



FACULTAD DE MEDICINA
UNIVERSIDAD DE CHILE

**UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE MEDICINA
ESCUELA DE POSTGRADO**



CIRCULACIÓN DE ENTEROVIRUS D-68 Y SUS CARACTERÍSTICAS FILOGENÉTICAS EN CHILE

CARLA NICOLE ARAYA PAREDES

TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE

MAGISTER EN MICROBIOLOGÍA

Director de Tesis: Prof. Dra. Sandra Ampuero Llanos

Prof. Bq. Rodrigo Fasce Pineda

2017

Escuela de Postgrado



FACULTAD DE MEDICINA
UNIVERSIDAD DE CHILE

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE MEDICINA
ESCUELA DE POSTGRADO

INFORME DE APROBACION TESIS DE MAGISTER

Se informa a la Comisión de Grados Académicos de la Facultad de Medicina, que la Tesis de Magister presentada por la candidata

CARLA NICOLE ARAYA PAREDES

ha sido aprobada por la Comisión Informante de Tesis como requisito para optar al Grado de Magister en MICROBIOLOGÍA en el Examen de Defensa de Tesis rendido el día 14/12/2017

Prof. Dra. Sandra AmpueroLlanos
Director de Tesis
Prof. Bq. Rodrigo Fasce Pineda
Director de Tesis

COMISION INFORMANTE DE TESIS

Prof. Dra. Carmen Larrañaga
Prof. Dr. Mónica Acevedo

Prof. Dr. Francisco Silva
Prof. Héctor Galeno

Prof. Dra. Vivian Luchsinger
Presidente Comisión

Escuela de Postgrado

A mis amadas Julieta y Josefina

AGRADECIMIENTOS

Al llegar al final de este camino, uno hace un 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 todo este proyecto.

Por ello quiero agradecer en primer lugar a mi hermosa familia por siempre confiar y apoyar cada decisión durante estos años, en especial agradecer la contención para afrontar toda esta etapa. Gracias por quererme sin condiciones y soportar todo el peso de este nuevo proyecto. Gracias a mis princesas amadas Julieta y Josefina por caminar conmigo en este sueño y ser mi soporte.

También agradecer a Rodrigo Fasce por las enseñanzas, ayuda y orientación en estos años y la confianza para realizar este trabajo.

Igualmente agradecer a la Dra. Sandra Ampuero por formar parte de este proyecto de vida, siempre con una palabra de aliento y un apoyo incondicional.

A todos mis amigos por su apoyo incondicional y paciencia durante todo este tiempo.

A todos de corazón, simplemente Muchas Gracias. Ya que sin ustedes no se podría haber concretado este sueño.

INDICE

	Pág
I INTRODUCCION	3
Figura 1: Clasificación de la familia <i>Picornaviridae</i>	4
I.1 Características generales de los Picornavirus	5
Figura 2: Organización del genoma de Enterovirus	6
I.2 Características estructurales, moleculares y patogenia de EV-D68	7
I.3 Enterovirus D-68: Epidemiología y asociación a enfermedad	10
II HIPOTESIS	13
III OBJETIVO GENERAL	13
III.1 Objetivos específicos	13
IV MATERIALES Y METODOS	14
IV.1 Diseño general	14
IV.2 Muestras en estudio	14
IV.3 Diagnóstico de virus respiratorios	15
IV.3.1 Detección de EV-D68	17
IV.4 Recolección, procesamiento y análisis estadístico	18
IV.5 Genotipificación y análisis filogenético	19
V RESULTADOS	21
V.1 Caracterización de muestras incluidas en el estudio	20
Tabla 1: Distribución por edad, género y año de ingreso de los pacientes que se incorporaron al estudio.	21

Gráfico 1: Distribución por región de procedencia de los pacientes que entraron al estudio entre los años 2014 – 2016.	22
V.2 Detección de EV-D68 en las muestras incorporadas al estudio	22
Tabla 2: Valores de Cts en las muestras positivas a EV-D68 detectadas en este estudio.	23
V.3 Co-infecciones y características clínicas de los pacientes EV-D68 positivos	24
Gráfico 2: Distribución mensual de resultados de las muestras analizadas durante el estudio.	25
Tabla 3: Características clínicas, demográficas y epidemiológicas de pacientes EV-D68 positivos.	26
V.4 Análisis filogenético	27
Figura 3: Árbol filogenético EV-D68 construido basado en el modelo de máxima verosimilitud.	29
VI DISCUSIÓN	30
VII CONCLUSIONES	38
VII BIBLIOGRAFÍA	39

Abreviaturas

ADV	Adenovirus
CDC	Centro para el control y prevención de enfermedades
CoNL63	Coronavirus NL63
CoOC43	Coronavirus OC43
EV-D68	Enterovirus D68
HBoV	Bocavirus
HMPV	Metapneumovirus
IRA	Infección respiratoria Aguda
IRAG	Infección respiratoria Aguda grave
IRES	Sitio interno de entrada al ribosoma
LCR	Líquido Cefalorraquídeo
OMS	Organización mundial de la Salud
OVR	Otros Virus Respiratorios
PFA	Parálisis Flácida Aguda
PI	Parainfluenza
RHV	Rinovirus
SSIII RT/Platinum	SuperScript® III Platinum® One-Step qTR-PCR
UTR	Región no traducida
VP1	Proteína o región codificante para la proteína VP1 de la cápside

VPg Proteína del genoma del virion

VRS Virus Respiratorio Sincicial

Abstract

Respiratory viruses are the main cause of acute respiratory infection in pediatrics. Among the viral agents isolated in the respiratory tract are the Enteroviruses, of which little is known about their prevalence and role in infections. Enterovirus D68 (EV-D68) is a re-emerging virus that may cause acute respiratory infections and has been associated with cases of bronchiolitis and pneumonia mainly in children, and is also being currently associated with neurological complications such as acute flaccid paralysis (AFP). In the autumn of 2014, the largest outbreak of EV-D68 was recorded with about 2287 cases that spread around the world. In our country, there have been no studies published on the systematic detection of this virus in respiratory samples. The aim of this cross-sectional study was to identify and characterize the circulation of EV-D68 in Chile. For that 1966 respiratory samples collected between 2014-2016 of patients admitted under the national surveillance program of severe acute respiratory infections (SARI) at the Institute of Public Health of Chile, were studied. All of them were negative for Influenza virus by RT-PCR. The samples were analyzed for respiratory syncytial virus, Metapneumovirus, Parainfluenza (1, 2 and 3), Adenovirus, Rhinovirus, Bocavirus, Coronavirus (OC43 and NL63) and EV-D68 by real-time PCR with reverse transcription in the cases of RNA viruses, using TaqMan probes and protocols established by the Center for Disease Control and Prevention (CDC). A total of 15 positive samples (0.76%) for EV-D68 were identified, 13 samples from 2014, one from 2015 and one from 2016.

To determine the circulating genotypes, the VP1 gene was sequenced. This gene codes for a structural protein of the viral capsid, which provides antigenicity sites to the viral particle.

Through phylogenetic analysis, it was established that 14 samples belonged to subclade B1, while the positive sample from year 2016 belonged to subclade B3. These results are consistent with the clades that circulated between 2014 and 2015, subclade B1. Subclade B3 was detected in 4 countries besides ours in 2016 (USA, Holland, Denmark and Sweden). It is important to present in detail the distribution over time and the epidemiology of this emerging virus, due to the secondary complications during the development of the disease, either at the neurological or respiratory level and see its impact on public health in our country.

