Comparación con ECHOVIRUS del ciclo umbral de detección por PCR en tiempo real entre las 5 líneas tras 48 h (n=18)

p	RD	MRC-5	Vero	Caco-2	NCI-H292
RD	<0,001	-	-	-	-
MRC-5	<0,001	-	-	0,019	0,924
Vero	0,008	0,203	-	0,001	0,200
Caco-2	-	-	-	-	-
NCI-H292	<0,001	-	-	0,023	-

Tabla IV.22.a. Comparación con COXSACKIEVIRUS A del ciclo umbral de detección por PCR en tiempo real entre las 5 líneas tras 24 h de incubación (n=4)

p	RD	MRC-5	Vero	Caco-2	NCI-H292
RD	-	-	-	-	-
MRC-5	0,043	-	-	0,248	0,248
Vero	0,021	0,885	-	0,386	0,386
Caco-2	0,248	-	-	-	-
NCI-H292	0,149	-	-	0,773	-

Tabla IV.22.b. Comparación con COXSACKIEVIRUS A del ciclo umbral de detección por PCR en tiempo real entre las 5 líneas tras 48 h de incubación (n=4)

p	RD	MRC-5	Vero	Caco-2	NCI-H292
RD	-	-	-	-	-
MRC-5	0,043	-	-	0,083	0,248
Vero	0,021	0,309	-	0,021	0,083
Caco-2	0,248	-	-	-	-
NCI-H292	0,021	-	-	0,248	-

Tabla IV.23.a. Comparación con COXSACKIEVIRUS B del ciclo umbral de detección por PCR en tiempo real entre las 5 líneas tras 24 h de incubación (n=6)

p	RD	MRC-5	Vero	Caco-2	NCI-H292
RD	-	-	-	0,173	-
MRC-5	0,061	-	0,798	0,463	0,740
Vero	0,121	-	-	0,370	-
Caco-2	-	-	-	-	-
NCI-H292	0,147	-	0,740	0,519	-

Tabla IV.23.b. Comparación con COXSACKIEVIRUS B del ciclo umbral de detección por PCR en tiempo real entre las 5 líneas tras 48 h de incubación (n=6)

p	RD	MRC-5	Vero	Caco-2	NCI-H292
RD	-	-	-	0,150	-
MRC-5	0,042	-	0,245	0,004	0,135
Vero	0,197	-	-	0,004	-
Caco-2	-	-	-	-	-
NCI-H292	0,197	-	0,986	0,004	-

De esta forma, quedó valorada la sensibilidad de las cinco líneas celulares evaluadas mediante RT-PCR en tiempo real, confirmando a RD y Caco-2 como las líneas celulares óptimas para conseguir el eficiente crecimiento de los diferentes enterovirus.

IV.2.3.2. Espectro de crecimiento en cada línea celular utilizando RT-PCR en tiempo real

El espectro de infección que permitía cada línea celular aparece detallado en la tabla IV.24. En ella se aprecia el número de serotipos distintos que se conseguían amplificar tras 24 h y 48 h de incubación en los sobrenadantes correspondientes. Además, se especifica el porcentaje detectable de los 31 serotipos evaluados, así como el porcentaje detectable respecto a los serotipos cultivables en cada línea celular según los datos obtenidos tras incubación durante 10 días y detección mediante RT-PCR.

Tabla IV.24. Serotipos detectados tras 24 h y 48 h de incubación por RT-PCR en tiempo real. Crecimiento respecto a 31 serotipos ensayados (a) y respecto a serotipos capaces de crecer en cada línea (b)

	PCR 24 h	PCR 48 h	TOTAL CULTIVABLE A LOS 10 DIAS
RD	28	30	31
(a)	90,3%	96,8%	100,0%
(b)	90,3%	96,8%	
MRC5	20	22	23
(a)	64,5%	71,0%	74,2%
(b)	87,0%	95,7%	
Vero	19	24	26
(a)	61,3%	77,4%	83,9%
(b)	73,1%	92,3%	
Caco-2	27	31	31
(a)	87,1%	100,0%	100,0%
(b)	87,1%	100,0%	
NCI-H292	22	25	26
(a)	71,0%	80,6%	83,9%
(b)	84,6%	96,2%	

En la tabla IV.24 se puede comprobar que Caco-2 fue la única línea celular en la que se pudo detectar replicación viral de los 31 serotipos ensayados tras 48 h de incubación. En RD fueron detectados 30 de ellos, únicamente CVB4 no pudo ser detectado. En ambas líneas hubo un alto número de cepas que podían ser igualmente detectadas tras sólo 24 h de incubación, 28/31 (90,3%) y 27/31 (87,1%) en RD y Caco-2, respectivamente. El resto de líneas celulares, MRC-5, Vero y NCI-H292, permitieron después de 48 h el crecimiento de 22 (71%), 24(77,4%) y 25(80,6%) serotipos de esos 31 ensayados, respectivamente. De manera que además de permitir RD y Caco-2 un crecimiento más eficiente de los distintos enterovirus, estas células eran capaces de soportar el crecimiento de una mayor variedad de serotipos en sólo 48 h de incubación.

Se puede comprobar el incremento importante de detección a las 48 h, respecto a la incubación durante 24 h en todas las líneas celulares. Si tenemos en cuenta los serotipos capaces de replicar en cada línea celular tras 10 días de incubación (número total de referencia apartado IV.2.1.1), la aplicación de RT-PCR a las 48 h, conseguía detectar en todas las líneas celulares la replicación de más del 92% de serotipos cultivables a los 10 días en cada caso. Concretamente, RD y Caco-2 capaces de hacer crecer todos los serotipos ensayados en 10 días, conseguían mostrar replicación en 48 h del 98,6% y 100% de todos ellos, respectivamente. El resto de líneas celulares también mostraron altos porcentajes de detección tras sólo 48 h de incubación, teniendo en cuenta los serotipos cultivables en cada caso. En MRC-5, 22 de los 23 agentes cultivables (95,7%) fueron detectados, en Vero 24/26 (92,3%) y en NCI-H292, 25/26 (96,2%). Por tanto, la incubación durante 48 h y posterior detección de la multiplicación viral mediante RT-PCR consiguió unas elevadas cifras de sensibilidad, independientemente de la línea celular empleada. Sin embargo, hay que tener en cuenta que no todas las líneas ofrecen el mismo espectro de crecimiento, por lo que se debe hacer una elección adecuada de las mismas para conseguir la replicación del mayor número posible de serotipos con la mayor eficiencia posible.

En la tabla IV.25 se detallan las líneas celulares donde cada serotipo mostró un mayor nivel de replicación según pudo ser detectado mediante PCR en tiempo real. Se puede observar que RD fue la línea celular óptima para 19 de los 31 serotipos y Caco-2 para 6 de ellos. El resto de serotipos tuvieron más de una línea celular óptima para crecer, ya que los ciclos umbrales de detección no presentaron grandes diferencias. E33 y CVB3 presentaron ciclos similares de detección en RD y Caco-2, mientras que CVA9 mostraba en RD y NCI-H292 una multiplicación similar.

Tabla IV.25. Línea celular óptima para 31 serotipos de enterovirus, mediante PCR en tiempo real

Línea celular óptima por serotipos	RD	Caco-2	RD y Caco-2	RD y NCI-H292
	22 serotipos	6 serotipos	2 serotipos	1 serotipo
	E1, 3-7, 9, 11, 13, 14, 17, 18, 20, 24, 21, 25, 30 CVA4, A16 EV69, EV71, EV75	CVB1-2, B4-6 CVA24	E33, CVB3	CVA9

IV.2.4. Detección mediante RT-PCR frente a detección mediante IFI en *shell vial*

Las técnicas clásicas de crecimiento viral en *shell vial* incluyen la detección del crecimiento mediante IFI de la monocapa. En nuestros ensayos se ha analizado en paralelo la detección del desarrollo viral mediante IFI y RT-PCR en tiempo real, lo cual nos ha permitido observar el incremento en cuanto a la detección que nos aportaba la biología molecular.

En todos los casos la RT-PCR consiguió revelar el crecimiento de un mayor número de serotipos; en todos los casos en que la IFI resultó positiva, también lo fue la RT-PCR. En la tabla IV.26 se aprecian las cifras de detección de ambas técnicas, así como el porcentaje de detección de la IFI respecto a la conseguida con las técnicas de ácidos nucleicos.

Tabla IV.26. Detección del crecimiento de enterovirus mediante IFI o RT-PCR tras 24 h o 48 h de incubación. Porcentaje de detección de IFI respecto a RT-PCR.

	IFI 24 h	PCR 24 h	IFI 48 h	PCR 48 h	TOTAL REFERENCIA
RD	16 57,1%	28	26 86,7%	30	31
MRC5	1 5,0%	20	6 27,3%	22	23
Vero	2 10,5%	19	2 8,3%	24	26
Caco-2	10 37,0%	27	24 77,4%	31	31
H292	3 13,6%	22	11 44,0%	25	26

Cuando se utilizan líneas celulares como MRC-5, Vero o NCI-H292, la detección mediante IFI consiguió detectar sólo 5-44% de cepas que crecían tras 24 h ó 48 h de incubación. Es importante comprobar que en las líneas celulares RD y Caco-2, donde se desarrollan un gran número de serotipos según RT-PCR a las 24 h de incubación, la IFI tampoco consigue detectar más que el 57,1% y 37% de los virus, respectivamente.

V. DISCUSIÓN

V.1. ESTUDIO CLÍNICO-EPIDEMIOLÓGICO

El primer punto abordado en los resultados de nuestro estudio es el de valorar el **número total de infecciones por enterovirus cada año** en nuestro medio. En este sentido cabe destacar lo acontecido en los años 1991, 1995, 2000 y en el año 2006, en el que los aislamientos de enterovirus fueron numerosos, 62, 57, 122 y 54 aislamientos, respectivamente. Además, se observa al carácter cíclico en la tasa de infecciones por enterovirus, cuyo aumento de incidencia suele ir asociado a la irrupción en el ambiente de algún serotipo determinado que provoca esos importantes brotes. Se ha comprobado que en 1991 el agente más implicado fue echovirus 4, en 1995 y 2006 fue E30 y en el año 2000 aparecieron dos serotipos causantes del grueso de infecciones, E13 y E30.

Estos serotipos que se presentan de forma explosiva cada cierto tiempo se comportan como **cepas epidémicas** puras (E4 ó E13) o como serotipos **endémicos** (E30, E6, E7, E9) que periódicamente reaparecen en el medio causando infección. Similares patrones de circulación han sido descritos anteriormente en Bélgica, donde E30, E11, E6, CVB3 y CVB5, fueron catalogados como agentes que se presentaban con una periodicidad cíclica cada 3-4 años (Druyts-Voets, 1997). Se ha comprobado que serotipos como E30 pueden reincidir por desaparición de anticuerpos neutralizantes o cambios genómicos que pueden hacer variar su estructura antigénica y así evadir las defensas inmunológicas que podrían haberse generado años antes (Chomel *et al.*, 2003).

Diversos autores constatan la importancia de infecciones por enterovirus en el territorio español, sobre todo con producción de meningitis, en los años 1996 y 1997 (Trallero *et al.*, 2000). Estos autores también encontraron un importante número de procesos enterovirales en 1991, 1992 y 1993, con muchos casos en 1991 producidos por E4. Ese año se produjeron una serie de brotes por este serotipo en nuestro país que dieron lugar a un gran número de cuadros meníngeos. Éstos se iniciaron en el Noreste peninsular (Teruel, febrero-marzo) y fueron recorriendo toda la cuenca mediterránea, hasta llegar al principio del verano a las provincias de Almería y Granada, afectando principalmente a la localidad de Motril (Trallero *et al.*, 2000). En nuestra zona los casos se declararon desde julio hasta noviembre, con especial actividad en el mes de agosto. Otros países europeos han comunicado igualmente especial incidencia por E4 en torno a 1991. Así en la vigilancia epidemiológica llevada a cabo en Escocia, este serotipo produjo 452 de los 525 casos de enfermedad enteroviral detectados en 1990 (Nairn y Clements, 1999).

En 1995, el serotipo aislado esencialmente en nuestro centro fue E30 (16/19), a diferencia de lo que reflejan otros estudios realizados en España y otros países europeos. Datos de aislados españoles y escoceses señalaban ese año como una temporada de baja actividad enteroviral, con E7 como serotipo dominante en España (Trallero *et al.*, 2000) y CVA9 en Escocia (Nairn y Clements, 1999). Sin embargo, datos aportados por compañeros de Cabra (Córdoba) corroboran una importante circulación en nuestra región de E30 entre 1994 y 1995, lo que demuestra el carácter variable de la epidemiología del enterovirus (López Alcalá *et al.*, 1997). Nuestros datos también recogen la presencia de E30 en Cabra en enero de 1995, para meses más tarde (mayo-noviembre) encontrar este agente como causa exclusivamente de enfermedad meníngea en Granada, Almería y Motril, con un máximo de incidencia en el mes de junio. Trallero y colaboradores comentan la extensión de este serotipo desde el Sur (Málaga) hacia el Norte de España (Santiago de Compostela, Burgos, Zaragoza) entre 1995 y 1996 (Trallero *et al.*, 2000).

En el año 2000 se produjo en nuestra región una situación de codominancia de 2 serotipos (E13 y E30), al igual que sucediera en la región francesa de Rhône-Alpes (Chomel *et al.*, 2003), donde además se observó un tercer serotipo responsable de numerosos brotes ese año, E6, que en nuestra región circuló de manera escasa. En nuestro caso, CVB5 fue el tercer serotipo más aislado, al igual que sucedía en el resto de nuestro país (Trallero y Avellón, 2004).

Ese año se comprobó, por primera vez, la circulación en nuestra región de E13 causando un importante número de meningitis asépticas, al igual que en el resto del territorio nacional (de la Loma *et al.*, 2002; Pérez *et al.*, 2003). Posteriormente, este serotipo ha causado un gran número de brotes entre 2000 y 2002 en un importante número de países. En el verano de 2000 circuló de forma significativa en Europa según los datos recogidos en países como Portugal (Correia *et al.*, 2004), Francia (Chomel *et al.*, 2003), Alemania (Diedrich y Schreier, 2001), Bélgica (Thoelen *et al.*, 2003), Israel (Somekh *et al.*, 2003) o Chipre (Richter *et al.*, 2006). El verano siguiente (2001) persistió su actividad en países europeos como Alemania (Hauri *et al.*, 2005) o Lituania (Narkeviciute y Vaiciuniene, 2004) y se extendió al continente americano, concretamente fue declarado el serotipo más numeroso aislado en Estados Unidos ese año, tras permanecer décadas silente (CDC, 2001). En 2002 se describe la misma situación en países de Asia y África, como Japón (Kobayashi *et al.*, 2005), Corea (Cheon *et al.*, 2004) y Túnez (Gharbi *et al.*, 2006). En 2003 se comunicaron brotes por este serotipo en Brasil (Dos Santos *et al.*, 2006).