Resumen

Los virus respiratorios son la principal causa de infección respiratoria aguda en pediatría. Dentro de los agentes virales aislados en los cuadros respiratorios se encuentran los enterovirus, de los cuales se conoce poco sobre su prevalencia y rol en las infecciones respiratorias. El enterovirus D68 (EV-D68), virus RNA de la familia *Picornaviridae*, es un virus re-emergente que causa infección respiratoria aguda y se ha asociado con casos de bronquiolitis y neumonía principalmente en niños, y actualmente también se asocia a complicaciones neurológicas como Parálisis Flácida Aguda (PFA) (Ayscue, 2014)

En otoño de 2014 ocurrió el mayor brote por EV-D68 con 2287 casos repartidos prácticamente por todo el mundo. En nuestro país, no se han publicado estudios de detección sistemática de este virus en muestras respiratorias. El objetivo de este estudio transversal fue identificar y caracterizar la circulación de EV-D68 en Chile. Se incorporaron al estudio 1966 muestras respiratorias obtenidas entre los años 2014-2016 ingresadas bajo el programa nacional de vigilancia de infecciones respiratoria aguda grave (IRAG) en el Instituto de Salud Pública de Chile, todas negativas para virus Influenza. En todas las muestras se analizaron: virus respiratorio sincicial, metapneumovirus, parainfluenza (1, 2 y 3), adenovirus, rinovirus, bocavirus, coronavirus (OC43 y NL63) y EV-D68, mediante PCR en tiempo real con transcripción reversa en los casos de virus RNA, utilizando sondas TaqMan y protocolos establecidos por el Centro para el Control y Prevención de

Enfermedades (CDC). Se identificaron 15 muestras positivas (0,76%) para EV-D68: 13 eran muestras obtenidas el 2014, una era del 2015 y la última del 2016.

Los genotipos circulantes se determinaron mediante la secuenciación del gen VP1, que codifica para una proteína estructural de la cápside viral y le otorga sitios de antigenicidad a la partícula viral. Filogenéticamente se estableció que 14 muestras pertenecían al subclado B1, mientras que la muestra positiva del año 2016, pertenecía al subclado B3. Estos resultados se condicen con los clados que circularon entre el 2014 y 2015 pertenecientes al subclado B1. El subclado B3 se detectó solo en 4 países además del nuestro (EE.UU, Holanda, Dinamarca y Suecia).

Es importante dar a conocer en detalle la distribución en el tiempo y epidemiología de este nuevo virus emergente por las complicaciones secundarias durante el desarrollo del cuadro clínico, ya sea a nivel neurológico como respiratorio, y ver el impacto en salud pública en nuestro país. En conclusión, Enterovirus D-68 circula en niños y adultos con cuadros respiratorios agudos graves en nuestro país, en forma esporádica y en brote, y en frecuente coinfección con otros virus respiratorios. La baja detección (0.76%) no justifica una vigilancia activa de este virus respiratorio.

I INTRODUCCIÓN

Las infecciones respiratorias agudas (IRA), en particular las que afectan el tracto respiratorio inferior, predominan a nivel mundial como causa de muerte. Según datos de la Organización Mundial de la Salud (OMS), en la población pediátrica, ocurren dos millones de fallecimientos anuales por esta causa (OMS., 2004). Estas infecciones respiratorias pueden presentarse, ya sea en forma de casos esporádicos, como también produciendo brotes, epidemias o pandemias. Además, originan pérdidas millonarias a los Estados por concepto de ausencias laborales, escolares, costos de consultas médicas, hospitalización y medicamentos, tanto en la atención primaria como en los servicios de urgencias (*Bertino, 2002*). Entre los agentes virales más comunes de estas infecciones se encuentran: virus respiratorio sincicial humano, virus influenza (A y B), virus parainfluenza, adenovirus, rinovirus, metapneumovirus, enterovirus y coronavirus humanos (CoVH-229E y CoVHOC43). A esta lista se suman virus respiratorios nuevos, algunos de ellos emergentes como el coronavirus humano causante del síndrome agudo respiratorio severo (SARS) (*Drosten, 2003*) y otros dos coronavirus humanos identificados en Holanda (NL63) (*Van der Hoek, 2004*) y Hong Kong (HKU1) (*Woo, 2005*).

Poco se sabe de los enterovirus respiratorios, de su prevalencia, de su diagnóstico y de la sintomatología de sus cuadros. En el año 2014 tuvo lugar el brote más grande de Enterovirus D68, asociado además de cuadros respiratorios graves a

casos reportados de parálisis flácida, por lo cual ha surgido como un virus emergente con relevancia a nivel de salud pública.

Los diferentes enterovirus comparten un gran número de características clínicas, epidemiológicas y ecológicas, así como ciertas propiedades físicas y químicas. Difieren entre sí por el comportamiento en cultivo celular, antigenicidad y ciclo replicativo, aunque, en todos los casos, el hábitat común y el lugar de replicación son células epiteliales de la orofaringe y la mucosa intestinal.

Los enterovirus pertenecen a la familia *Picornaviridae*, que consta de 29 géneros que incluyen: Enterovirus, Parechovirus, Hepatovirus, Cardiovirus, Aphthovirus (Figura 1).

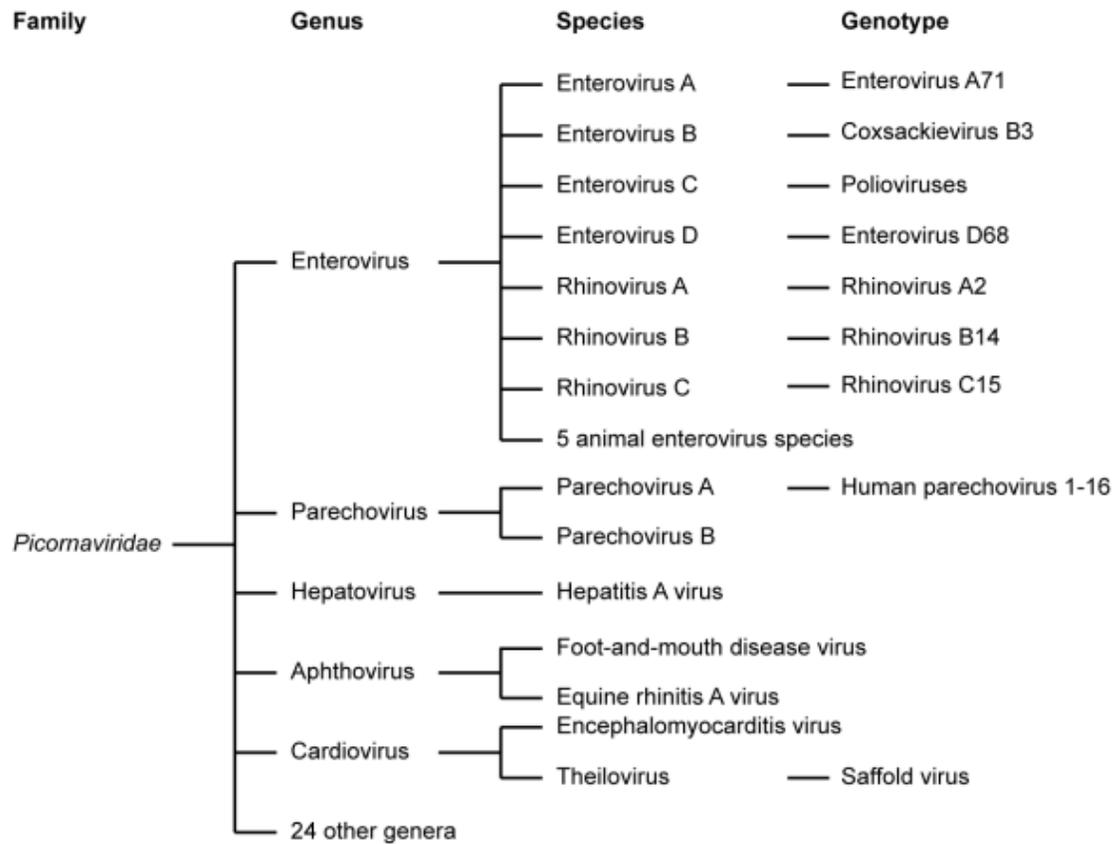


Figura 1: Clasificación de la familia *Picornaviridae* y especies del género Enterovirus (*Van der Linden, 2015*).

Los tres primeros son los más importantes para el hombre y producen una amplia gama de enfermedades que van desde un resfriado común a una parálisis grave.

Dentro del género Enterovirus se agrupan importantes patógenos humanos que incluyen 89 serotipos: poliovirus, coxsackievirus A, coxsackievirus B, echovirus y enterovirus (*Oberste, 2001*). El progreso obtenido en los últimos años en el conocimiento de la biología de estos agentes ha conducido a que en el género enterovirus (EV) se clasifiquen en la actualidad 12 especies, siendo EV A, B, C y D y rinovirus (A, B y C) los que afectan a los humanos (*Oberste, 2004*)

Los tipos de enterovirus aislados más recientemente se han nombrado con un sistema de números consecutivos: EV-D68, EV-D69, EV-D70, etc., los cuales se agrupan dentro del grupo D y particularmente el EV-D68 está asociado a infecciones respiratorias agudas (*Imamura, 2014*).

I.1 Características generales de los Picornavirus

Los Picornavirus son virus icosaédricos, de 28 a 30 nm de diámetro y su cápside contiene 60 subunidades proteicas. Su composición abarca un 30% de ARN y 70% de proteína. El genoma viral es de una sola cadena lineal, de sentido positivo. Su genoma actúa directamente como ARN mensajero (ARNm) para la síntesis de las proteínas virales; y también como molde para síntesis de RNA genómico. El extremo 3' está poliadenilado y el 5' tiene unido covalentemente un

oligopéptido codificado por el virus, denominado VPg. En ambos extremos de la cadena se encuentran zonas no codificantes llamadas UTR (del inglés untranslated region). En la región central se encuentra la zona codificadora que contiene un total de 11 genes. Esta región se traduce como una sola poliproteína de 247 kD, que luego de un proceso proteolítico da lugar a 11 proteínas finales con diversas funciones (Figura 2).

Posee cuatro proteínas principales (VP1- VP4), originadas a partir de su poliproteína precursora. Las proteínas de superficies (VP1 y VP3) poseen los sitios fundamentales para la fijación de anticuerpos y la proteína interna (VP4) se asocia con el ARN viral. No posee una envoltura y su replicación ocurre en el citoplasma.

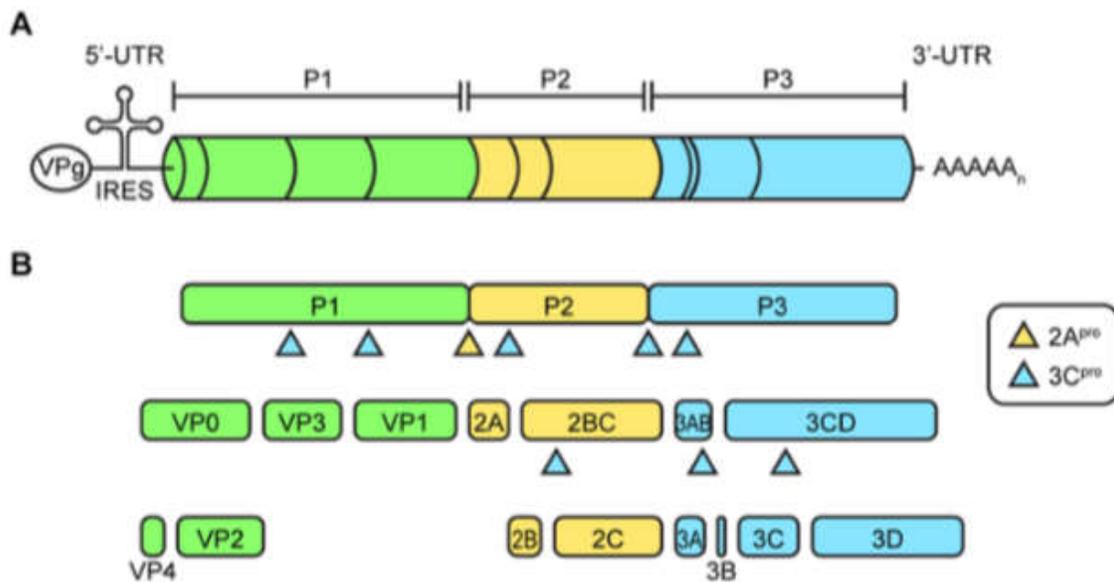


Figura 2: Organización del genoma de Enterovirus. (A) El genoma de enterovirus codifica una única poliproteína dividida en 3 regiones P1, P2 y P3. En los extremos 5' y 3', el genoma contiene regiones no traducidas (UTR), las cuales están

altamente estructuradas. El extremo 5'-UTR contiene un sitio interno de entrada al ribosoma para la traducción. En el extremo 5', además contiene la proteína vírica VPg, que se usa como cebador durante la replicación del ARN; (B) La poliproteína es procesada por proteasas virales (2A – 3C) que dan lugar a las proteínas virales. (Van der Linden, 2015)

A pesar de pertenecer a la misma familia que los rinovirus, los EV se distinguen por presentar propiedades físicas, químicas, y biológicas diferentes, entre ellas, la estabilidad a pH ácido (3 - 5), lo que les permite su paso por el tracto digestivo sin que pierdan su actividad biológica y la temperatura óptima de crecimiento de 37°C.

I.2 Características estructurales, moleculares y patogenia de EV-D68

EV-D68 fue aislado por primera vez en 1962 en muestras respiratorias de casos con neumonía y bronquiolitis (Schieble, 1967). Este virus presenta algunas características similares a los rinovirus humanos, como su sensibilidad al ácido y crecimiento a temperatura baja, en promedio 28°C. Su genoma está conformado por cuatro proteínas estructurales y siete no estructurales (Figura 2).

Dentro de las proteínas estructurales, la proteína de cápside VP1 cumple un papel esencial en los análisis filogenéticos. El análisis de la secuencia de VP1 permitió identificar las variantes o serotipos de EV, teniendo en cuenta las características biológicas y moleculares de las cuatro especies de EV (EV-A, B, C y D).

EV-68 pertenece al grupo D (Oberste, 2004). Mediante el análisis filogenético basado en el gen VP1 de EV-D68 se identifican tres clados primarios: A, B y C. El

clado A se ha identificado principalmente en países de Asia, Europa, África y América del Norte. En un sector de África del Sur se identificó un genotipo correspondiente al clado B, cuyo genoma es la combinación de una pequeña parte de la secuencia del genotipo identificado en EE.UU y Europa, específicamente en la región del loop BC de VP1 (CDC, 2011). Es importante establecer las variaciones en la secuencia de VP1 ya que en la proteína VP1 se encuentran los sitios antigénicos principales de la cápside (*Harvala, 2002*). Además, los determinantes de virulencia, termo-estabilidad del virión, rango hospedero y tropismo celular *in vitro*, se asocian con esta región codificadora de la cápside (*Tracy, 2006*).

EV-D68 se une específicamente al ácido siálico $\alpha 2-6$, que se encuentra predominante en el tracto respiratorio superior humano (*Imamura, 2014*). EV-D68 no tiene afinidad con el ácido siálico $\alpha 2-3$, el cual se encuentra presente en epitelio ciliado de células del tracto respiratorio inferior; esto sugiere que existen mecanismos alternativos que pueden ser responsables de la enfermedad respiratoria baja grave asociada con este virus. La entrada de EV-D68 en las células requiere de mediadores adicionales, como es el caso de EV-D70 que pertenece al mismo clúster genético que EV-D68, que entra a las células utilizando el factor acelerador de la degradación (DAF) (*Karnauchow, 1996*). Existe evidencia que EV-D68 también utiliza DAF para entrar a las células, DAF se expresa en altos niveles tanto en células epiteliales como endoteliales las cuales podrían jugar un papel importante en la inducción de la viremia que precede a la infección de tejidos específicos, como el corazón o páncreas (*Blomqvist, 2002*). Además, EV-D68 tiene la capacidad de infectar linfocitos. Esto puede proporcionar un

mecanismo por el cual se transporta el virus durante la fase de viremia al órgano secundario.