En el año 2006 se han encontrado, de nuevo, numerosos casos por E30, verificando la circulación cíclica de este serotipo. Sin embargo, este año lo más reseñable ha sido que ha aparecido como segundo serotipo más frecuente en nuestra zona un agente recientemente descrito, EV75, como causa de dos cuadros meníngeos, dos infecciones respiratorias y una gastroenteritis. Este serotipo fue propuesto en 2004, a partir de la secuencia obtenida de 8 cepas no tipables mediante neutralización con los antisueros de Lim Benyesh-Melnick y conservadas desde su aislamiento 25 años atrás (Oberste *et al.*, 2004). En España (Bilbao, Barcelona y Las Palmas de Gran Canaria) se han aislado en menor número algunas cepas más, causando fundamentalmente meningitis (Avellón *et al.*, 2006). Además nuestros 5 casos por EV75 han tenido lugar durante los meses fríos, entre diciembre 2005 y mayo 2006, probablemente debido a que se asocian principalmente con cuadros no neurológicos, que en esta época se investigan en mayor profundidad buscando otros patógenos.

Se ha comentado lo acontecido en los 4 principales períodos en nuestra región con un mayor número de infecciones enterovirales, pero se pueden observar otros datos interesantes entre los serotipos más representativos de otros años. De esta manera, en 1990 se localizan 7 de las 8 infecciones por CVB1 de nuestra serie. Ese año constituye éste el serotipo mayoritario, al igual que sucedía en países cercanos como Bélgica (Druyts-Voets, 1997), donde CVB1 representó el 19,4% de enterovirus aislados en 1990.

Tras los importantes números de E4 en 1991, en el año 1992 se describen algunas infecciones más por este serotipo en los primeros meses del año (febrero-marzo), aunque sin la magnitud del año anterior. El año 1992 recoge la etapa de nuestra serie en la que las infecciones se deben a una mayor variedad de serotipos. Hasta 10 serotipos distintos se encuentran implicados en estos síndromes, como son E7, E30, CVB5 o el atípico E18 entre otros.

En España se describe una importante circulación de E9 entre 1992 y 1993, principalmente por el Norte, Centro y Este de la península inicialmente (Madrid, Palencia, Tarragona, Valencia, Murcia en 1992), extendiéndose al Sur el año siguiente (Ciudad Real, Málaga) (Trallero *et al.*, 2000), aunque continúa su actividad en ciudades más al Norte, como Burgos (Cobos *et al.*, 1994). Nosotros observamos la presencia de E9 en dos casos declarados en 1993.

En 1998 un serotipo destaca sobre los demás, E6, que dio lugar a 5 casos de meningitis localizados todos ellos en junio en la localidad de Baza. Este agente había

producido en 1997 los más numerosos brotes asociados a un único serotipo en una única temporada en España, comenzando en invierno de 1997 en Bilbao, extendiéndose al Noroeste (Burgos) en primavera y llegando al centro de la península (Alcalá de Henares) en verano (Trallero *et al.*, 2000). Por tanto, nuestros aislados podrían proceder de una extensión hacia el Sur de España de esa epidemia o, menos probablemente, a un brote local no relacionado con el anterior.

El serotipo E6 reapareció en 2001 como agente principal de la infección enteroviral, reproduciéndose en el período 2000-2001 la situación de los años 1995-1997, en el que la circulación mayoritaria de E30 se ve desplazada por la presencia de E6, como comentan otros autores utilizando los datos del conjunto del país (Trallero y Avellón, 2004).

Tras 10 años silente, en 2002 reaparece E4 después de los brotes de meningitis aséptica causados en 1991, aunque con una virulencia mucho menor. En 2003, se transforma de nuevo el panorama enteroviral, emergiendo nuevos y viejos serotipos mayoritariamente, E9, E30, E11 y algunos agentes raros, como E5, E20 ó E21. El serotipo E11, que según algunos autores es causa frecuente (hasta el 70% de cuadros) y grave de enfermedad neonatal (Magnius *et al.*, 1990; Druyts-Voets, 1997), parece presentar patrones cíclicos de circulación en nuestro país, con brotes documentados en 1993, 1996, 1999 y 2003 (Trallero y Avellón, 2004). Nuestra investigación sólo cuenta con 5 aislamientos realizados estos años, fundamentalmente en los años 1985 y 2003.

Por último, en los años 2004 y 2005, hubo un serotipo que destacó entre los demás, E7, y otro que se aisló en menor número también ambas temporadas, CVA9. El agente E7 es otro de los serotipos más numerosos de nuestra serie y su presencia se ha detectado en 1992, 1995, 2004 y 2005. En 1995 fue el serotipo mayoritario aislado en España (Trallero *et al.*, 2000), mientras que en 1992 distó mucho de ser un agente relevante en nuestro país, causando sólo 3 de los 198 casos registrados ese año (Trallero *et al.*, 2000). Estos datos de 1992 podrían corresponderse con un brote a nivel regional, por una cepa proveniente quizás del norte de África, ya que E7 fue el segundo serotipo más importante en Túnez (24%) ese año (Bahri *et al.*, 2005). Esto sólo podría ser confirmado mediante estudios moleculares de las cepas de uno y otro lado del Mediterráneo.

En conjunto, estos datos de la **epidemiología enteroviral**, parecen señalar una gran variabilidad en la tasa de infecciones por enterovirus a lo largo del tiempo, con muy diversos serotipos implicados en las mismas. Hace años se comprobó que

estudios epidemiológicos nacionales en EEUU mostraban datos que no se correspondían con las cifras aportadas en epidemias locales muchas veces, ya que los datos de serotipos que describía el CDC eran la suma de multitud de brotes locales (Moore *et al.*, 1984). A nivel geográfico, nuestros datos coinciden, aunque no siempre, con los mostrados por otros autores españoles (Trallero *et al.*, 2000; Pérez *et al.*, 2003) y contrastan más con otros grupos europeos (Druyts-Voets, 1997) y por supuesto de otros continentes tan cercanos como el africano (Gharbi *et al.*, 2006). Estos hechos ponen de manifiesto las diferencias geográficas que muestran los enterovirus circulantes, lo que ha sido resaltado anteriormente por otros autores en otros países, por ejemplo Hovi y colaboradores en Finlandia encontraban una proporción muy superior de ciertos serotipos en comparación con los aislados en EEUU y otros países (Hovi *et al.*, 1996).

No obstante, se detectan ocasionalmente cepas con un carácter más o menos pandémico, que no cumplen con la tesis de extrema variabilidad temporal y geográfica de los enterovirus. Los dos ejemplos más relevantes en este sentido, han sido en nuestra región E4 en 1991 y E13 en 2000, causantes de sendos brotes de meningitis aséptica a nivel casi mundial en un corto espacio de tiempo. También se han descrito entre 2002 y 2004 numerosos brotes en los cinco continentes de conjuntivitis aguda hemorrágica por CVA24, que sin embargo, no ha sido detectado en nuestro estudio (Oh *et al.*, 2003; CDC, 2004; Tavares *et al.*, 2006; Triki *et al.*, 2007).

De esta manera, observamos la existencia de serotipos con un carácter más endémico, E30, E6, E9, CVB5, que presentan un patrón de brotes de presentación cada 3-4 años y aislamientos esporádicos los años intermedios para la mayoría de ellos, como han expresado otros autores para estos mismos serotipos (Druyts-Voets, 1997; Trallero y Avellón, 2004). Mientras que hay otros que muestran un comportamiento explosivo, E4 ó E13, que aparecen en el medio tras años de ausencia con una incidencia extrema para luego otra vez desaparecer de la circulación (Nairn y Clements, 1999; Trallero *et al.*, 2003).

Otro hecho que observamos en nuestra serie fue la descripción de varios casos de infección enteroviral asociada a alguno de los serotipos de poliovirus. Éstos fueron aislamientos de cepas vacunales, aspecto que han comentado repetidamente diversos autores (Nairn y Clements, 1999; Trallero *et al.*, 2006), debido a la excreción del virus durante un período prolongado (5-6 semanas) a través de las secreciones respiratorias o las heces. Reina y colaboradores llegaron a identificar un 25% de sus aislamientos de enterovirus como pertenecientes al grupo de poliovirus en el año 2000 (Reina *et al.*, 2000). Se trata de un hecho habitual que se producía en nuestro

país hasta el abandono de la vacuna oral de Sabin y su sustitución en 2004 por el preparado inactivado de Salk, por lo que estos aislamientos que consideramos casuales se han dejado de producir en el último período de nuestro estudio.

Al estudiar los **grupos de enterovirus** aislados destaca el 72,4% de echovirus detectados, seguido de los coxsackievirus B (12,3%). En el primer grupo destacaban E30 (34%), E4 (25%) y E6 (11%), mientras que en el segundo el mayoritario era CVB5 (43%). No se produjeron demasiados aislamientos de coxsackievirus A, pero en este grupo hubo un agente predominantemente aislado, CVA9. Estas cifras son similares a las expresadas en otros estudios realizados en España (Reina *et al.*, 2000; Trallero *et al.*, 2000) y en Europa (Druyts-Voets, 1997; Nairn y Clements, 1999), en todos ellos los echovirus suponen un 67-83% de enterovirus aislados con E30 como exponente principal. Además CVB5 y CVA9 suelen ser también los principales agentes aislados de sus respectivos grupos. De todas formas, la realización del diagnóstico en cultivo celular (donde crecen mal o no lo hacen muchos agentes del grupo CVA) hace que nuestras cifras puedan diferir respecto a datos antiguos de otros países, donde se inoculaban ratones lactantes para cultivar los enterovirus (Chambon *et al.*, 2001). En este sentido, la aplicación de técnicas de biología molecular para el diagnóstico de estos síndromes o el empleo de líneas celulares mejores podría permitirnos localizar infecciones asociadas a esos serotipos de difícil crecimiento en cultivo celular (Chambon *et al.*, 2001).

Se utilizaron 3 **técnicas para el serotipado** de los enterovirus, IFI, secuenciación y neutralización. La IFI fue la técnica utilizada mayoritariamente (70%), seguida de la secuenciación (31%), mientras que un 5% de las cepas fueron determinadas mediante el método clásico de neutralización con antisueros de Lim-Benyesh-Melnick. Al realizar el serotipado mediante varias técnicas para algunos aislados se pudo comprobar que la IFI produjo numerosos falsos negativos para E30 y en menor medida para PV2, E6 ó E9, como ya indicaron Rignonan y colaboradores en la evaluación de los reactivos que se utilizaron en nuestra IFI (Rignonan *et al.*, 1998). Por el contrario, no observamos ningún caso de falso positivo mediante IFI. Teniendo en cuenta los serotipos identificables por IFI (16 en total) y los detectados en nuestro estudio (29 serotipos distintos), se observa que un importante número de serotipos no se habrían podido identificar por IFI, por lo que se hace necesaria la utilización de técnicas de secuenciación para la caracterización de brotes, principal objetivo del serotipado de enterovirus.

En cuanto al reactivo de IFI de género, detectamos una cepa de EV71 que no pudo ser identificada por este método, como se ha comentado en algunos trabajos

(Rigonan *et al.*, 1998; Van Doornum y De Jong, 1998), ya que los anticuerpos monoclonales pan-enterovirus empleados no son capaces de unirse a la proteína VP1 de este serotipo.

Además de los 29 serotipos distintos encontrados en nuestra serie, hubo 61 cepas no tipables tras llevar a cabo el serotipado mediante las tres técnicas comentadas. Este hecho podría deberse a la degradación de algunos agentes tras haber estado almacenados durante años, la existencia de fenómenos de recombinación que pueden alterar el genoma viral (Lukashev, 2005) o la utilización de *primers* incapaces de unirse al genoma de todos los enterovirus. Éste puede ser un hecho importante, ya que la región utilizada para secuenciar y determinar el serotipo es una porción de VP1, que codifica para una proteína expuesta al ambiente y que muestra cambios en su estructura con el paso del tiempo. Los cebadores que utilizamos están degenerados para unirse al máximo de serotipos posibles, lo que puede perjudicar a la sensibilidad de la técnica, ya que se pueden amplificar productos inespecíficos que camuflen el producto viral. Para evitar eso, podríamos utilizar otras técnicas recientemente descritas que son capaces de amplificar individualmente cada grupo de enterovirus (Oberste *et al.*, 2006) u otras regiones del genoma (VP3-VP1) con *primers* con menos contenido en inosina, a la vez que mantenemos el espectro de identificación y una alta sensibilidad (Nix *et al.*, 2006). En este sentido cabe destacar el importante número de casos declarados en el mundo en los últimos años de infección por CVA24v, a pesar de que nosotros no hemos podido describir ninguno. Las cepas implicadas en esos brotes corresponden a una variante del virus (CVA24v) que no puede ser amplificada con los cebadores utilizados en nuestro estudio para amplificar VP1, según la información facilitada por los compañeros del Centro Nacional de Microbiología.

Otras cepas no tipables de nuestra colección podrían corresponder a picornavirus con características clínicas y de crecimiento en cultivo celular similar a los enterovirus, como son los parechovirus 1-4, que en la actualidad sólo podrían ser caracterizados mediante técnicas de PCR específicas para estos agentes (Corless *et al.*, 2002). Estos agentes, podrían ser catalogados como enterovirus, pero luego no corresponderían a ningún serotipo. Algunos autores han comentado la alta frecuencia con que se pueden encontrar estos agentes en clínica humana, en Holanda un 12% de supuestos enterovirus aislados en cultivo celular fueron posteriormente caracterizados como parechovirus (Benschop *et al.*, 2006b) y en Japón la seroprevalencia en niños es del 15% y a los 30 años llega al 80% (Ito *et al.*, 2004).