Poco se conoce del mecanismo por el cual EV-D68 causa síntomas neurológicos en los pacientes, que a lo largo del curso de la enfermedad pueden llegar a desarrollar Parálisis Fláccida Aguda. Durante el 2016, Wei identificó a ICAM-5/Telencefalina, una molécula con especificidad neuronal que actuaba como receptor celular para EV-D68. Además, se ha detectado alta expresión del RNAm de ICAM-5 en tracto respiratorio, lo cual es consistente con la habilidad de EV-D68 de replicar en dicho sistema (*Midgley, 2014*).

Los investigadores han estudiado si las cepas de EV-D68 emergentes difieren en su antigenicidad y propiedades de unión al receptor en comparación con la cepa aislada en 1962. Utilizando antisueros generados a partir de diversas cepas de EV-D68, se detectaron diferencias significativas en términos de inhibición de la hemaglutinación y los títulos de neutralización tanto entre cepas emergentes y la cepa original como también dentro de las mismas cepas emergentes (*Imamura, 2014*).

La detección en suero de EV-D68 varía con la edad, no se detecta viremia en el suero de los niños menores de 1 año, lo que sugiere que anticuerpos maternos son protectores (*Smura, 2010*).

Debido a la emergencia de los brotes, se han analizado filogenéticamente todas las muestras de EV-D68 aislados de infecciones respiratorias agudas, dando como cepa común la aislada en el primer caso clínico detectado en EE.UU durante el 2014 (*Holm-Hansen, 2016*).

Actualmente se están realizando estudios de inmunidad y uso de antivirales para disminuir los efectos de los brotes causados por este agente. De todos los que se han estudiado, Pleconaril es el más prometedor, el cual pertenece a la serie de compuestos oxazolinilisoaxazoles con demostrada actividad frente a la mayoría de Enterovirus. Su mecanismo de acción consiste en su unión al bolsillo de fijación existente en la cápside viral que determina la fijación de los Enterovirus al receptor celular. Por lo tanto, bloquea la fijación del virus a la célula, no permite su decapsidación y con ello impide la replicación viral (*Liu, 2015*).

I.3 ENTEROVIRUS D-68: EPIDEMIOLOGÍA Y ASOCIACIÓN A ENFERMEDAD

Como se mencionó anteriormente, EV-D68 es biológicamente más similar a los rinovirus y se encuentra asociado a enfermedades respiratorias (*Oberste, 2004*). En la literatura se publican porcentajes variables sobre la frecuencia de los Enterovirus en la etiología de las IRA que oscilan entre 1-36% (*Meijer, 2014, Bragstad, 2015, Robinson, 2014*). Las infecciones causadas por este virus son raramente reportadas, solo se reportaron 79 casos entre 2009 y 2013 en EE.UU. Sin embargo, 2 casos de parálisis causada por este agente pusieron en alerta al Centro de Control de Enfermedades (CDC, Atlanta). Inesperadamente un alto número de niños comenzó a presentar síntomas respiratorios por EV-D68 junto con complicaciones neurológicas como se detalla a continuación. En EE.UU, se publicó una revisión de casos con Parálisis Flácida Aguda (PFA) asociados a EV-D68, describiéndose 59 casos, con una mediana de edad de 9 años y 50 de ellos menores de 21 años. En estos casos, EV-D68 se identificó solo en muestras

respiratorias o heces, sin lograr realizar aislamiento viral en líquido cefalorraquídeo (LCR). De estos casos, fallecieron dos adultos inmunodeprimidos (*Greninger, 2015*).

En Europa se han descrito algunos casos de PFA también asociado con EV-D68: uno en Francia, dos casos en Noruega durante el 2014 y cuatro casos en el Reino Unido entre 2015-2016 (*Williams, 2016*); en ninguno de ellos se detectó el virus en LCR. Sin embargo, en el caso descrito en Australia (*Levy, 2015*) y en dos casos en Italia (*Esposito, 2016*) se pudo identificar el virus en ese tipo de muestra. Las causas por las que el EV-D68 no se detectó en LCR en los otros casos de PFA no están claras. La edad promedio de los afectados por EV-D68, bordea los 3 años. Los síntomas comunes en todos los casos diagnosticados fueron tos, sibilancias y fiebre. Todos los afectados requirieron hospitalización, el 57% ingresó directo a una Unidad de Cuidados Intensivos (UCI) y el 86% requirió oxígeno (*Engelmann, 2017*). En América no se conoce con exactitud la frecuencia de aparición de cuadros respiratorios asociados a este virus y tampoco su posible etiología en cuadros neurológicos. Sólo se ha descrito un caso en Haití (*Badry, 2016*), 24 casos en México (*Vazquez, 2016*), 2 casos en Brasil (*Carney, 2015*) y 2 casos en Chile (*Torres, 2015*). Todos presentaron cuadros respiratorios agudos y ningún caso con secuelas neurológicas.

La principal observación en los recientes brotes de EV-D68 se relaciona con el grupo etario más afectado. La mayoría de los casos son niños, sugiriendo que los adultos tienen inmunidad a ella. En este sentido, estudios sero-epidemiológicos realizados en Finlandia han demostrado que la mayoría de los adultos (86%) tienen anticuerpos neutralizantes para este agente. Estos agentes no son

priorizados en la vigilancia sistemática de las IRA, ni son de notificación obligatoria, por lo que muchos países carecen de las herramientas diagnósticas para su identificación y de datos históricos sobre su circulación. Como es lo que ocurre en nuestro país, por lo cual es importante estudiar la circulación de EV-D68, con el fin de poder definir su presentación, distribución y posible asociación a cuadros respiratorios graves y complicaciones neurológicas, antecedentes que aún no están disponibles en Chile.

II HIPÓTESIS

En nuestro país, Enterovirus D-68 circula en casos de cuadros respiratorios agudos graves.

III OBJETIVO GENERAL

Determinar la circulación de Enterovirus D-68 en infecciones respiratorias agudas graves (IRAG) durante el período 2014 – 2016 en Chile y describir sus características filogenéticas.

III.1 OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Determinar la circulación de EV-D68 en Infecciones agudas del tracto respiratorio, influenza negativa, mediante transcripción inversa- reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) en tiempo real.
- Determinar co-infecciones de EV-D68 con otros virus respiratorios en infecciones agudas del tracto respiratorio, influenza negativa, mediante PCR en tiempo real con transcripción inversa en caso de virus RNA.
- Relacionar la detección de EV-D68 con características clínicas y demográficas de la población objeto de estudio.
- Determinar las relaciones filogenéticas con clados descritos a nivel mundial analizando las secuencias del gen VP1 de EV-D68.

IV MATERIALES Y METODOS

IV.1 Diseño general

Se realizó un estudio transversal de serie de casos de IRAG, no asociados a virus Influenza.

IV.2 Muestras en estudio

Se analizaron 1966 muestras de hisopado/aspirado nasofaríngeo mantenidas en medio de transporte viral, provenientes de la vigilancia nacional de IRAG con RT-PCR negativo para virus Influenza. Las muestras provienen de pacientes de diferentes regiones del país con diagnóstico de IRAG y que fueron recibidas entre los años 2014 - 2016 en la sección de Virus Respiratorios del Instituto de Salud Pública (ISP). Este estudio fue aprobado por el comité Científico, del Departamento de Asuntos Científicos del Instituto de Salud pública.

Los criterios de inclusión para ingresar al sistema de vigilancia establecidos por el ISP se detallan a continuación.

Criterios de inclusión:

Pacientes provenientes de hospitales del sistema público, con diagnóstico clínico presuntivo de IRAG con antecedente de fiebre o fiebre medida $\geq 38\text{ C}^\circ$ y tos; con inicio dentro de los últimos 10 días, y que requiere hospitalización. Los pacientes que cumplen estos criterios se les toma una muestra de hisopado/aspirado nasofaríngeo para ser enviada al laboratorio de referencia nacional de virus respiratorios (ISP- Santiago) en las primeras 72 horas posteriores a su colecta,

con el volumen suficiente para las determinaciones a realizar, correctamente identificada y transportada al laboratorio en un sistema de triple embalaje a 4°C.