Las infecciones por enterovirus tienen una elevada prevalencia, con una estimación superior al billón de infecciones cada año a nivel mundial (Oberste *et al.*, 2000). Sin embargo, suelen producir mayoritariamente infecciones asintomáticas o leves y su estudio diagnóstico suele producirse únicamente en las infecciones más graves, como es el caso de la meningitis, encefalitis o miopericarditis, lo que dificulta conocer los datos reales de su incidencia (Romero y Rotbart, 2003). Los estudios virológicos pueden no ser muchas veces coste-beneficio favorables, por lo que los clínicos pueden requerirlos sólo en los pacientes más graves, con lo que las infecciones severas pueden representar sólo la “punta del iceberg” con respecto al total de infecciones por estos agentes (Moore *et al.*, 1984).

En nuestro estudio la mayoría de casos con diagnóstico conocido correspondían a pacientes afectados por **síndromes neurológicos** y únicamente 42 de ellos presentaban síndromes extrameníngeos. La principal enfermedad investigada fue la meningitis aséptica (83,2%) y en menor medida encontramos síndromes febriles sin foco, infecciones respiratorias de vías altas y exantemas, asociados a la infección enteroviral. Los enterovirus tienen una alta implicación en la enfermedad meníngea, ya que dan lugar al 80-85% de casos de meningitis linfocitaria aguda con etiología conocida (Berlin *et al.*, 1993; Romero, 1999; Nolte, 2006), también en nuestro medio (Navarro *et al.*, 2004). Algunos autores proponen la investigación sistemática de enterovirus en cualquier LCR de pacientes con afectación meníngea y pleocitosis, independientemente de la presencia de otros rasgos clásicamente asociados con esta enfermedad (linfocitosis, niños y época veraniega) (Chambon *et al.*, 2001; Peigue-Lafeuille *et al.*, 2002).

Entre los 42 **casos no neurológicos**, hubo hasta 29 que tuvieron lugar entre los meses de noviembre y mayo, sugiriendo una importante circulación de los enterovirus en nuestra región durante el periodo invernal, como han comentado otros autores españoles (Valdezate *et al.*, 1998; Trallero *et al.*, 2000). Este hallazgo invernal podría ser debido a un diagnóstico clínico más minucioso de los síndromes febriles y respiratorios en esa época del año con objeto de encontrar otros agentes virales de mayor virulencia, capaces de causar infecciones más complicadas, como las causadas por Virus Respiratorio Sincitial, Influenza, Parainfluenza o Adenovirus. Sin embargo, los resfriados veraniegos suelen ser de carácter más leve, por lo que los enterovirus aislados en esa época del año van a provenir fundamentalmente de pacientes con enfermedad severa, habitualmente de tipo neurológico. Por tanto, las infecciones extrameníngeas por enterovirus diagnosticadas en el laboratorio suelen corresponder

a hallazgos casuales, como consecuencia de una investigación analítica más profunda.

Los serotipos aislados en mayor número, E4, E6, E9, E13, E30 ó CVB5, proceden de los cuadros de afectación neurológica fundamentalmente, y así se ha comentado con anterioridad (Trallero *et al.*, 2000; Modlin, 2000c; Pérez *et al.*, 2003). Algunos autores han resaltado la relación de algunos agentes, significativos en nuestra serie, con la infección meningea como son E4, E6, E7, E9, E18 o CVB5 (Moore *et al.*, 1984; Yamashita *et al.*, 1992; Druyts-Voets, 1997; Chambon *et al.*, 2001; Trallero *et al.*, 2003; CDC, 2006). Por otro lado, otro síndrome como es la encefalitis asociada a enterovirus está poco representada en nuestra serie, a pesar de la alta frecuencia de causa enteroviral que algunos autores asignan a esta enfermedad (Moore *et al.*, 1984). La encefalitis por enterovirus puede ser especialmente frecuente en pacientes recién nacidos, si bien, la investigación de esta enfermedad suele ir encaminada a la búsqueda de virus herpes exclusivamente, causa principal de la misma.

Hay otros serotipos, como CVB1-3, E25 ó EV75 que encontramos principalmente asociados a cuadros no localizados en el SNC. Anteriormente, se ha descrito la importante implicación de CVB1-4 en síndromes neurológicos y no neurológicos, mientras que la infección por CVB5 producía en un 92% de los casos meningitis o encefalitis (Moore *et al.*, 1984). Los casos descritos en la literatura de infección por EV75 son escasos, la primera descripción del serotipo correspondía a 3 casos de PFA, una infección neurológica inespecífica y 4 procesos extrameningeos (Oberste *et al.*, 2004). En España, su hallazgo se ha relacionado por primera vez con casos de meningitis (Avellón *et al.*, 2006). El análisis filogenético del fragmento 3' de VP1 de nuestros aislados, otros EV75 españoles y del resto del mundo, mostraba que los EV75 españoles constituían un subgrupo dentro de este serotipo con un 82,8-85,4% de homología con el resto de cepas de EV75 (Avellón *et al.*, 2006), por lo que podría tratarse de una variante con mayor capacidad de producir meningitis. En nuestro estudio los cinco casos detectados correspondieron a 2 meningitis, una infección respiratoria aguda, una gastroenteritis y un síndrome febril, aunque en ninguno de los cuadros no neurológicos se estudió muestra de LCR que hubieran permitido descartar una infección subclínica del SNC.

No todos los serotipos poseen la misma virulencia, esto puede ser sospechado por la abundancia de ciertos agentes en aguas residuales, que en cambio no se encuentran en igual proporción entre los aislados clínicos humanos y viceversa. No obstante, ese hallazgo podría responder a otras causas como cantidad variable de virus excretado en heces o inactivación en el medio ambiente de ciertos serotipos. Un

estudio realizado en Finlandia en este sentido asignaba un alto índice de significación clínica a agentes como CVA9, E30 y E9 (Hovi *et al.*, 1996). En EEUU, sin embargo, se ha observado que el serotipo mayoritario en la clínica y el alcantarillado coincidía año a año con muy diversos agentes, E6, E30, CVB5, E11 o E13 (Sedmak *et al.*, 2003). De todas formas, algunos serotipos como CVA16 y E11 parecen poseer gran poder patógeno, produciendo de forma regular infección sintomática en el hombre (Hovi *et al.*, 1996; Druyts-Voets, 1997).

La infección por enterovirus es un cuadro eminentemente infantil, como se puede deducir de los grupos de edad que representan los pacientes infectados. La **edad** de éstos se concentraba en los primeros años de vida, con casi un 20% de ellos menores de 1 año y el 50% por debajo de los 5 años. Éste es un hecho comentado repetidamente por otros autores que han observado esta mayor frecuencia de infección por enterovirus por debajo de los 5 años (Moore *et al.*, 1984; Druyts-Voets, 1997; Meqdam *et al.*, 2002; Zhao *et al.*, 2005), llegando a comunicar cifras en torno al 40% en menores de 1 año (CDC, 2002) y 91% en menores de 14 años (Druyts-Voets, 1997). Cuando se producen brotes por EVNP en la población general, los neonatos se encuentran especialmente en riesgo. Los datos epidemiológicos por ello, pueden ser importantes para tratar de minimizar el riesgo de infecciones neonatales, siguiendo los consejos en cuanto a medidas preventivas frente a la infección enteroviral en el parto, descritas por Magnius y colaboradores. Estas medidas inciden en la importancia de conocer un posible estado infeccioso de la madre, así como la aplicación de medidas higiénicas básicas por parte del personal sanitario (Magnius *et al.*, 1990).

Describimos en nuestro estudio hasta 41 casos (15,4%) en pacientes mayores de 18 años, 36 de los cuales estaban diagnosticados de enfermedad neurológica. Este dato indica que, si bien, la infección enteroviral es más frecuente en niños, no es despreciable en el adulto como causa de meningitis, particularmente si existe un contacto estrecho con niños (Peigue-Lafeuille *et al.*, 2002; Carrol *et al.*, 2006), incluso en los meses fríos como comprobábamos en un tercio de nuestros adultos y comentan otros autores en proporciones similares (Peigue-Lafeuille *et al.*, 2002).

Además es importante reseñar en cuanto a las enfermedades no neurológicas detectadas, la mayor frecuencia encontrada en niños menores de 4 años con respecto a los síndromes que no afectaban al SNC, de forma estadísticamente significativa. Otros autores han descrito esto mismo para menores de 4 años con síndromes febriles y exantemáticos causados por coxsackievirus B (Moore *et al.*, 1984) y para el resto de enterovirus (Druyts-Voets, 1997). Sin embargo, los síndromes neurológicos se

concentraban en el grupo de población entre 5 y 9 años, de forma parecida a lo expresado por otros autores que indican el período de 5 a 14 años de edad como el más probable para manifestar procesos meníngeos (Yamashita *et al.*, 1992; Druyts-Voets, 1997; Chomel *et al.*, 2003). En este sentido, sin embargo, existe mayor controversia en la bibliografía ya que otros autores abogan por niños más pequeños en la enfermedad neurológica (0-6 años) (Dos Santos *et al.*, 2006).

La relación entre **sexos** indicaba una mayor probabilidad de encontrar una infección enteroviral en varones, con un ratio 1,53:1 (hombre:mujer). También éste es un hallazgo ampliamente comentado en la bibliografía, donde se han descrito proporciones 1,5-2:1 (hombres:mujeres) (Moore, 1982; Druyts-Voets, 1997), cuyas razones no parecen claras, ya que estas proporciones se observan incluso en individuos menores de 1 año, donde el comportamiento social y el manejo de los niños por parte de los padres va a ser similar para niños y niñas, como comentaban Moore y colaboradores. Además algunos autores han relacionado la enfermedad seria neonatal con serotipos específicos (E11), sexo masculino, prematuridad y enfermedad materna preparto (Druyts-Voets, 1997).

La **distribución de casos encontrados a lo largo del año** nos indicaba que los meses de junio y agosto era cuando se producía un mayor número de infecciones, corroborando el dato aportado por otros autores que han recogido los meses de verano como la época más proclive para sufrir una infección de esta etiología (Moore *et al.*, 1984; Yamashita *et al.*, 1992; Druyts-Voets *et al.*, 1993; Gharbi *et al.*, 2006). De todas formas, observamos también importantes cifras desde el final del invierno y durante los meses de primavera, hecho constatado en estudios llevados a cabo en Túnez y Bélgica (Gharbi *et al.*, 2006). Estos altos porcentajes en los meses más fríos podrían guardar relación con la importancia también de la humedad ambiental para favorecer la presencia de los enterovirus en el medio (Hovi *et al.*, 1996).

También se observa un importante incremento de casos en noviembre, hecho que está relacionado con el gran número de pacientes recogidos en nuestro estudio pertenecientes al brote de meningitis aséptica por E4 de 1991.

Observando la distribución mensual de los serotipos aislados se pueden advertir diferencias epidemiológicas entre los distintos grupos de esta familia. De esta manera, se percibe que echovirus aparece principalmente en los meses de verano, con especial incidencia en junio y agosto, al igual que han expresado otros autores (Druyts-Voets, 1997).

Sin embargo, poliovirus, coxsackievirus B y EV75, tienen una distribución distinta, fundamentalmente en los meses de invierno y primavera. Los aislamientos de poliovirus ya se ha comentado que suelen corresponderse con hallazgos casuales de cepas vacunales al investigar síndromes febriles o respiratorios, investigación que se realiza fundamentalmente en invierno, ya que los resfriados veraniegos son considerados más benignos y no suelen requerir la utilización de todo el arsenal diagnóstico (Moore *et al.*, 1984). Los datos de Bélgica indican que la infección por CVB suele ser más habitual principalmente en el mes de junio y en los meses colindantes (Druyts-Voets, 1997). En ese estudio se indica una distribución bastante uniforme a lo largo de todo el año de los aislados pertenecientes a CVA, hecho similar a lo que encontramos en los 8 casos de nuestra serie, que aparecen en 7 meses distintos del año.

V.2. OPTIMIZACIÓN DEL CULTIVO CELULAR

Los datos de nuestro estudio indican que RD y Caco-2 son las líneas celulares más adecuadas para el cultivo de enterovirus, como han comentado algunos estudios realizados con éstas y otras líneas celulares donde ambas mostraban una gran actividad (Dagan y Menegus, 1986; Huang *et al.*, 2000; Huang *et al.*, 2002; Ozkaya *et al.*, 2002).

La comparación de líneas realizada valorando el efecto citopático indicó que RD y Caco-2 eran las líneas celulares más sensibles y con mayor espectro de infección. Esta conclusión también podía ser extraída a partir de los experimentos realizados cuantificando mediante IFI o valorando el ciclo umbral de detección en la RT-PCR en tiempo real. Sin embargo, cuando se valoró el grupo de los coxsackievirus B, Caco-2 se mostró como la línea celular más apropiada para permitir la multiplicación de ese grupo de enterovirus. Por tanto, la aproximación más acertada para ser utilizada en el diagnóstico clínico de infecciones por este heterogéneo grupo de virus sería la combinación de estas dos líneas celulares, RD y Caco-2, que soportarían el crecimiento de todos los serotipos evaluados con gran rapidez.

En la literatura encontramos datos referentes a la multiplicación de otros serotipos no incluidos en nuestra serie. De esta manera, E2, E27, CVA2-7, A11, A13, A15-18, A20-21 o EV70 son capaces de infectar las células Caco-2 (Reigel, 1985; Pinto *et al.*, 1994; Huang *et al.*, 2002), y RD es capaz de soportar, según diferentes estudios, el crecimiento de PV1-3, E2, E12, E15-16, E19, E26-29, E31-32, CVA2-3, A7-10, A12, A14, A20-21 (Patel *et al.*, 1985; Johnston y Siegel, 1990; Kok *et al.*, 1998). De esta forma, podemos encontrar alternativas a las clásicas células primarias de riñón de mono o a los animales de experimentación.

Numerosos estudios han resaltado la importancia de combinar diferentes líneas celulares para permitir el crecimiento de los diferentes enterovirus, pautas que solían incluir 4 líneas celulares distintas, tales como PMK, BGM, Vero, RD, MRC-5, Hep-2 o A-549 (Dagan y Menegus, 1986; Chonmaitree *et al.*, 1988; Huang *et al.*, 2000). En este análisis hemos deducido que la combinación sólo de dos líneas celulares (RD y Caco-2) puede permitir el crecimiento de la gran diversidad de serotipos incluidos en esta familia.

En nuestra experimentación, las líneas MRC-5 y NCI-H292 ocupaban un segundo lugar como líneas para el crecimiento enteroviral, mientras que Vero fue la línea peor valorada de nuestra serie tras los tres análisis comparativos. Anteriormente se había comunicado la capacidad de NCI-H292 para permitir el crecimiento casi de

cualquier serotipo de enterovirus (Hierholzer *et al.*, 1993), datos que contrastan con los obtenidos en nuestros ensayos, donde esta línea sólo consiguió soportar el crecimiento del 83,9% de serotipos inoculados. Esta línea celular ha sido principalmente estudiada como posible sustituta de la línea primaria de riñón de mono rhesus, para cultivar virus respiratorios fundamentalmente (Hierholzer *et al.*, 1993; Morier *et al.*, 1996). MRC-5 ha sido considerada en numerosos estudios como una línea celular óptima para el cultivo de enterovirus (Chonmaitree *et al.*, 1988; Reina *et al.*, 2000), sin embargo, en nuestro trabajo sólo 23 de los 31 serotipos utilizados (74,2%) consiguieron multiplicarse en esta línea celular, lo que está de acuerdo con lo publicado previamente de un menor rendimiento de MRC-5, frente a RD para el cultivo de enterovirus (Pérez-Ruiz *et al.*, 2003).

La valoración del efecto citopático para comprobar el crecimiento viral en algunos casos no resulta una aproximación adecuada ya que en ocasiones no se produce ECP como consecuencia del crecimiento viral, por lo que se debe descartar un posible crecimiento “invisible” del virus realizando una IFI o PCR del sobrenadante del cultivo. En nuestra serie observamos que RD, a pesar de soportar el crecimiento de los 31 serotipos ensayados, mostró un nulo o escaso ECP con algunos serotipos (E18, CVB2-5 y CVA24) de forma similar a lo expresado anteriormente (Johnston y Siegel, 1990; Kok *et al.*, 1998). Varios estudios, basándose en la producción de ECP, han considerado a RD como una línea poco propicia para soportar el crecimiento de enterovirus, probablemente debido a ese criterio utilizado, es decir, la producción de ECP como único elemento indicador del crecimiento (Patel *et al.*, 1985; Kok *et al.*, 1998). Kok y colaboradores sí comunicaron la alta sensibilidad de RD (según TCID₅₀) en los casos en que aparecía ECP y era considerado positiva (Kok *et al.*, 1998).

Sin embargo, Caco-2, donde también se desarrollaron todos los serotipos probados, demostró un mejor comportamiento, ya que en todos los casos el ECP producido fue intenso y de rápida progresión, como ya indicaba Reigel al comparar el crecimiento de enterovirus en Caco-2, Vero y fibroblastos humanos (Reigel, 1985). Además, la incubación durante un tiempo prolongado hace que las células RD se vayan degradando (Kok *et al.*, 1998) y puedan simular un falso crecimiento, mientras que Caco-2 presenta una mayor estabilidad a lo largo del tiempo. Por otro lado, en los estudios de Patel y colaboradores se ha resaltado la gran capacidad de células derivadas de tumores intestinales de colon (HT-29, SKCO-1) y recto (HRT-18) para permitir el crecimiento de diferentes enterovirus (todos los echovirus, PV-1-3, CVB1-6 y CVA2-10, A13-A15, A18 y A21) mostrando ECP (Patel *et al.*, 1984; Patel *et al.*, 1985).

Entre las restantes líneas evaluadas, el ECP fue importante, aunque menos intenso que en RD y Caco-2, en MRC-5 y NCI-H292 al igual que se comentaba en diferentes estudios de la literatura (Hierholzer *et al.*, 1993; Reina *et al.*, 2000; She *et al.*, 2006). La característica morfológica de los fibroblastos de pulmón humano, hacen de ésta una línea donde el ECP se manifiesta de forma muy característica y fácil de interpretar.

La inmunofluorescencia se viene utilizando desde hace años como principal herramienta para confirmar o descartar el crecimiento de enterovirus en cultivo celular (Bastis *et al.*, 1995). Su utilización permite detectar muchos casos positivos en que el ECP es nulo o escaso, como los comentados anteriormente en RD (E18, CVB2-5 y CVA24); en todos ellos la IFI fue positiva. Sin embargo, esta técnica depende de la complementariedad de los anticuerpos monoclonales utilizados con las estructuras virales, está sujeta a la subjetividad del observador y requiere una cantidad de virus adecuada en el medio para ser visualizada. Existen serotipos como EV71, no visualizables con el anticuerpo pan-enterovirus 5-D8/1 utilizado en nuestros ensayos, el cual sólo pudo ser evaluado según el ECP producido o la detección mediante RT-PCR. Otros autores han comunicado este hecho (Samuelson *et al.*, 1995) e incluso la negatividad de otros serotipos, que, más bien, podía ser debida a cargas víricas reducidas en el cultivo (Van Doornum y De Jong, 1998).

Entre las restantes líneas celulares evaluadas, cabe destacar las bajas cifras de detección mediante IFI que mostraban MRC-5 y Vero. En ellas sólo un máximo del 27,3% y 10,5%, respectivamente, de cepas que crecían (según RT-PCR) manifestaban positividad. En RD y Caco-2, sin embargo, el 86,7% y 77,4%, respectivamente, de cepas que crecían eran detectables por IFI. Por lo que puede ser interesante la aplicación de otras técnicas de detección como la RT-PCR si se utilizan las líneas celulares MRC-5 o Vero, como se hace en numerosos laboratorios.

La técnica más sensible y objetiva para la detección del crecimiento viral fue la RT-PCR del sobrenadante del cultivo. Su utilización nos permitió detectar la replicación viral que se producía en los ensayos con EV71 o aquellos donde la IFI resultaba negativa probablemente por contener un bajo número de virus. En ningún caso, se observó inhibición de la PCR, por lo que los datos de la IFI fueron confirmados con esta técnica.

La aplicación de un procedimiento en tiempo real nos permitió conocer el ciclo umbral de detección de los distintos ensayos y, de esta forma, semicuantificar el crecimiento en cada caso para evaluar la idoneidad de cada línea celular. En nuestro

estudio, nos interesaba comparar cuantitativamente la capacidad de cada serotipo para replicarse en cada línea, es decir, saber la cantidad relativa de virus entre las distintas líneas, por lo que no se requiere una cuantificación exacta, como sucede en pruebas diagnósticas como la obtención de cargas virales para controlar un tratamiento, donde además de precisión en el ensayo, se quiere exactitud.

La eficiencia de la reacción puede diferir para los distintos serotipos, pero al ensayar y valorar cada serotipo individualmente, se supera esa limitación. Por otro lado, se observa la gran reproducibilidad de nuestros ensayos, ya que la repetición del proceso de RT-PCR en tiempo real con los mismos inóculos nos proporciona cifras que difieren entre sí 0,80-1,54 ciclos. Esto fue evaluado para distintas concentraciones de virus y todas ellas mostraron esa baja variabilidad interensayo. Según las recomendaciones del fabricante (Rasmussen, 2001), esta reproducibilidad disminuye al manejar cargas virales bajas, aunque en nuestra valoración las cifras fueron similares para diluciones muy distintas. En nuestros experimentos nos interesaba conocer principalmente aquellas líneas celulares donde mayor replicación se producía, es decir las mayores cargas virales, por lo que esa teórica falta de correlación con cargas virales bajas, no suponía un obstáculo para interpretar correctamente nuestros resultados.

El formato de cultivo celular en *shell vial* es una herramienta que se ha mostrado útil, sensible y rápida para el diagnóstico en 48-72 h de las infecciones por enterovirus (Klespies *et al.*, 1996; Reina *et al.*, 2000; Pérez-Ruiz *et al.*, 2003; She *et al.*, 2006). En nuestra experiencia, se evaluó la capacidad de detección de las cinco líneas celulares ya comentada, así como, la aplicación de la biología molecular como sustituto de la IFI para revelar el crecimiento de una cepa en *shell vial*. Las líneas celulares RD y Caco-2 mostraron los mayores espectros de infección con los 31 serotipos evaluados, tanto cuando los cultivos se revelaron mediante la técnica clásica de IFI, como cuando se utilizó la RT-PCR. Al emplear la IFI, en RD se detectaron 26 de 31 serotipos (83,9%) y en Caco-2 24 de 31 (77,4%) tras 48 h de incubación. Con la RT-PCR, todos los serotipos fueron detectados en Caco-2 y sólo uno (CVB4) no pudo ser detectado en RD, aunque en el cultivo tradicional de 10 días de incubación sí manifestaría su crecimiento. Estos resultados son análogos a las cifras de sensibilidad mostradas en algunos estudios que han ensayado diferentes líneas celulares en *shell vial* (Huang *et al.*, 2002; Pérez-Ruiz *et al.*, 2003). En este trabajo los números obtenidos con MRC-5 se situaban muy por debajo de RD y Caco-2, a pesar de que esta línea celular ha sido repetidamente recomendada para el cultivo de enterovirus, también en *shell vial* (Reina *et al.*, 2000; She *et al.*, 2006). Sin embargo, muchos de

esos estudios han comparado la línea MRC-5 con otras líneas celulares de menor sensibilidad, Vero, Hep-2 o BGM (Reina *et al.*, 2000; She *et al.*, 2006).

Los resultados obtenidos tras 24 h y 48 h de incubación, mostraron importantes incrementos en las cifras de detección, tanto con IFI como con PCR, cuando los cultivos se dejaban incubar dos días. En estudios realizados con anterioridad en muestras clínicas, se han probado distintos períodos de incubación, obteniéndose sensibilidades aceptables a las 24 h (76%) con Caco-2 y BGM-hDAF (Buck *et al.*, 2002), a las 48 h (94%) con RD (Pérez-Ruiz *et al.*, 2003) y a las 72 h (93%) con MRC-5 (Klespies *et al.*, 1996). Por tanto un protocolo de incubación de 48 h con las líneas adecuadas podría ser adecuado para realizar el diagnóstico clínico.

En los trabajos que aparecen en la literatura, se observa de forma constante una menor sensibilidad del *shell vial* respecto al cultivo tradicional (Van Doornum y De Jong, 1998; Pérez-Ruiz *et al.*, 2003). Sin embargo, en todos ellos la detección del crecimiento en SV se realizaba mediante IFI, por lo que la aplicación de la RT-PCR para revelar el crecimiento puede permitir aumentar esas cifras de sensibilidad al trabajar con muestras clínicas, de forma similar a lo observado en nuestros ensayos con diluciones de cepas. Nuestros resultados señalan la importante capacidad de la RT-PCR para revelar el crecimiento de un gran número de enterovirus en situaciones donde la IFI resulta negativa porque los anticuerpos no se unen adecuadamente al virus o, lo que es más probable, la carga vírica sea baja y no detectable por inmunofluorescencia, como se ha observado que a veces ocurre con esta técnica (Van Doornum y De Jong, 1998).

Por tanto, la utilización de las líneas celulares RD y Caco-2 en *shell vial* y posterior detección del crecimiento tras 48 h de incubación mediante RT-PCR en tiempo real parece la aproximación más adecuada para aplicar al análisis clínico y conseguir un diagnóstico rápido y sensible. Esta aplicación se podría realizar utilizando dos tubos, uno con cada línea celular, aunque se debería estudiar la posibilidad de realizar un co-cultivo de ambas, técnica empleada anteriormente con Caco-2 y BGM consiguiendo muy buenos resultados (Huang *et al.*, 2002).

Los ensayos que realizamos no incluían muestras clínicas, por lo que éste podría ser un estudio a realizar y así confirmar las conclusiones extraídas de este trabajo. No obstante, nuestro trabajo ha evaluado hasta 31 serotipos distintos obtenidos fundamentalmente de aislamientos de muestras clínicas recogidas en nuestro centro y otros hospitales españoles, por lo que la aplicación de las condiciones propuestas debe ser óptima para permitir el crecimiento de los diferentes serotipos que

podemos encontrar en nuestro medio. La incógnita es saber si la sensibilidad analítica de combinar el cultivo celular y la biología molecular puede ser superior para el diagnóstico clínico, así como el crecimiento de otros serotipos no incluidos en la serie, particularmente de los grupos HEV-A y HEV-C, es decir, los diferentes coxsackievirus A, muy prevalentes en el ambiente según un reciente estudio llevado a cabo en Noruega (Witso *et al.*, 2006). Además la aplicación de esta metodología podría permitir mejorar las ya elevadas cifras de sensibilidad mostrada por las técnicas de RT-PCR aplicadas en solitario (Romero, 1999; Beld *et al.*, 2004), fundamentalmente para detectar cepas incluidas en muestras clínicas acompañadas por inhibidores de la PCR.

Ese diagnóstico rápido según algunos estudios ayudaría a rebajar los costes asociados a estas enfermedades en cuanto a terapias inadecuadas (antibióticos, antiherpes), procedimientos diagnósticos costosos (RMN, TAC) o días de hospitalización (Sawyer, 1999; Nolte, 2006), ya que hasta un 53% de estos pacientes reciben tratamiento antibacteriano (Peigue-Lafeuille *et al.*, 2002).

VI. CONCLUSIONES

1. Las infecciones por enterovirus se producen en nuestra área a lo largo de todo el año.
2. La infección enteroviral sin afectación del sistema nervioso central se produce principalmente en pacientes menores de 4 años. La enfermedad neurológica afecta fundamentalmente a niños varones de 0 a 9 años.
3. Se han detectado 29 serotipos diferentes de enterovirus asociados a infección en nuestro medio. Algunos como echovirus 30, E6, E9 y coxsackievirus B5 son endémicos en nuestra área y su incidencia aumenta cíclicamente cada 3-4 años, mientras que E13 ó E4 han aparecido de forma importante en momentos puntuales.
4. Se ha descrito por primera vez la presencia en nuestra región de enterovirus 75, desde diciembre de 2005.
5. El uso conjunto de células RD y Caco-2 permite detectar en cultivo todos los serotipos de enterovirus descritos hasta la fecha en España.

6. La aplicación de la reacción en cadena de la polimerasa en el sobrenadante de cultivo celular ha sido el procedimiento más sensible de los empleados para el diagnóstico de enterovirus a partir de muestras clínicas.

7. Todos los cultivos realizados para el diagnóstico de infecciones por enterovirus deben ser evaluados al final del protocolo de incubación establecido mediante inmunofluorescencia indirecta o preferiblemente reacción en cadena de la polimerasa, incluso aunque no se produzca ningún efecto citopático en el mismo.