Criterios de exclusión:

Toda muestra positiva para virus influenza, tanto A como B por RT-PCR ingresada al sistema de vigilancia de IRAG.

IV.3 Diagnóstico de virus respiratorios

Las muestras ingresadas al protocolo de estudio se procesaron de la siguiente manera. Se extrajo el material genético a partir de 600 ul de muestra de hisopado/aspirado en medio de transporte viral; se adicionó tampón lisis y se procedió a la extracción automatizada utilizando el equipo Nuclisens easy Mag (Biomerieux). El volumen eluído fue de 120 ul. El ácido nucleico extraído se almacenó a -80°C. A todas las muestras que forman parte de la vigilancia de virus respiratorios, como se explicó anteriormente, se les realizó la detección de virus Influenza mediante RT-PCR utilizando el protocolo del CDC (CDC., 2009). Todas las muestras negativas en la detección de virus Influenza, muestras del estudio, fueron analizadas por RT-PCR o PCR en tiempo real para los siguientes virus respiratorios:

- Virus respiratorio sincicial
- Adenovirus
- Metapneumovirus

- Parainfluenza 1
- Parainfluenza 2
- Parainfluenza 3
- Rinovirus
- Bocavirus
- Coronavirus OC43
- Coronavirus NL63

Para la realización de cada RT-PCR o PCR se utilizaron los protocolos del CDC, los partidores y sondas utilizados son de propiedad del CDC y no pueden ser publicados, las sondas son de tipo taqman. Las secuencias de los partidores corresponden a regiones conservadas de cada virus en estudio.

Para la mezcla de reacción se utilizaron los estuches comerciales SuperScript® III Platinum® One-StepRT-PCR (Invitrogen) y AgPath ID (ThermoFisher). Las mezclas se distribuyeron a razón de 20 µL por pocillo y 5 µl del extracto de ácido nucleico, en cada una de las mezclas de reacción. Las reacciones de amplificación se realizaron en el equipo AppliedBiosystem real-time PCR systems modelo 7500 Fast (AppliedBioSystem) bajo las siguientes condiciones para la determinación de todos los virus: 50°C durante cinco minutos, 95°C por dos minutos, y 40 ciclos de 95°C por cinco segundos, 60°C por 30 segundos. El producto de la reacción se analizó a través del programa FastSystem SDS versión 2.0.1. La emisión de la fluorescencia se detectó al final de cada ciclo de la fase de amplificación. A cada muestra analizada del estudio se le realizó la detección de ribonucleasa P, para la validación de la calidad de la muestra mediante PCR, reacción previamente

estandarizada en el laboratorio, según protocolo CDC (CDC, 2009). Los partidores y sondas empleados en este ensayo se muestran a continuación:

Primerfor: AGATTTGGACCTGCGAGCG

Primerrev: GAGCGGCTGTCTCCACAAGT

Sonda: FAM-TTCTGACCTGAAGGCTCTGCGCG-BHQ1

Cada RT-PCR incluyó un control positivo y negativo en cada determinación, aportados por el CDC, además de los controles positivos y negativos de extracción y controles internos para cada muestra (CDC, 2009).

IV.3.1 DETECCIÓN DE EV-D68

Para la detección del EV-D68, se empleó un ensayo de RT-PCR, utilizando partidores y sondas específicas para este serotipo publicadas previamente, que amplifican una región específica de la proteína VP1 del EV-D68 (CDC, 2014). Para la preparación de la mezcla de reacción se utilizó el siguiente protocolo previamente estandarizado, con las concentraciones finales en la reacción: RT-PCR Buffer 2X, partidor *forward* (10 μ M), partidor *reverse* (10 μ M) y Sonda (5 μ M). Se utilizó el estuche comercial SuperScript® III Platinum® One-Step RT-PCR (Invitrogen).

Para la amplificación y detección se empleó el mismo equipo y programa descrito anteriormente. Los primers y sondas empleados en este ensayo se muestran a continuación:

Primerfor: 5'CAAACCTCGCACAGTGATAAAAYCARCA3'

Primerrev: 5'GTATTATTACTACTACCATTACNGCNAC3'

Sonda: 5' FAMGTCCATTTGAAAAAGTTCTTGTCBHQ1 3'

Para la interpretación de los resultados obtenidos en los ensayos de PCR se emplearon los siguientes criterios aportados por el CDC:

- Muestra negativa: No se visualiza curva de progresión de fluorescencia por sobre la línea de base durante la reacción de amplificación.
- Muestra positiva: Se visualiza curva de fluorescencia por sobre la línea de base con un valor de $Ct < 37$.

Las muestras con valores de $Ct > 37$, con curvas de fluorescencia sigmoideas se enviaron a secuenciar para la determinación de EV-D68 para corroborar positividad.

IV.4 RECOLECCIÓN, PROCESAMIENTO Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos clínicos (sintomatología, días de hospitalización y comorbilidades) y demográficos (procedencia, edad, género) se tomaron de la base de datos online: "Vigilancia Viroológica de influenza y otros virus respiratorios en Las Américas". El

acceso a esta base de datos está permitido solo a los laboratorios de referencia de vigilancia de influenza y otros virus respiratorios (Sección Virus respiratorios – ISP). Dichos datos fueron exportados a una hoja de datos en Microsoft Excel para el análisis posterior. Para determinar la posible relación de los EV-D68 según las características clínicas y demográficas de la población objeto de estudio, se aplicó la prueba Chi-Cuadrado de Pearson utilizando el programa SPSS. Se consideraron valores significativos de $p \leq 0.05$ con un Intervalo de confianza (IC) de un 95 %.

IV.5 GENOTIPIFICACIÓN Y ANÁLISIS FILOGENÉTICO

Todas las muestras positivas para EV-D68 se secuenciaron. Esta secuenciación se realizó en el equipo Abi3130 en el subdepartamento de Genética molecular del ISP. Los partidores utilizados en el secuenciamiento de EV-D68 fueron de creación propia dirigidos a la región VP1:

EVD68 VP1F GAAGCCATACAAACTCGCAC

EVD68 VP1R TGGTTTATTCCATACAGACC

Las secuencias obtenidas fueron comparadas y alineadas con el programa Clustal X. La comparación nucleotídica se realizó con la cepa de referencia US/MO/14-18950, que fue la primera cepa aislada del brote en EE.UU en el año 2014. Las relaciones filogenéticas se basaron en la secuencia de nucleótidos de la región VP1. El árbol filogenético se construyó con el modelo de máxima verosimilitud y

con valores de *bootstrap* calculados a partir de 1000 árboles utilizando el programa computacional MEGA5.

V RESULTADOS

V.1. Caracterización de muestras incluidas en el estudio

En el período comprendido entre enero del 2014 y diciembre del año 2016, como parte de la vigilancia de laboratorio de las IRAG se estudiaron un total de 1966 muestras clínicas respiratorias, tanto aspirados como hisopados nasofaríngeos, procedentes de pacientes con edades comprendidas entre 3 días y 104 años de edad con diagnóstico clínico de IRAG, influenza negativo.