VII. BIBLIOGRAFÍA

- Archard, L. C., Khan, M. A., Soteriou, B. A., Zhang, H., Why, H. J., Robinson, N. M., Richardson, P. J. (1998). Characterization of Coxsackie B virus RNA in myocardium from patients with dilated cardiomyopathy by nucleotide sequencing of reverse transcription-nested polymerase chain reaction products. *Hum Pathol*; 29(6): 578-584.
- Arita, I., Nakane, M., Fenner, F. (2006). Public health. Is polio eradication realistic? *Science*; 312(5775): 852-854.
- Avellón, A., Casas, I., Trallero, G., Pérez, C., Tenorio, A., Palacios, G. (2003). Molecular analysis of echovirus 13 isolates and aseptic meningitis, Spain. *Emerg Infect Dis*; 9(8): 934-941.
- Avellón, A., Rubio, G., Palacios, G., Casas, I., Rabella, N., Reina, G., Pérez, C., Trallero, G. (2006). Enterovirus 75 and Aseptic Meningitis, Spain, 2005. *Emerg Infect Dis*; 12(10): 1609-1611.
- Avellón, A., Trallero, G., Merino, B., Pachón, I., Sanz, C., Pérez-Breña, P. (2004). Poliomyelitis eradication initiative. Search for and control of wild poliovirus stored at Spanish laboratories. *Enferm Infecc Microbiol Clin*; 22(2): 77-82.
- Bahri, O., Rezig, D., Nejma-Oueslati, B. B., Yahia, A. B., Sassi, J. B., Hogga, N., Sadraoui, A., Triki, H. (2005). Enteroviruses in Tunisia: virological surveillance over 12 years (1992-2003). *J Med Microbiol*; 54(1): 63-69.
- Bastis, D., Simonet, S., Patterson, M. A., Neill, S. (1995). Identification of enteroviruses by indirect immunofluorescence using monoclonal antibodies. *Clin Diagn Virol*; 3(1): 83-93.
- Beld, M., Minnaar, R., Weel, J., Sol, C., Damen, M., van der Avoort, H., Wertheim-van Dillen, P., van Breda, A., Boom, R. (2004). Highly sensitive assay for detection of enterovirus in clinical specimens by reverse transcription-PCR with an armored RNA internal control. *J Clin Microbiol*; 42(7): 3059-3064.
- Beltrán, M., Saz, J. V., Rodríguez, J. (1999). Picornavirus y Hantavirus. En: J. A. Garcia-Rodriguez y J. J. Picazo (eds.). *Compendio de Microbiología*. Madrid, Harcourt Brace: 311-322.
- Benschop, K. S., Schinkel, J., Luken, M., van den Broek, P., Beersma, M., Menelik, N., van Eijk, H., Zaaijer, H. L., VandenBroucke-Grauls, C., Beld, M., Wolthers, K. C. (2006a). Fourth Human Parechovirus Serotype. *Emerg Infect Dis*; 12(10): 1572-1575.
- Benschop, K. S., Schinkel, J., Minnaar, R. P., Pajkrt, D., Spanjerberg, L., Kraakman, H. C., Berkhout, B., Zaaijer, H. L., Beld, M. G., Wolthers, K. C. (2006b). Human parechovirus infections in Dutch children and the association between serotype and disease severity. *Clin Infect Dis*; 42(2): 204-210.
- Berlin, L. E., Rorabaugh, M. L., Heldrich, F., Roberts, K., Doran, T., Modlin, J. F. (1993). Aseptic meningitis in infants < 2 years of age: diagnosis and etiology. *J Infect Dis*; 168(4): 888-892.
- Bernal, A., García-Saiz, A., Liacer, A., de Ory, F., Tello, O., Nájera, R. (1987). Poliomyelitis in Spain, 1982-1984: virologic and epidemiologic studies. *Am J Epidemiol*; 126(1): 69-76.

- Boivin, G., Abed, Y., Boucher, F. D.** (2005). Human parechovirus 3 and neonatal infections. *Emerg Infect Dis*; 11(1): 103-105.
- Brown, B., Oberste, M. S., Maher, K., Pallansch, M. A.** (2003). Complete genomic sequencing shows that polioviruses and members of human enterovirus species C are closely related in the noncapsid coding region. *J Virol*; 77(16): 8973-8984.
- Brown, B. A., Oberste, M. S., Alexander, J. P., Jr., Kennett, M. L., Pallansch, M. A.** (1999). Molecular epidemiology and evolution of enterovirus 71 strains isolated from 1970 to 1998. *J Virol*; 73(12): 9969-9975.
- Buck, G. E., Wiesemann, M., Stewart, L.** (2002). Comparison of mixed cell culture containing genetically engineered BGMK and CaCo-2 cells (Super E-Mix) with RT-PCR and conventional cell culture for the diagnosis of enterovirus meningitis. *J Clin Virol*; 25 Suppl 1: S13-18.
- Carrol, E. D., Beadsworth, M. B., Jenkins, N., Ratcliffe, L., Ashton, I., Crowley, B., Nye, F. J., Beeching, N. J.** (2006). Clinical and diagnostic findings of an echovirus meningitis outbreak in the north west of England. *Postgrad Med J*; 82(963): 60-64.
- Casas, I., Palacios, G. F., Trallero, G., Cisterna, D., Freire, M. C., Tenorio, A.** (2001). Molecular characterization of human enteroviruses in clinical samples: comparison between VP2, VP1, and RNA polymerase regions using RT nested PCR assays and direct sequencing of products. *J Med Virol*; 65(1): 138-148.
- Casas, I., Powell, L., Klapper, P. E., Cleator, G. M.** (1995). New method for the extraction of viral RNA and DNA from cerebrospinal fluid for use in the polymerase chain reaction assay. *J Virol Methods*; 53(1): 25-36.
- Casas, I., Pozo, F., Trallero, G., Echevarría, J. M., Tenorio, A.** (1999). Viral diagnosis of neurological infection by RT multiplex PCR: a search for entero- and herpesviruses in a prospective study. *J Med Virol*; 57(2): 145-151.
- Casas, I., Tenorio, A., Echevarría, J. M., Klapper, P. E., Cleator, G. M.** (1997). Detection of enteroviral RNA and specific DNA of herpesviruses by multiplex genome amplification. *J Virol Methods*; 66(1): 39-50.
- CDC** (2001). Echovirus type 13--United States, 2001. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*; 50(36): 777-780.
- CDC** (2002). Enterovirus surveillance--United States, 2000-2001. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*; 51(46): 1047-1049.
- CDC** (2004). Acute hemorrhagic conjunctivitis outbreak caused by Coxsackievirus A24--Puerto Rico, 2003. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*; 53(28): 632-634.
- CDC** (2006). Enterovirus surveillance--United States, 2002-2004. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*; 55(6): 153-156.
- Clements, G. B., Galbraith, D. N., Taylor, K. W.** (1995). Coxsackie B virus infection and onset of childhood diabetes. *Lancet*; 346(8969): 221-223.
- Cobos, P. V., Gutiérrez Meléndez, P., Yáñez Ortega, J. L., Rodrigo Palacios, J., Macarrón Vicente, J. L., Montero Alonso, M. R., Lozano, A.** (1994). Epidemiologic study of an

- outbreak of echovirus type-9 meningitis. *Rev Sanid Hig Publica (Madr)*; 68(5-6): 607-615.
- Corless, C. E., Guiver, M., Borrow, R., Edwards-Jones, V., Fox, A. J., Kaczmarski, E. B., Mutton, K. J.** (2002). Development and evaluation of a 'real-time' RT-PCR for the detection of enterovirus and parechovirus RNA in CSF and throat swab samples. *J Med Virol*; 67(4): 555-562.
- Correia, P., Brito, M. J., Andrade, H. R., Neves, C., Cordeiro Ferreira, G. N., Reis Vasco, E., Machado, M. C.** (2004). Echovirus type 13 meningitis: admissions to a paediatric ward at a Lisbon hospital. *Acta Med Port*; 17(4): 299-302.
- Craig, M. E., Robertson, P., Howard, N. J., Silink, M., Rawlinson, W. D.** (2003). Diagnosis of enterovirus infection by genus-specific PCR and enzyme-linked immunosorbent assays. *J Clin Microbiol*; 41(2): 841-844.
- Chambon, M., Archimbaud, C., Bailly, J. L., Henquell, C., Regagnon, C., Charbonne, F., Peigue-Lafeuille, H.** (2001). Circulation of enteroviruses and persistence of meningitis cases in the winter of 1999-2000. *J Med Virol*; 65(2): 340-347.
- Chang, L. Y., Lin, T. Y., Huang, Y. C., Tsao, K. C., Shih, S. R., Kuo, M. L., Ning, H. C., Chung, P. W., Kang, C. M.** (1999). Comparison of enterovirus 71 and coxsackie-virus A16 clinical illnesses during the Taiwan enterovirus epidemic, 1998. *Pediatr Infect Dis J*; 18(12): 1092-1096.
- Cheon, D. S., Lee, J., Lee, K., Lee, S., Park, K., Ahn, J., Jee, Y., Yoon, J., Cho, H.** (2004). Isolation and molecular identification of echovirus 13 isolated from patients of aseptic meningitis in Korea, 2002. *J Med Virol*; 73(3): 439-442.
- Chomel, J. J., Antona, D., Thouvenot, D., Lina, B.** (2003). Three ECHOvirus serotypes responsible for outbreak of aseptic meningitis in Rhone-Alpes region, France. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*; 22(3): 191-193.
- Chonmaitree, T., Ford, C., Sanders, C., Lucia, H. L.** (1988). Comparison of cell cultures for rapid isolation of enteroviruses. *J Clin Microbiol*; 26(12): 2576-2580.
- Dagan, R., Menegus, M. A.** (1986). A combination of four cell types for rapid detection of enteroviruses in clinical specimens. *J Med Virol*; 19(3): 219-228.
- de la Loma, A., Trallero, G., de Ory, F., Tenorio, A., Sanz, M., Echevarría, J. M.** (2002). Lymphocytic meningitis in Spain: a possible epidemic situation in 2000. *Med Clin (Barc)*; 118(18): 694-695.
- de Leeuw, N., Melchers, W. J., Balk, A. H., de Jonge, N., Galama, J. M.** (1998). No evidence for persistent enterovirus infection in patients with end-stage idiopathic dilated cardiomyopathy. *J Infect Dis*; 178(1): 256-259.
- de Ory-Manchón, F.** (2005). La serología en el diagnóstico de laboratorio de la meningitis aséptica. *Enferm Infecc Microbiol Clin*; 4(2): 38-41.
- Deffrasnes, C., Cote, S., Boivin, G.** (2005). Analysis of replication kinetics of the human metapneumovirus in different cell lines by real-time PCR. *J Clin Microbiol*; 43(1): 488-490.

- Diedrich, S., Schreier, E.** (2001). Aseptic meningitis in Germany associated with echovirus type 13. *BMC Infect Dis*; 1(1): 14-18.
- Dos Santos, G. P., Skraba, I., Oliveira, D., Lima, A. A., de Melo, M. M., Kmetzsch, C. I., da Costa, E. V., da Silva, E. E.** (2006). Enterovirus meningitis in Brazil, 1998-2003. *J Med Virol*; 78(1): 98-104.
- Druyts-Voets, E.** (1997). Epidemiological features of entero non-poliovirus isolations in Belgium 1980-94. *Epidemiol Infect*; 119(1): 71-77.
- Druyts-Voets, E., Van Renterghem, L., Gerniers, S.** (1993). Coxsackie B virus epidemiology and neonatal infection in Belgium. *J Infect*; 27(3): 311-316.
- Dussart, P., Cartet, G., Huguet, P., Leveque, N., Hajjar, C., Morvan, J., Vanderkerckhove, J., Ferret, K., Lina, B., Chomel, J. J., Norder, H.** (2005). Outbreak of acute hemorrhagic conjunctivitis in French Guiana and West Indies caused by coxsackievirus A24 variant: phylogenetic analysis reveals Asian import. *J Med Virol*; 75(4): 559-565.
- Gharbi, J., Jaidane, H., Ben M'hadheb, M., El Hiar, R., Chouchene, C., Gueddiche, M. N., Aouni, M.** (2006). Epidemiological study of non-polio enterovirus neurological infections in children in the region of Monastir, Tunisia. *Diagn Microbiol Infect Dis*; 54(1): 31-36.
- Ghazali, O., Chua, K. B., Ng, K. P., Hooi, P. S., Pallansch, M. A., Oberste, M. S., Chua, K. H., Mak, J. W.** (2003). An outbreak of acute haemorrhagic conjunctivitis in Melaka, Malaysia. *Singapore Med J*; 44(10): 511-516.
- González, Y., Martino, R., Badell, I., Pardo, N., Sureda, A., Brunet, S., Sierra, J., Rabella, N.** (1999). Pulmonary enterovirus infections in stem cell transplant recipients. *Bone Marrow Transplant*; 23(5): 511-513.
- Hamby, B. B., Pallansch, M. A., Kew, O. M.** (1987). Reemergence of an epidemic coxsackievirus B5 genotype. *J Infect Dis*; 156(2): 288-292.
- Hauri, A. M., Schimmelpfennig, M., Walter-Domes, M., Letz, A., Diedrich, S., Lopez-Pila, J., Schreier, E.** (2005). An outbreak of viral meningitis associated with a public swimming pond. *Epidemiol Infect*; 133(2): 291-298.
- Helfand, R. F., Gary, H. E., Jr., Freeman, C. Y., Anderson, L. J., Pallansch, M. A.** (1995). Serologic evidence of an association between enteroviruses and the onset of type 1 diabetes mellitus. Pittsburgh Diabetes Research Group. *J Infect Dis*; 172(5): 1206-1211.
- Hierholzer, J. C., Castells, E., Banks, G. G., Bryan, J. A., McEwen, C. T.** (1993). Sensitivity of NCI-H292 human lung mucoepidermoid cells for respiratory and other human viruses. *J Clin Microbiol*; 31(6): 1504-1510.
- Ho, M., Chen, E. R., Hsu, K. H., Twu, S. J., Chen, K. T., Tsai, S. F., Wang, J. R., Shih, S. R.** (1999). An epidemic of enterovirus 71 infection in Taiwan. Taiwan Enterovirus Epidemic Working Group. *N Engl J Med*; 341(13): 929-935.
- Hovi, T., Stenvik, M., Rosenlew, M.** (1996). Relative abundance of enterovirus serotypes in sewage differs from that in patients: clinical and epidemiological implications. *Epidemiol Infect*; 116(1): 91-97.