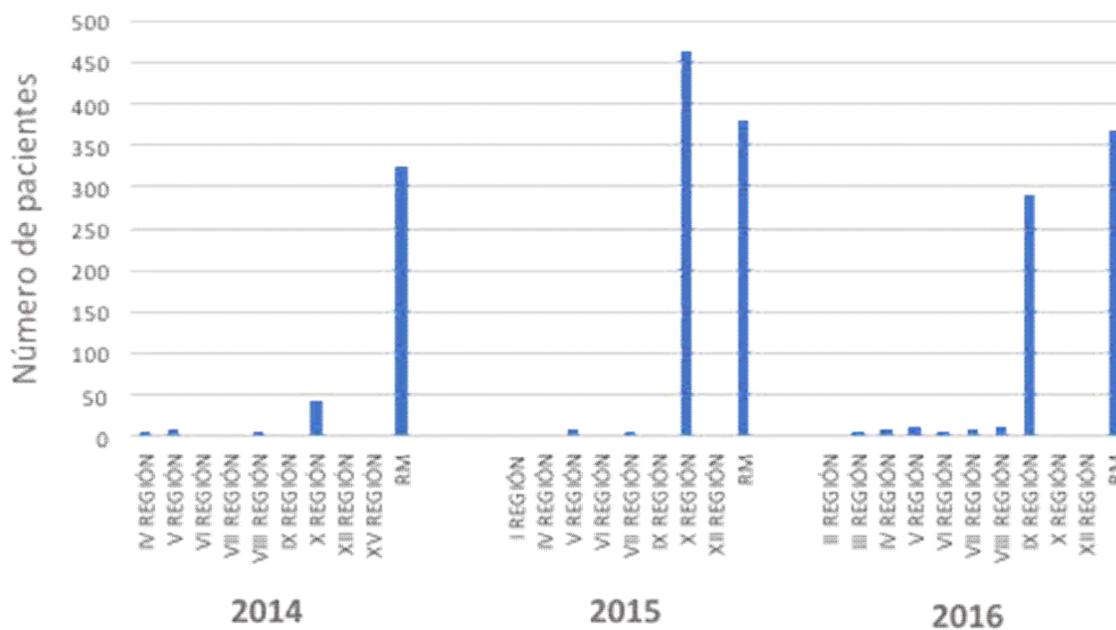
Los antecedentes demográficos de rangos de edades y género de los pacientes cuyas muestras se incorporaron al estudio se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1.-Distribución por edad, género y año de ingreso de los pacientes que se incorporaron al estudio.

AÑO	RANGO DE EDAD (n;%)	GÉNERO (n;%)
2014	<5años (62;15,8%)	M (34;54,8%)
		F (28;45,2%)
	5 – 15 años (22;5,7%)	M (15;68,2%)
		F (7;31,8%)
Subtotal n anual (% del total) 392 (19,9%)	>15 años (308;78,5%)	M (162;52,5%) F (146;47,5%)
2015	<5años (422;48,7%)	M (249;59,1%)
		F (173;40,9%)
	5 – 15 años (27;3,1%)	M (14;51,8%)
		F (13;48,2%)
Subtotal n anual (% del total) 865 (43,9%)	>15 años (416;48,2%)	M (236;57,6%) F (180;43,4%)
2016	<5años (455;64,1%)	M (217;47,6%)
		F (238;52,4%)
	5 – 15 años (24;3,3%)	M (19;79,2%)
		F (5;20,8%)
Subtotal n anual (% del total) 709 (36,2%)	>15 años (230;32,6%)	M (134;58,2%) F (96;41,8%)

Los antecedentes geográficos de los pacientes cuyas muestras se incorporaron al estudio se muestran en el Gráfico 1.

Gráfico 1.-Distribución por región de procedencia de los pacientes estudiados entre los años 2014 – 2016.



V.2. Detección de EV-D68 en las muestras incorporadas al estudio

La aplicación del ensayo de RT-PCR para el diagnóstico específico de EV-D68 a la totalidad de las muestras permitió identificar 15 muestras positivas a este

agente durante el período de estudio, representando el 0,76% entre el total de muestras. El año más significativo respecto a la circulación de EV-D68 en nuestro país fue durante el brote del 2014, ya que del total de muestras analizadas (n=392), 13 resultaron positivas representando el 3,3% de las muestras estudiadas durante ese año.

Los valores de ciclo umbral (Cts, threshold point) para estas muestras positivas se muestran en la tabla 2.

Tabla 2.- Valores de Cts en las muestras positivas para EV-D68 detectadas en el estudio

Número muestra	Cts
1	26,3
2	28,5
3	31,3
4	35,3
5	29,6
6	38,5
7	25,6
8	33,4
9	32,4
10	39,2
11	35,3
12	32,7
13	31,0
14	29,8
15	27,3

En dos de las muestras se obtuvieron valores de Cts mayores a 37, por lo que se enviaron a secuenciar para confirmar positividad a EV-D68. Cabe recordar que todas las muestras positivas a EV-D68 correspondían a muestras de aspirado nasofaríngeo, por lo cual no se puede establecer una comparación entre los Cts de muestra de aspirado versus los hisopados para casos positivos de EV-D68.

Un antecedente importante respecto a estas 13 muestras positivas a EV-D68 es que provenían de un mismo centro asistencial en la X región. De ese centro se analizaron un total de 29 muestras durante el 2014, resultando en una positividad para la X región de un 44% para EV-D68 durante el año del brote.

Del total de muestras analizadas el 87% correspondieron a muestras de aspirado nasofaríngeo, dentro de las cuales se destacan las 15 muestras positivas para EV-D68.

V.3. Co-infecciones y características clínicas de los pacientes EV-D68 positivos

En el gráfico 2 se observa la distribución de muestras negativas para cualquier infección viral respiratoria, muestras positivas para otros virus respiratorios (respiratorio sincicial, parainfluenza 1,2,3, adenovirus, metapneumovirus, rinovirus, bocavirus, coronavirus OC-43 y NL-63) y muestras positivas para EV-D68 por mes durante el estudio.

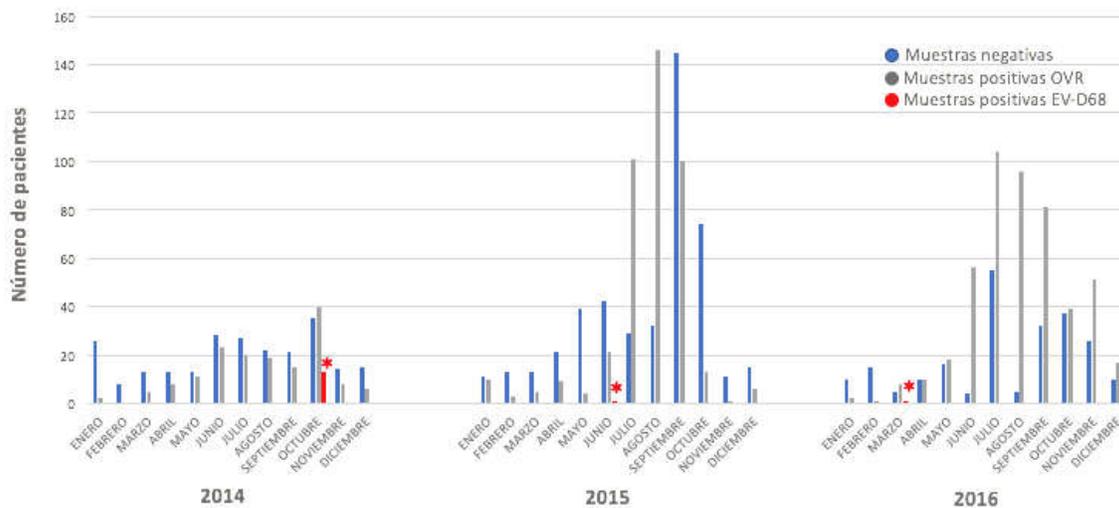


Gráfico 2: Distribución mensual de resultados de las muestras analizadas durante el estudio comprendido durante los años 2014 – 2016. Las barras azules corresponden a resultados de pacientes que presentaron una RT-PCR negativa para los agentes virales en estudio. Las barras grises corresponden a los resultados de pacientes que presentaron una RT-PCR positiva a otros virus respiratorios (OVR), distinto de EV-D68. Las barras rojas (*) corresponden a resultados positivos de pacientes con EV-D68.

El intervalo de días desde el inicio de los síntomas y la toma de muestra de los 15 pacientes positivos para EV-D68 fue de 0 – 1 día. De los 15 pacientes, 6 presentaron co-infecciones asociadas al cuadro clínico de IRAG, 1 de ellos una infección doble además de EV-D68 (+).