- Huang, Y. T., Hite, S., Duane, V., Yam, P., Jollick, J. A., Goodrum, G. R. (2000). Application of Mixed Cell Lines for the Detection of viruses from Clinical Specimens. *Clinical Microbiology Newsletter*, 22(12): 89-92.
- Huang, Y. T., Yam, P., Yan, H., Sun, Y. (2002). Engineered BGMK cells for sensitive and rapid detection of enteroviruses. *J Clin Microbiol*; 40(2): 366-371.
- Ito, M., Yamashita, T., Tsuzuki, H., Takeda, N., Sakae, K. (2004). Isolation and identification of a novel human parechovirus. *J Gen Virol*; 85(2): 391-398.
- Johnston, S. L., Siegel, C. S. (1990). Presumptive identification of enteroviruses with RD, HEp-2, and RMK cell lines. *J Clin Microbiol*; 28(5): 1049-1050.
- Kirschke, D. L., Jones, T. F., Buckingham, S. C., Craig, A. S., Schaffner, W. (2002). Outbreak of aseptic meningitis associated with echovirus 13. *Pediatr Infect Dis J*; 21(11): 1034-1038.
- Klespies, S. L., Cebula, D. E., Kelley, C. L., Galehouse, D., Maurer, C. C. (1996). Detection of enteroviruses from clinical specimens by spin amplification shell vial culture and monoclonal antibody assay. *J Clin Microbiol*; 34(6): 1465-1467.
- Kobayashi, K., Haruta, T., Kubota, M., Akiyoshi, K., Suga, T., Ito, M. (2005). Clinical spectrum in hospitalized children with echovirus type 13 infection. *Pediatr Int*, 47(2): 185-189.
- Kok, T. W., Pryor, T., Payne, L. (1998). Comparison of rhabdomyosarcoma, buffalo green monkey kidney epithelial, A549 (human lung epithelial) cells and human embryonic lung fibroblasts for isolation of enteroviruses from clinical samples. *J Clin Virol*; 11(1): 61-65.
- Lasarte Velillas, J. J., de Juan Martín, F., Omenaca Teres, M., Lalana Josa, M. P., Olivan Ota, M. P., Castillo Laita, J. A., Aldea Aldanondo, M. J. (1992). Type 4 echovirus meningitis in childhood. Epidemiologic and clinical aspects apropos of an epidemiologic outbreak. *An Esp Pediatr*, 36(1): 29-33.
- Lin, K. H., Chern, C. L., Chu, P. Y., Chang, C. H., Wang, H. L., Sheu, M. M., Huang, W. L., Pongsuwanna, Y., Yamamoto, S., Yoshino, S., Ishiko, H., Takeda, N. (2001). Genetic analysis of recent Taiwanese isolates of a variant of coxsackievirus A24. *J Med Virol*; 64(3): 269-274.
- Lin, K. H., Wang, H. L., Sheu, M. M., Huang, W. L., Chen, C. W., Yang, C. S., Takeda, N., Kato, N., Miyamura, K., Yamazaki, S. (1993). Molecular epidemiology of a variant of coxsackievirus A24 in Taiwan: two epidemics caused by phylogenetically distinct viruses from 1985 to 1989. *J Clin Microbiol*; 31(5): 1160-1166.
- Lin, T. Y., Kao, H. T., Hsieh, S. H., Huang, Y. C., Chiu, C. H., Chou, Y. H., Yang, P. H., Lin, R. I., Tsao, K. C., Hsu, K. H., Chang, L. Y. (2003). Neonatal enterovirus infections: emphasis on risk factors of severe and fatal infections. *Pediatr Infect Dis J*; 22(10): 889-894.
- López Alcalá, M. I., Rodríguez Priego, M., de la Cruz Morgado, D., Barcia Ruiz, J. M. (1997). Outbreak of meningitis caused by echovirus type 30. *An Esp Pediatr*, 46(3): 237-240.

- Lukashev, A. N.** (2005). Role of recombination in evolution of enteroviruses. *Rev Med Virol*; 15(3): 157-167.
- Magnius, L., Sterner, G., Enocksson, E.** (1990). Infections with echoviruses and coxsackieviruses in late pregnancy. *Scand J Infect Dis Suppl*; 71: 53-57.
- Marshall, W. F., Telenti, A., Proper, J., Aksamit, A. J., Smith, T. F.** (1990). Rapid detection of polyomavirus BK by a shell vial cell culture assay. *J Clin Microbiol*; 28(7): 1613-1615.
- Martínez-Martín, P., Herreros, A., Téllez, A., Echevarría, J. M.** (1990). Meningitis of viral or possible viral etiology in adults: study of 325 cases. *Neurologia*; 5(1): 4-10.
- McIntosh, K.** (1996). Diagnostic Virology. En: B. N. Fields, D. M. Knipe y P. M. Howley (eds.). *Fields Virology*. Philadelphia, Lippincott-Raven Publishers. 1: 401-430.
- Melnick, J. L., Rennick, V., Hampil, B., Schmidt, N. J., Ho, H. H.** (1973). Lyophilized combination pools of enterovirus equine antisera: preparation and test procedures for the identification of field strains of 42 enteroviruses. *Bull World Health Organ*; 48(3): 263-268.
- Melnick, J. L., Wimberly, I. L.** (1985). Lyophilized combination pools of enterovirus equine antisera: new LBM pools prepared from reserves of antisera stored frozen for two decades. *Bull World Health Organ*; 63(3): 543-550.
- Meqdam, M. M., Khalousi, M. M., Al-Shurman, A.** (2002). Enteroviral meningitis in Northern Jordan: prevalence and association with clinical findings. *J Med Virol*; 66(2): 224-228.
- Modlin, J. F.** (2000a). Introduction to Picornaviridae. En: G. L. Mandel, J. E. Bennett y R. Dolin (eds.). *Principles and Practice of Infectious Diseases*. Philadelphia, Churchill Livingstone. 2: 1889-1895.
- Modlin, J. F.** (2000b). Poliovirus. En: G. L. Mandel, J. E. Bennett y R. Dolin (eds.). *Principles and Practice of Infectious Diseases*. Philadelphia, Churchill Livingstone. 2: 1895-1903.
- Modlin, J. F.** (2000c). Coxsackieviruses, Echoviruses and Newer Enteroviruses. En: G. L. Mandel, J. E. Bennett y R. Dolin (eds.). *Principles and Practice of Infectious Diseases*. Philadelphia, Churchill Livingstone. 2: 1904-1917.
- Modlin, J. F.** (2005a). Introduction to the Enteroviruses. En: G. L. Mandell, J. E. Bennett y R. Dolin (eds.). *Principles and Practice of Infectious Diseases*. Philadelphia, Churchill Livingstone. 2: 2133-2140.
- Modlin, J. F.** (2005b). Poliovirus. En: G. L. Mandell, J. E. Bennett y R. Dolin (eds.). *Principles and Practice of Infectious Diseases*. Philadelphia, Churchill Livingstone. 2: 2141-2148.
- Modlin, J. F.** (2005c). Coxsackieviruses, Echoviruses, and Newer Enteroviruses. En: G. L. Mandell, J. E. Bennett y R. Dolin (eds.). *Principles and Practice of Infectious Diseases*. Philadelphia, Churchill Livingstone. 2: 2148-2161.
- Moore, M.** (1982). Enteroviral disease in the United States, 1970-1979. *J Infect Dis*; 146(1): 103-108.
- Moore, M., Kaplan, M. H., McPhee, J., Bregman, D. J., Klein, S. W.** (1984). Epidemiologic, clinical, and laboratory features of Coxsackie B1-B5 infections in the United States, 1970-79. *Public Health Rep*; 99(5): 515-522.

- Moral Gil, L., Rubio Calduch, E. M., Broto Escapa, P., Caballero Requero, E., Calico Bosch, I., Bertran Sangués, J. M.** (1993). Enteroviral infections in children: clinical and epidemiological findings in 530 patients (1984-1991). *An Esp Pediatr*, 39(6): 521-527.
- Morier, L., Perez, L., Cancio, R., Savon, C., Gonzalez, Z., Goyenechea, A.** (1996). A comparison of the NCI-H292 line with other continuous lines for the multiplication of respiratory viruses. *Rev Cubana Med Trop*; 48(3): 171-173.
- Muir, P., Kammerer, U., Korn, K., Mulders, M. N., Poyry, T., Weissbrich, B., Kandolf, R., Cleator, G. M., van Loon, A. M.** (1998). Molecular typing of enteroviruses: current status and future requirements. The European Union Concerted Action on Virus Meningitis and Encephalitis. *Clin Microbiol Rev*, 11(1): 202-227.
- Nadkarni, S. S., Deshpande, J. M.** (2003). Recombinant murine L20B cell line supports multiplication of group A coxsackieviruses. *J Med Virol*; 70(1): 81-85.
- Nairn, C., Clements, G. B.** (1999). A study of enterovirus isolations in Glasgow from 1977 to 1997. *J Med Virol*; 58(3): 304-312.
- Narkeviciute, I., Vaiciuniene, D.** (2004). Outbreak of echovirus 13 infection among Lithuanian children. *Clin Microbiol Infect*, 10(11): 1023-1025.
- Navarro, J. M., Fernández-Roldán, C., Pérez-Ruiz, M., Sanbonmatsu, S., de la Rosa, M., Sánchez-Seco, M. P.** (2004). Meningitis by Toscana virus in Spain: description of 17 cases. *Med Clin (Barc)*; 122(11): 420-422.
- Nix, W. A., Oberste, M. S., Pallansch, M. A.** (2006). Sensitive, seminested PCR amplification of VP1 sequences for direct identification of all enterovirus serotypes from original clinical specimens. *J Clin Microbiol*; 44(8): 2698-2704.
- Nolte, F. S.** (2006). Case studies in cost effectiveness of molecular diagnostics for infectious diseases: pulmonary tuberculosis, enteroviral meningitis, and BK virus nephropathy. *Clin Infect Dis*; 43(11): 1463-1467.
- Norder, H., Bjerregaard, L., Magnius, L., Lina, B., Aymard, M., Chomel, J. J.** (2003). Sequencing of 'untypable' enteroviruses reveals two new types, EV-77 and EV-78, within human enterovirus type B and substitutions in the BC loop of the VP1 protein for known types. *J Gen Virol*; 84(Pt 4): 827-836.
- Norder, H., Bjerregaard, L., Magnius, L. O.** (2001). Homotypic echoviruses share aminoterminal VP1 sequence homology applicable for typing. *J Med Virol*; 63(1): 35-44.
- Oberste, M., Schnurr, D., Maher, K., al-Busaidy, S., Pallansch, M.** (2001). Molecular identification of new picornaviruses and characterization of a proposed enterovirus 73 serotype. *J Gen Virol*; 82(2): 409-416.
- Oberste, M. S., Maher, K., Flemister, M. R., Marchetti, G., Kilpatrick, D. R., Pallansch, M. A.** (2000). Comparison of classic and molecular approaches for the identification of untypeable enteroviruses. *J Clin Microbiol*; 38(3): 1170-1174.
- Oberste, M. S., Maher, K., Kilpatrick, D. R., Flemister, M. R., Brown, B. A., Pallansch, M. A.** (1999). Typing of human enteroviruses by partial sequencing of VP1. *J Clin Microbiol*; 37(5): 1288-1293.

- Oberste, M. S., Maher, K., Michele, S. M., Belliot, G., Uddin, M., Pallansch, M. A.** (2005). Enteroviruses 76, 89, 90 and 91 represent a novel group within the species Human enterovirus A. *J Gen Virol*; 86(2): 445-451.
- Oberste, M. S., Maher, K., Pallansch, M. A.** (1998). Molecular phylogeny of all human enterovirus serotypes based on comparison of sequences at the 5' end of the region encoding VP2. *Virus Res*; 58(1): 35-43.
- Oberste, M. S., Maher, K., Williams, A. J., Dybdahl-Sissoko, N., Brown, B. A., Gookin, M. S., Penaranda, S., Mishrik, N., Uddin, M., Pallansch, M. A.** (2006). Species-specific RT-PCR amplification of human enteroviruses: a tool for rapid species identification of uncharacterized enteroviruses. *J Gen Virol*; 87(1): 119-128.
- Oberste, M. S., Michele, S. M., Maher, K., Schnurr, D., Cisterna, D., Junttila, N., Uddin, M., Chomel, J. J., Lau, C. S., Ridha, W., al-Busaidy, S., Norder, H., Magnius, L. O., Pallansch, M. A.** (2004). Molecular identification and characterization of two proposed new enterovirus serotypes, EV74 and EV75. *J Gen Virol*; 85(11): 3205-3212.
- Oh, M. D., Park, S., Choi, Y., Kim, H., Lee, K., Park, W., Yoo, Y., Kim, E. C., Choe, K.** (2003). Acute hemorrhagic conjunctivitis caused by coxsackievirus A24 variant, South Korea, 2002. *Emerg Infect Dis*; 9(8): 1010-1012.
- Olivares, A. L.** (1974). Distribution of enteroviruses in Spain. Laboratory methods for their study. *Rev Sanid Hig Publica (Madr)*; 48(11): 1021-1065.
- Otero, J. R., Folgueira, L., Trallero, G., Prieto, C., Maldonado, S., Babiano, M. J., Martínez-Alonso, I.** (2001). A-549 is a suitable cell line for primary isolation of coxsackie B viruses. *J Med Virol*; 65(3): 534-536.
- Ozkaya, E., Korukluoglu, G., Yalcinkaya, T., Turkeri, A., Atak, T., Kubar, A.** (2002). Sensitivities of various cell cultures for the isolation of enteroviruses. *Mikrobiyol Bul*; 36(3): 301-308.
- Palacios, G., Casas, I., Cisterna, D., Trallero, G., Tenorio, A., Freire, C.** (2002). Molecular epidemiology of echovirus 30: temporal circulation and prevalence of single lineages. *J Virol*; 76(10): 4940-4949.
- Palacios, G., Oberste, M. S.** (2005). Enteroviruses as agents of emerging infectious diseases. *J Neurovirol*; 11(5): 424-433.
- Pallansch, M. A., Roos, R. P.** (2001). Enteroviruses: polioviruses, coxsackieviruses, echoviruses, and new enteroviruses. En: D. M. Knipe y P. M. Howley (eds.). *Fields Virology*. Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins. 1: 723-775.
- Park, K., Lee, K., Lee, J., Yeo, S., Lee, S., Cheon, D. S., Choi, W., Ahn, J., Kim, S., Jee, Y.** (2006). Acute hemorrhagic conjunctivitis epidemic caused by coxsackievirus A24 variants in Korea during 2002-2003. *J Med Virol*; 78(1): 91-97.
- Patel, J. R., Daniel, J., Mathan, M., Mathan, V. I.** (1984). Isolation and identification of enteroviruses from faecal samples in a differentiated epithelial cell line (HRT-18) derived from human rectal carcinoma. *J Med Virol*; 14(3): 255-261.

- Patel, J. R., Daniel, J., Mathan, V. I.** (1985). A comparison of the susceptibility of three human gut tumour-derived differentiated epithelial cell lines, primary monkey kidney cells and human rhabdomyosarcoma cell line to 66-prototype strains of human enteroviruses. *J Virol Methods*; 12(3-4): 209-216.
- Peigue-Lafeuille, H., Croquez, N., Laurichesse, H., Clavelou, P., Aumaitre, O., Schmidt, J., Maillet-Vioud, M., Henquell, C., Archimbaud, C., Bailly, J. L., Chambon, M.** (2002). Enterovirus meningitis in adults in 1999-2000 and evaluation of clinical management. *J Med Virol*; 67(1): 47-53.
- Perea-López, E.** (1998). Estudios Descriptivos. En: R. Burgos (eds.). *Metodología de Investigación y Escritura Científica en Clínica*. Granada, Escuela Andaluza de Salud Pública: 63-76.
- Pérez-Ruiz, M., Navarro-Marí, J. M., Palacios del Valle, E., Rosa-Fraile, M.** (2003). Human rhabdomyosarcoma cells for rapid detection of enteroviruses by shell-vial assay. *J Med Microbiol*; 52(Pt 9): 789-791.
- Pérez, C., Peña, M., Molina, L., Trallero, G., García, A., Álamo, F., Lafarga, B.** (2003). Epidemic outbreak of meningitis due to Echovirus type 13 on the island of Gran Canaria (Spain). *Enferm Infecc Microbiol Clin*; 21(7): 340-345.
- Phan, T. G., Nguyen, T. A., Shimizu, H., Yagyu, F., Okitsu, S., Muller, W. E., Ushijima, H.** (2005). Identification of enteroviral infection among infants and children admitted to hospital with acute gastroenteritis in Ho Chi Minh City, Vietnam. *J Med Virol*; 77(2): 257-264.
- Pinto, R. M., Diez, J. M., Bosch, A.** (1994). Use of the colonic carcinoma cell line CaCo-2 for in vivo amplification and detection of enteric viruses. *J Med Virol*; 44(3): 310-315.
- Racaniello, V. R.** (2001). Picornaviridae: The Viruses and Their Replication. En: D. M. Knipe y P. M. Howley (eds.). *Fields Virology*. Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins. 1: 685-722.
- Rasmussen, R.** (2001). Quantification on the Lightcycler. En: S. Meuer, C. Wittwer y K. Nakagawara (eds.). *Rapid Cycle Real-Time PCR. Methods and Applications*. Berlin, Springer: 21-34.
- Reigel, F.** (1985). Isolation of human pathogenic viruses from clinical material on CaCo2 cells. *J Virol Methods*; 12(3-4): 323-327.
- Reina, J., Ballesteros, F., Munar, M., Marí, M., Subirats, M.** (2000). Evaluation of different clinical samples and cell lines in the isolation of enterovirus in pediatric patients. *Enferm Infecc Microbiol Clin*; 18(3): 116-119.
- Richter, J., Koptides, D., Tryfonos, C., Christodoulou, C.** (2006). Molecular typing of enteroviruses associated with viral meningitis in Cyprus, 2000-2002. *J Med Microbiol*; 55(Pt 8): 1035-1041.
- Rigonan, A. S., Mann, L., Chonmaitree, T.** (1998). Use of monoclonal antibodies to identify serotypes of enterovirus isolates. *J Clin Microbiol*; 36(7): 1877-1881.

- Romero, J. R.** (1999). Reverse-transcription polymerase chain reaction detection of the enteroviruses. *Arch Pathol Lab Med*; 123(12): 1161-1169.
- Romero, J. R., Rotbart, H. A.** (2003). Enteroviruses. En: P. R. Murray, E. J. Baron, M. A. Jorgensen, M. A. Pfaller y R. H. Tenover (eds.). *Manual of Clinical Microbiology*. Washington D.C., ASM Press. 2: 1427-1438.
- Rotbart, H. A.** (1997). Enteroviruses. En: D. D. Richman, R. J. Whitley y F. G. Hayden (eds.). *Clinical Virology*. New York, Churchill Livingstone: 997-1023.
- Rotbart, H. A., Sawyer, M. H., Fast, S., Lewinski, C., Murphy, N., Keyser, E. F., Spadoro, J., Kao, S. Y., Loeffelholz, M.** (1994). Diagnosis of enteroviral meningitis by using PCR with a colorimetric microwell detection assay. *J Clin Microbiol*; 32(10): 2590-2592.
- Rotbart, H. A., Webster, A. D.** (2001). Treatment of potentially life-threatening enterovirus infections with pleconaril. *Clin Infect Dis*; 32(2): 228-235.
- Rubio, G., Mintegui, S., Gaztelurrutia, L., Sánchez, J.** (1998). Meningitis by enterovirus in pediatrics. Clinical characteristics and virologic diagnosis. *Enferm Infecc Microbiol Clin*; 16(1): 14-18.
- Samuelson, A., Forsgren, M., Sallberg, M.** (1995). Characterization of the recognition site and diagnostic potential of an enterovirus group-reactive monoclonal antibody. *Clin Diagn Lab Immunol*; 2(3): 385-386.
- Sanchís, J., Bayarri, E.** (1963). Study in Tissue Culture of the Enteroviruses Isolated in Valencia During 1959, 1960 and 1961. *Med Clin (Barc)*; 41: 40-43.
- Sawyer, M. H.** (1999). Enterovirus infections: diagnosis and treatment. *Pediatr Infect Dis J*; 18(12): 1033-1040.
- Sedmak, G., Bina, D., MacDonald, J.** (2003). Assessment of an enterovirus sewage surveillance system by comparison of clinical isolates with sewage isolates from Milwaukee, Wisconsin, collected August 1994 to December 2002. *Appl Environ Microbiol*; 69(12): 7181-7187.
- She, R. C., Crist, G., Biletdeaux, E., Langer, J., Petti, C. A.** (2006). Comparison of multiple shell vial cell lines for isolation of enteroviruses: A national perspective. *J Clin Virol*; 37(3): 151-155.
- Somekh, E., Cesar, K., Handsher, R., Hanukoglu, A., Dalal, I., Ballin, A., Shohat, T.** (2003). An outbreak of echovirus 13 meningitis in central Israel. *Epidemiol Infect*; 130(2): 257-262.
- Tavares, F. N., Costa, E. V., Oliveira, S. S., Nicolai, C. C., Baran, M., da Silva, E. E.** (2006). Acute hemorrhagic conjunctivitis and coxsackievirus A24v, Rio de Janeiro, Brazil, 2004. *Emerg Infect Dis*; 12(3): 495-497.
- Terletskaia-Ladwig, E., Metzger, C., Schalasta, G., Enders, G.** (2000). Evaluation of enterovirus serological tests IgM-EIA and complement fixation in patients with meningitis, confirmed by detection of enteroviral RNA by RT-PCR in cerebrospinal fluid. *J Med Virol*; 61(2): 221-227.

- Thoelen, I., Lemey, P., Van Der Donck, I., Beuselinck, K., Lindberg, A. M., Van Ranst, M.** (2003). Molecular typing and epidemiology of enteroviruses identified from an outbreak of aseptic meningitis in Belgium during the summer of 2000. *J Med Virol*; 70(3): 420-429.
- Thoelen, I., Moes, E., Lemey, P., Mostmans, S., Wollants, E., Lindberg, A. M., Vandamme, A. M., Van Ranst, M.** (2004). Analysis of the serotype and genotype correlation of VP1 and the 5' noncoding region in an epidemiological survey of the human enterovirus B species. *J Clin Microbiol*; 42(3): 963-971.
- Trabelsi, A., Grattard, F., Nejmeddine, M., Aouni, M., Bourlet, T., Pozzetto, B.** (1995). Evaluation of an enterovirus group-specific anti-VP1 monoclonal antibody, 5-D8/1, in comparison with neutralization and PCR for rapid identification of enteroviruses in cell culture. *J Clin Microbiol*; 33(9): 2454-2457.
- Trallero, G., Avellón, A.** (2004). Importancia del diagnóstico de los echovirus desde el punto de vista epidemiológico. Circulación de echovirus 11 en los últimos años en España, Control Calidad SEIMC. <http://www.seimc.org/>.
- Trallero, G., Avellón, A., Otero, A., de Miguel, T., Alonso, M., Pérez-Breña, P.** (2006). Laboratory Network within the Polio Eradication Initiative (1998-2003): six years of surveillance for acute flaccid paralysis in Spain. *Enferm Infecc Microbiol Clin*; 24(3): 167-172.
- Trallero, G., Casas, I., Avellón, A., Pérez, C., Tenorio, A., De La Loma, A.** (2003). First epidemic of aseptic meningitis due to echovirus type 13 among Spanish children. *Epidemiol Infect*, 130(2): 251-256.
- Trallero, G., Casas, I., Tenorio, A., Echevarría, J. E., Castellanos, A., Lozano, A., Breña, P. P.** (2000). Enteroviruses in Spain: virological and epidemiological studies over 10 years (1988-97). *Epidemiol Infect*, 124(3): 497-506.
- Triki, H., Rezig, D., Bahri, O., Ben Ayed, N., Ben Yahia, A., Sadraoui, A., Ayed, S.** (2007). Molecular characterisation of a coxsackievirus A24 that caused an outbreak of acute haemorrhagic conjunctivitis, Tunisia 2003. *Clin Microbiol Infect*, 13 (2): -.
- Valdezate, S., Mesa, F., Otero, J. R.** (1998). Meningitis caused by enterovirus in a pediatric hospital: experience in 1996. *Enferm Infecc Microbiol Clin*; 16(3): 135-137.
- Van Doornum, G. J., De Jong, J. C.** (1998). Rapid shell vial culture technique for detection of enteroviruses and adenoviruses in fecal specimens: comparison with conventional virus isolation method. *J Clin Microbiol*; 36(10): 2865-2868.
- Watkins-Riedel, T., Woegerbauer, M., Hollemann, D., Hufnagl, P.** (2002). Rapid diagnosis of enterovirus infections by real-time PCR on the LightCycler using the TaqMan format. *Diagn Microbiol Infect Dis*; 42(2): 99-105.
- Witso, E., Palacios, G., Cinek, O., Stene, L. C., Grinde, B., Janowitz, D., Lipkin, W. I., Ronningen, K. S.** (2006). High prevalence of human enterovirus a infections in natural circulation of human enteroviruses. *J Clin Microbiol*; 44(11): 4095-4100.

- Yamashita, K., Miyamura, K., Yamadera, S., Kato, N., Akatsuka, M., Inouye, S., Yamazaki, S.** (1992). Enteroviral aseptic meningitis in Japan, 1981-1991. A report of the National Epidemiological Surveillance of Infectious Agents in Japan. *Jpn J Med Sci Biol*; 45(3): 151-161.
- Zhao, Y. N., Jiang, Q. W., Jiang, R. J., Chen, L., Perlin, D. S.** (2005). Echovirus 30, Jiangsu Province, China. *Emerg Infect Dis*; 11(4): 562-567.

ANEXO

References

1. Zell R, Krumbholz A, Wulzler P. Influenza A virus PB1-F2 gene [letter]. *Emerg Infect Dis*. 2006;12:1607-8.
2. Chen GW, Yang CC, Tsao KC, Huang CG, Lee LA, Yang WZ, et al. Influenza A virus PB1-F2 gene in recent Taiwanese isolates. *Emerg Infect Dis*. 2004;10:630-6.
3. Zamarin D, Ortigoza MB, Palese P. Influenza A virus PB1-F2 protein contributes to viral pathogenesis in mice. *J Virol*. 2006;80:7976-83.
4. Chen GW, Chang SC, Mok CK, Lo YL, Kung YN, Huang JH, et al. Genomic signatures of human versus avian influenza A viruses. *Emerg Infect Dis* 2006;9:1353-60.

Address for correspondence: Guang-Wu Chen, Chang Gung University, Department of Computer Science and Information Engineering, 259 Wen-Hua 1st Rd, Kwei-shan, Taoyuan, Taiwan 333; email: gwchen@mail.cgu.edu.tw

Enterovirus 75 and Aseptic Meningitis, Spain, 2005

To the Editor: Although most human enterovirus (EV) (genus *Enterovirus*, family *Picornaviridae*) infections are asymptomatic, they can cause upper respiratory illness, febrile rash, aseptic meningitis, pleurodynia, encephalitis, acute flaccid paralysis, and neonatal sepsislike disease (1). Most EVs have been implicated in aseptic meningitis, most notably echovirus (E) 30, 9, 6, and 11 and coxsackie B virus (CBV) type 5 (2); other serotypes are less frequently associated with neurologic disease.

New EV serotypes have come to light, chiefly as a result of molecular typing methods (3-6). EV75 was proposed as a new serotype of the EV genus in 2004 (5). Retrospective analysis showed that it had circulated sporadically in Asia, the United

States, and Africa since at least 1974. Only 8 isolates of this serotype have been reported worldwide, in 1974, 1985, 1986, 1987 (n = 2), 1998, and 2000 (n = 2). Infection in those cases was associated with respiratory disease, acute flaccid paralysis, neonatal jaundice, failure to thrive, or unspecified neurologic disease or was asymptomatic. At the time of writing this manuscript, EV75 had not been linked to aseptic meningitis.