Las características clínicas, demográficas y epidemiológicas de los pacientes con EV-D68 positivos, se detallan en la tabla 3:

N° Paciente	Edad	Fecha obtención muestra	Género	Días hospitalización	Co-morbilidades	Región	Coinfección
1	7 años	07/10/2014	F	3 UCI	OBESIDAD IMC 30-40	Décima	-
2	2 años	09/10/2014	F	1	ASMA	Décima	VRS
3	9 años	03/10/2014	M	14 HOSP/8 UCI	ASMA	Décima	-
4	9 años	06/10/2014	M	1	S/C	Décima	-
5	3 años	07/10/2014	F	2	ASMA	Décima	HMPV/HRV
6	8 años	08/10/2014	M	2	ASMA	Décima	-
7	9 meses	27/10/2014	F	4	EPC-ERC	Décima	-
8	1 año	29/10/2014	F	6	S/C	Décima	ADV
9	7 años	24/10/2014	F	5	S/C	Décima	-
10	1 año	27/10/2014	M	4	ASMA	Décima	ADV
11	10 meses	22/10/2014	F	4	S/C	Décima	PI3
12	37 años	21/10/2014	F	5	EMBARAZO	Décima	HBoV
13	5 años	23/10/2014	F	6	S/C	Décima	-
14	56 años	15/06/2015	M	2	S/C	Décima	-
15	3 años	24/03/2016	M	-	S/A	Quinta	-

Tabla 3.- Características clínicas, demográficas y epidemiológicas de pacientes con EV-D68 (+), Enero 2014 – Diciembre 2016. UCI (Unidad de cuidados intensivos), S/C (Sin comorbilidad), S/A (Sin Antecedentes), EPC (Enfermedad pulmonar crónica), ERC (Enfermedad renal crónica), VRS (Virus Respiratorio Sincicial), HMPV (Metapneumovirus), HRV (Rinovirus), ADV (Adenovirus), PI3 (Parainfluenza 3), HBoV (Bocavirus).

La distribución geográfica (Gráfico1) del total de muestras analizadas nos muestra que durante el año 2014, el 84.4% de las muestras provenían de la Región metropolitana y sólo el 7,3% provenían de la X región, en la cual se detectaron los 13 casos de EV-D68.

V.4 Análisis filogenético:

Todas las muestras positivas para EV-D68 se secuenciaron considerando 742 nucleótidos del gen VP1.

El análisis filogenético de las 14 muestras positivas obtenidas en los años 2014 y 2015, confirmó que pertenecían al clado B, subclado B1, en comparación con las secuencias de referencia del primer aislado del brote en EE.UU. Por otro lado, el aislado positivo detectado durante el 2016 pertenecía al subclado B3, el cual circuló mundialmente durante ese año. En la figura 3 se muestran las relaciones filogenéticas de los aislados que se obtuvo en este estudio y los aislados a nivel mundial con sus respectivos clados.

En el análisis de las secuencias de las 15 muestras, se detectó que dos del año 2014 presentaron mutaciones en la proteína VP1. Estas muestras correspondían a dos pacientes que estuvieron hospitalizados en UCI. Las mutaciones detectadas fueron N408S y R210K. Según lo reportado en la literatura (*Brown, 2014*) mutaciones en la proteína VP1, podrían ser causante de cuadros respiratorios más graves, que aquellas que conservan la VP1 sin mutaciones.

Figura 3.- Árbol filogenético construido basado en el modelo de máxima verosimilitud, con valores de *bootstrap* calculados a partir de 1000 árboles.

- Muestras analizadas en este estudio de pacientes EV-D68 (+). Las cepas con las cuales se construyó el árbol pertenecen a las cepas tipo aisladas para los diferentes clados.

Para la construcción del subclado B1, se tomaron como referencia sólo cepas americanas provenientes de México, EE.UU, Haití, Canadá. Para la construcción del subclado B3, se tomaron como referencia sólo cepas provenientes de aislados en EE.UU durante el 2016. Para el subclado B2 se tomó como referencia la cepa aislada en EE.UU durante el 2014, así mismo con los clados D y A. Para el clado C, se tomó como referencia la cepa aislada en EE.UU durante el año 2009. La cepa Fermon corresponde a la primera cepa aislada de EV-D68 en el año 1962.

VI DISCUSIÓN

Las IRAG son la causa principal del uso de los servicios de salud a nivel mundial, particularmente en los lactantes y en los niños menores de 5 años de edad en los países en vías de desarrollo. Anualmente se le atribuyen 3,5 millones de muertes a nivel mundial (OMS, 2004). Aunque son varios los agentes etiológicos involucrados, los virus son diagnosticados con mayor frecuencia en este tipo de infección (*Brunstein, 2008*). Entre ellos, uno de los agentes virales más comunes son los enterovirus, Los enterovirus no polio son responsables de un gran número de enfermedades muy frecuentes en los niños y en los recién nacidos, con una gran variabilidad de cuadros clínicos dentro de las que se encuentran las infecciones agudas del tracto respiratorio: resfriado común, faringitis, bronquiolitis, neumonía, entre otras. En la literatura se publican porcentajes variables sobre la frecuencia de los Enterovirus en la etiología de las IRA que oscilan entre 1-36% (*Meijer, 2014, Bragstad, 2015*). Aunque en todos los estudios se utilizan diferentes ensayos de RT-PCR para el diagnóstico y algunos confirman mediante secuenciación nucleotídica, el diseño de los mismos difiere en cuanto al período y a los grupos de edades, por lo que se hace difícil establecer comparaciones.

La identificación esporádica de los Enterovirus asociados a las IRA en el mundo, se debe a que las muestras respiratorias no son examinadas rutinariamente para estos virus y varios ensayos de diagnóstico molecular específicos para rinovirus, muestran reactividad para la identificación de enterovirus.

Además el hecho que los sistemas de vigilancia para Enterovirus están focalizados en el estudio de las muestras de heces y líquido cefalorraquídeo, ya

que son los causantes de la poliomielitis, la cual se vigila a nivel mundial. En este tipo de muestras no es posible detectar la mayoría de los patógenos respiratorios, por lo cual se subestima su participación en cuadros de IRAG.

Estos aspectos pudieran estar contribuyendo a una subestimación del papel patogénico de EV-D68 en la etiología de diferentes tipos de IRA, ya que sólo después del brote del 2014 se comenzó a pesquisar a nivel mundial por los cuadros graves que causaba en los pacientes. En nuestro estudio detectamos una frecuencia de 0.76% de casos totales positivos de EV-D68 asociados a IRAG. Siendo relevante lo que se presentó durante el 2014, con una frecuencia de 3.76% reportada ese año, durante el brote mundial.

Históricamente, EV-D68 se ha detectado de forma esporádica, por lo que anteriormente se le dio menos prioridad en la vigilancia de rutina por agencias nacionales e internacionales de salud pública. El estudio de diferentes brotes del EV-D68, entre 1962 y 2014, demostró la infrecuente aparición y propagación del virus y la presencia de clados y subclados, con el reporte de los tres clados de EV-D68 en China, Italia, Japón, Holanda y los Estados Unidos.

En Chile, existe sólo un dato publicado sobre la circulación de EV-D68 (*Torres, 2015*) en 2 pacientes pediátricos, de 7 y 9 años, en Santiago, ambos con antecedentes de asma, quienes cursaron con una infección respiratoria aguda por EV-D68 por la que permanecieron hospitalizados, en promedio, 7 días con requerimientos de oxígeno. En ninguno se detectó co-infección con otro agente viral. A nivel de laboratorio local, la PCR fue positiva para enterovirus/rinovirus, puesto que la técnica de PCR multiplex utilizada no diferencia entre estos dos virus. Las muestras positivas fueron enviadas al CDC donde se confirmó EV-D68 y

se realizó su secuenciamiento. El análisis filogenético de la proteína VP1 de ambas cepas reveló que ambos virus correspondían al clado B, a la cepa principal del brote en EE.UU el 2014.

En nuestro estudio, detectamos 15 muestras EV-D68 positivas de las cuales las detectadas durante el período 2014 y 2015 pertenecían al subclado B1, el cual estaba circulando en el mundo en ese período. Los laboratorios de EE.UU bajo el Sistema Nacional de Vigilancia de Enterovirus no reportaron ningún caso de EV-D68 durante el año 2015 asociado a cuadro respiratorio grave.