From May 2005 through January 2006, 106 EVs were received for typing from Spanish hospital laboratories; 46 of them were from patients with aseptic meningitis, 10 from patients or contacts of patients with acute flaccid paralysis, 27 from patients with fever, 7 from patients with respiratory diseases, and 16 from other patients. Twenty EVs could not be typed by serum neutralization (7); however, 3' terminus VP1 gene sequence analysis (8) showed that they were E18 (n = 7), CBV3 (n = 1), and E16 (n = 2); 2 could not be typed with serologic or molecular methods because the 3' terminus of VP1 gene amplification was negative. The analysis of the 3' terminus of VP1 gene of the remaining 5 cerebrospinal fluid (CSF) and 3 nasopharyngeal isolates showed that they were similar to the recently proposed EV75 serotype (5). These 8 isolates were obtained from samples from children in Bilbao (n = 3), Granada (n = 3), Barcelona (n = 1), and the Canary Islands (n = 1). In 4 patients with aseptic meningitis, EV75 was isolated from CSF. EV75 was isolated from CSF of a fifth patient who had symptoms of fever and irritability. The remaining 3 EV75 isolates were from nasopharyngeal swabs of children who had fever, respiratory disease, or gastroenteritis. All isolates were grown in cell lines (rhabdomyosarcoma, lung adenocarcinoma, and human fetal lung fibroblast) and identified as EV by immunofluorescence with pan-EV antibody assays (Pan Entero Blend Chemicon,

Temecula, CA, USA, and Monoclonal Mouse Anti-Enterovirus, Dako, Glostrup, Denmark).

Phylogenetic analysis of the isolates from 2005 was performed on the basis of complete VP1 gene sequence (GenBank accession nos. DQ468137-DQ468142). The 5' terminal domain was obtained by reverse transcriptase-PCR with specific primers EV75_sense: 5'-GAAAGCTTYTTC-CAAGGGGA-3' and EV75_anti: 5'-GAGAAGTGKGACCAWCCATC-3'. Phylogenetic analysis of the Spanish isolates and representatives of all other species B EVs showed that the Spanish isolates clustered (bootstrap value 100, Figure) with strains USA/OK85-10362, ETH74-1341, USA/VA86-10363, USA/CT87-10364-5, OMA98-10366, and BAN00-10367-8 (accession nos. AY556063-AY556070), corresponding to the proposed EV75. The Spanish isolates constitute a subgroup (bootstrap value 100, Figure). The similarity between the Spanish cluster and other EV75 isolates was 82.8%-85.4% at the nucleic acid level. Although the entire VP1 sequence was not available for the isolates from 2006, the VP1 3' terminal analysis showed the strains belonged to the same cluster.

To our knowledge, this is the first isolation of EV75 in Spain. Indeed, isolation of EV75 has not been reported in Europe. Given that the European EV75 isolate grows easily in a variety of cell lines, is detected by common EV genus-specific antibodies, and that EV surveillance and typing were performed in Spain since 1988 (2), EV75 might have begun to circulate in Spain recently. However, because isolates are not obtained from all aseptic meningitis patients and many EVs are detected by PCR but never typed, we cannot rule out the possibility of previous asymptomatic circulation.

The European strains of EV75 appear to represent a different evolutionary lineage than those previously

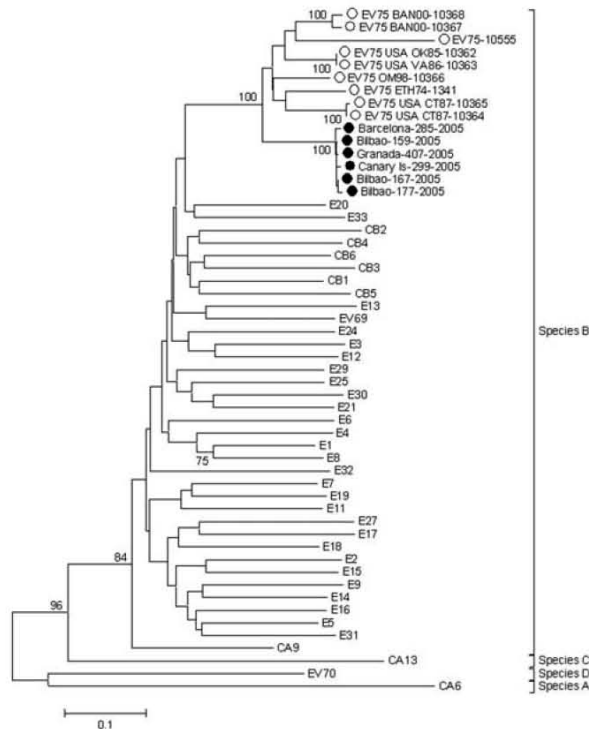


Figure. Phylogenetic analysis of complete VP1 sequences of Spanish enterovirus (EV) isolates (GenBank accession nos. DQ468137–DQ468142), the new proposed EV75 sequences (AY556063–AY556070 and AY919545), and prototype EV sequences (echovirus [E] 5, AJ241425; E31, AJ241435; E2, AF081315; E15, AJ241429; E14, AJ241428; E17, AF081330; coxsackie B virus [CBV] 2, AF081312; E26, AJ241433; E27, AF081338; E1, AJ241422; E8, AF081325; E4, AF081319; E21, AF081334; E30, AF081340; E25, AF081336; E29, AJ241434; CBV5, AF114383; CBV6, AF081313; E13, AF081327; EV69, AF081349; E24, AJ241432; E33, AF081346; E3, AF081316; E12, X77708; CBV3, M16572; CBV1, M16560; E6, AF081322; coxsackie A virus [CAV] 9, D00627; E16, AY302542; E9, AF524866; E7, AJ241426; E32, AF081345; E19, AJ241430; E11, AF081326; CBV4, X05690; E18, AF081331; E20, AJ241431; EV70, D17602; CAV6, AF081297; CAV13, AF081303; EV74, AY208118). Phylogenetic trees were constructed with the neighbor-joining method (MEGA version 3.0, available from <http://www.megasoftware.net>) with Kimura 2-parameter substitution model. Significance of phylogenies was estimated by bootstrap analysis with 1,000 pseudoreplicate datasets. Closed and open circles show Spanish and previously reported EV75 isolates, respectively.

described in the United States, Asia, and Africa (9). Only 1 of those EV75s was obtained from CSF (a nonspecific neurologic syndrome). Thus, EV75 has not been associated with aseptic meningitis, despite the fact that EV infections are a common cause of aseptic meningitis. Most of the Spanish isolates (5 of 8) were associated with aseptic meningitis in children. Although the number of EV75-associated cases was not high (as a

percentage of the number of EVs isolated from aseptic meningitis patients, 10.8%), the wide distribution of the cases may indicate wide circulation. To avoid outbreaks of aseptic meningitis caused by previously noncirculating EVs (EV13, 2001 [10]) and to help define the extent of circulation of newly identified EV types, careful surveillance of aseptic meningitis should be undertaken.

Ana Avellón,* Gurutze Rubio,†
Gustavo Palacios,‡
Inmaculada Casas,*
Nuria Rabella,§ Gabriel Reina,¶
Cármén Pérez,# W. Ian Lipkin,‡
and Gloria Trallero*

*Carlos III Institute of Health, Majadahonda, Spain; †Cruces Hospital, Bilbao, Spain; ‡Columbia University, New York, New York, USA; §Sant Pau y Santa Creu Hospital, Barcelona, Spain; ¶Virgen de las Nieves Hospital, Granada, Spain; and #Doctor Negrin Hospital, Las Palmas de Gran Canaria, Spain

References

- Melnick JL. Enteroviruses: polioviruses, coxsackieviruses, echoviruses, and newer enteroviruses. In: Fields BN, Knipe DM, Howley PM, editors. *Virology*. 3rd ed. Philadelphia: Lippincott-Raven; 1996. p. 655–712.
- Trallero G, Casas I, Tenorio A, Echevarria JE, Castellanos A, Lozano A, et al. Enteroviruses in Spain: virological and epidemiological studies over 10 years (1988–97). *Epidemiol Infect.* 2000;124:497–506.
- Oberste M, Schnurr D, Maher K, al-Busaïdy S, Pallansch M. Molecular identification of new picomaviruses and characterization of a proposed enterovirus 73 serotype. *J Gen Virol.* 2001;82:409–16.
- Norder H, Bjerregaard L, Magnus L, Lina B, Aymard M, Chomel JJ. Sequencing of “untypable” enteroviruses reveals two new types, EV-77 and EV-78, within human enterovirus type B and substitutions in the BC loop of the VP1 protein for known types. *J Gen Virol.* 2003;84:827–36.
- Oberste MS, Michele SM, Maher K, Schnurr D, Cisterna D, Junttila N, et al. Molecular identification and characterization of two proposed new enterovirus serotypes, EV74 and EV75. *J Gen Virol.* 2004;85:3205–12.
- Oberste MS, Maher K, Michele SM, Belliot G, Uddin M, Pallansch MA. Enteroviruses 76, 89, 90 and 91 represent a novel group within the species human enterovirus A. *J Gen Virol.* 2005;86:445–51.
- Melnick JL, Wimberly IL. Lyophilized combination pools of enterovirus equine antisera: new LBM pools prepared from reserves of antisera stored frozen for two decades. *Bull World Health Organ.* 1985;63:543–50.
- Casas I, Palacios GF, Trallero G, Cisterna D, Freire MC, Tenorio A. Molecular characterization of human enteroviruses in clinical samples: comparison between VP2, VP1, and RNA polymerase regions using RT nested PCR assays and direct sequen-

- cing of products. *J Med Virol*. 2001; 65:138–48.
9. Palacios G, Casas I, Cisterna D, Trallero G, Tenorio A, Freire C. Molecular epidemiology of echovirus 30: temporal circulation and substitution of single lineages. *J Virol*. 2002;76:4940–9.
 10. Avellon A, Casas I, Trallero G, Perez C, Tenorio A, Palacios G. Molecular analysis of echovirus 13 isolates and aseptic meningitis, Spain. *Emerg Infect Dis*. 2003;9:934–41.

Address for correspondence: Ana Avellón, Spanish Enterovirus Reference Laboratory, National Center of Microbiology, Carlos III Institute of Health, Carretera de Majadahonda a Pozuelo, Km 2, Majadahonda 28220, Madrid, Spain; email: aavellon@isciii.es

Ciprofloxacin-resistant *Salmonella* Kentucky in Travelers

To the Editor: Ciprofloxacin is the treatment of choice of severe nontyphoidal *Salmonella* infections in adults. Resistance to ciprofloxacin has been found exceptionally in nontyphoidal *Salmonella enterica* isolates and only in serotypes Typhimurium, Choleraesuis, and Schwarzengrund (1–8). Such isolates have been collected from humans and animals in Europe, Asia, and North America.

We report the emergence of ciprofloxacin-resistant isolates of *S. Kentucky* since 2002 in French travelers returning from northeast and eastern Africa. From 2000 through 2005, 197 *S. Kentucky* isolates from humans (1 per patient) were serotyped, from 69,759 total *S. enterica* isolates serotyped at the French National Reference Centre for *Salmonella*. Antimicrobial drug sus-

ceptibility was determined for 186 isolates by the disk-diffusion method with 32 antimicrobial drugs, as previously described (9). Resistance to several drugs, amoxicillin (18%), gentamicin (16%), nalidixic acid (21%), sulfonamides (24%), and tetracycline (24%), has been observed from 2000 through 2005.

A total of 17 (9%) ciprofloxacin-resistant *S. Kentucky* strains were isolated. A resistant isolate that was untypable by conventional serotyping (rough) but that had a pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) profile associated with serotype Kentucky, was included in this study. Ciprofloxacin MIC levels in these isolates, determined by standard agar doubling dilution as previously described (2), were 4–16 mg/L. The first ciprofloxacin-resistant strain was isolated in December 2002 from a French tourist who had gastroenteritis during a Nile cruise in Egypt. In 2004 and 2005, 17 ciprofloxacin-resistant isolates were identified in unrelated adults who lived in different cities of France at different times of the year. The 16 patients we contacted acquired the infection during or immediately after travel to Egypt (10 patients), Kenya and Tanzania (3), or Sudan (1). In 2 cases, gastroenteritis occurred 2 months after travel to Egypt. None of the investigated cases were fatal or life-threatening.

The 18 ciprofloxacin-resistant isolates (17 serotype Kentucky and 1 rough) displayed various susceptibility patterns, from single resistance to quinolones to multiple resistance (up to 9 antimicrobial agents). To identify mutations responsible for ciprofloxacin resistance, the quinolone resistance-determining regions (QRDRs) of *gyrA*, *gyrB*, *parC*, and *parE* were amplified by PCR and sequenced as described previously (3,9), except that different forward primers for *gyrB* (5'-TTATCGACGC-CGCGCGTGCGC-3') and *parE* (5'-CGCGTAACTGCATCG-GGTTCC-3')

were used. The 18 ciprofloxacin-resistant isolates had different double mutations in *gyrA* leading to amino acid substitutions, Ser83Phe and Asp87Gly (8 isolates), Ser83Phe and Asp87Asn (5), and Ser83Phe and Asp87Tyr (5), but had identical mutations in *parC* (resulting in Ser80Ile). An additional substitution was observed in *ParC*, Thr57Ser. This substitution, however, did not appear to be associated with quinolone resistance because it was also identified in nalidixic acid-susceptible isolates. No isolates had substitutions in the QRDRs of *GyrB* and *ParE*. All isolates tested by PCR for the plasmid-mediated quinolone resistance-conferring gene *qnrA* (9) were negative. In the presence of the efflux pump inhibitor Phe-Arg- β -naphthylamide, the MICs of ciprofloxacin were reduced from 4-fold to 16-fold, which suggests that an active efflux mechanism was present (2). The involvement of the AcrAB-TolC efflux system was determined by measuring AcrA expression with a method previously described (5). A moderate production of AcrA (3- to 4-fold increase when compared with the baseline production of AcrA in reference strain 98K) was observed in all but 1 ciprofloxacin-resistant isolate. This isolate overproduced (6-fold) AcrA, which correlated with a higher ciprofloxacin MIC (16 mg/L).

The 18 ciprofloxacin-resistant isolates and 14 ciprofloxacin-susceptible *S. Kentucky* isolates used for comparison were genotyped by PFGE with *Xba*I restriction and PulseNet's running conditions, as described previously (9). Each profile that differed by ≥ 1 clear band >50 kb was considered a distinct profile. The 18 resistant isolates displayed 9 profiles that differed by 1 to 3 bands (Dice correlation coefficient 55%) (Figure). Profile X1c was predominant (7 [39%] of 18). The 6 pansusceptible isolates tested displayed 5 different patterns unrelated to those of resistant isolates. Use of a