La muestra positiva detectada durante el 2016 en nuestro estudio, pertenecía al subclado B3. Durante ese año, solo 4 países detectaron EV-D68: EE.UU (sólo en Nueva York), Dinamarca, Suecia y Holanda.

Independiente del tipo de clado que esté circulando a nivel mundial, son pocos los casos reportados de EV-D68 en adultos inmunocompetentes o sin ninguna co-morbilidad asociada, ya que según estudios de anticuerpos neutralizantes realizados en Finlandia en personas adultas, cerca del 90% presentaron anticuerpos contra EV-D68. En nuestra experiencia, detectamos dos adultos. Uno de ellos era de 56 años, género masculino sin ninguna co-morbilidad asociada y sin co-infección con otro agente viral cursando con una IRAG asociada a EV-D68, específicamente correspondiente al subclado B1. El otro caso fue una mujer de 37 años con antecedente de embarazo, en la cual detectamos una co-infección con Bocavirus. Ambos permanecieron hospitalizados un promedio de 3 días.

Como se describe en la literatura la mayoría de las infecciones por EV-D68 se presenta en niños, al igual que en nuestro estudio donde el mayor porcentaje de los pacientes EV-D68 (+) fueron pediátricos (87%). La mayor susceptibilidad a la infección de la población pediátrica se debería posiblemente a que los niños no tendrían la inmunidad que poseen los adultos frente a este agente y estarían más propensos a desarrollar cuadros graves de IRAG. Hubo dos niños menores de 1 año, estos dos últimos casos estuvieron un promedio de 4 días hospitalizados. Uno de ellos no tenía antecedentes de co-morbilidades asociadas y presentó una co-infección con parainfluenza 3. El segundo caso corresponde a una niña de 9 meses con antecedentes de enfermedad renal crónica y enfermedad pulmonar crónica, en la que no se detectó co-infección, solo EV-D68.

La literatura reporta que pacientes con enfermedades respiratorias de base, ya sea asma, enfermedad obstructiva crónica o inmunosupresión, tendrían una elevada susceptibilidad a la infección por EV-D68 y a desarrollar una sintomatología más prolongada que aquellos que no poseen tales co-morbilidades. En nuestro estudio del total de casos positivos de EV-D68, el 33 % de los pacientes tenía como antecedentes asma, de los cuales 3 casos presentaron co-infección con otro agente viral (virus respiratorio sincicial y adenovirus) y un caso presentó una doble infección además de EV-D68 con metapneumovirus y rinovirus. A pesar de lo descrito en la literatura, en nuestra experiencia estos pacientes con co-morbilidades asociadas estuvieron el mismo promedio de días hospitalizados que aquellos que no las presentaban y no cursaron con un cuadro más grave que los demás.

Además de la presencia de co-morbilidades en los pacientes que podrían generar cuadros más graves de infecciones respiratorias, existen otros factores asociados a características propias del virión, que contribuirían a generar cuadros clínicos más grave, como las mutaciones en la proteína VP1. Se sabe que mutaciones en el bolsillo hidrofóbico, específicamente en los *loops* BC y DE, generarían cuadros respiratorios más graves. Esto se podría asociar a la capacidad que tiene VP1 de unirse al ligando celular al momento de la infección celular, y una VP1 con mutaciones podría tener mayor afinidad por los receptores celulares.

En concordancia con esto, dos de los casos detectados en nuestro estudio presentaron mutaciones en VP1 (N408S y R210K), los cuales fueron los únicos pacientes que tuvieron que ser internados en UCI: uno de 7 años de género femenino con obesidad (IMC 30-40) como co-morbilidad y detección de co-infección por otro agente. El otro caso fue un niño de 9 años con antecedentes de asma, el cual permaneció 14 días hospitalizado, más 8 días en UCI sin presentar co-infección por otro agente. Si bien ambos pacientes presentaban comorbilidades que pueden influir en la evolución de la enfermedad, es llamativo que sólo en estos dos casos los virus detectados tenían mutaciones en VP1, lo que debiera ser estudiado con mayor profundidad para la asociación de EV-D68 con las IRAG en estos casos.

En nuestro estudio no podemos discriminar en que parte específica de la estructura proteica de VP1 se encuentran las mutaciones detectadas. Sin embargo, en la literatura (*Eshaghi, 2017*) está reportado que el gen de VP1

presenta alrededor de 1500 bases y codifica una proteína de 500 aminoácidos, dentro de los cuales el bolsillo hidrofóbico se ubicaría en la posición 250 a 430 bases. Este antecedente sugiere que las mutaciones detectadas, N408S y R210K podrían alterar esta región de VP1 y, por ende, las interacciones de esta proteína con ligandos celulares.

Después del brote del 2014, solo se han encontrado casos aislados de EV-D68 asociados a IRAG. Entre los años 2015 y 2016, la circulación y notificación de EV-D68 fue baja a nivel mundial, reportándose pequeños brotes. Estos antecedentes a nivel mundial se condicen con la realidad en Chile, ya que detectamos 2 casos durante esos dos años de baja circulación de EV-D68 en el mundo.

Puesto que los niños tienen una mayor tasa replicativa de EV-D68 que los adultos (*Rahamat, 2011*), esperábamos menores Cts en los pacientes pediátricos, pero nuestros resultados muestran que los Cts no fueron significativamente distintos entre los pacientes pediátricos y los adultos. Esto puede deberse a la falta de muestras de pacientes adultos para sustentar dichos Cts, ya que sólo se detectaron dos casos positivos en este grupo.

De acuerdo al análisis del tipo de muestra del total de muestras positivas a EV-D68, todas corresponden a aspirados nasofaríngeos, lo cual es esperable, ya que en la literatura se establece como el mejor tipo de muestra respiratoria, sobre todo en pacientes pediátricos.

Analizando la estacionalidad de las IRAG por EV-D68, se reportó que en el brote del 2014 en EE.UU, los meses de positividad fueron octubre a diciembre y durante el 2016 entre julio y octubre, correspondiendo ambos brotes a las estaciones de verano – otoño. En nuestro estudio detectamos EV-D68 en octubre del año 2014, en junio del año 2015 y en marzo del 2016, por lo que al igual que para algunos virus respiratorios hay circulación esporádica durante el año. Por lo cual se requiere mayor información y un mayor número de años de estudio para determinar la estacionalidad del virus en nuestro país.

Además de los cuadros de IRA grave asociados a EV-D68, la detección de 120 casos de parálisis flácida aguda asociada a este virus en EE.UU durante el brote mundial del 2014, puso en alerta a nivel mundial la vigilancia de EV-D68 como posible causante de cuadros neurológicos tipo poliomielitis. Con estos antecedentes se intensificó la vigilancia en los países que presentaron brotes de IRAG asociados a EV-D68, Hasta la fecha, se han reportado casos de parálisis flácida en Francia, Holanda, Canadá, Japón, Italia, España, Alemania, Suecia, Irlanda, Noruega y Argentina. Adicionalmente, se han informado casos de Mielitis flácida aguda (MFA) en Argentina (*Ruggieri, 2017*), por lo que la Organización Panamericana de la Salud (OPS), emitió una alerta epidemiológica en el pasado mes de noviembre, describiendo los pasos a seguir ante la sospecha de Mielitis flácida aguda asociada a EV-D68. Esto incluye la obtención de una muestra respiratoria y la realización de una resonancia magnética nuclear de columna vertebral en casos de firme presunción de mielitis flácida aguda.

En nuestro estudio no se han registrado síntomas de enfermedad neurológica o parálisis para estos pacientes, y no se ha establecido hasta la fecha ningún vínculo causal entre la infección por EV-D68 y la enfermedad neurológica en nuestro país. Esto se explicaría porque se analizaron registros puntuales de los pacientes, sin seguimiento, en el tiempo, lo que no permite visualizar las alteraciones neurológicas que pudiesen presentar los pacientes meses después del cuadro respiratorio. Por esto se requiere ampliar la vigilancia de EV-D68 a las muestras de parálisis flácida, solicitando una muestra respiratoria junto con la muestra de deposiciones que se indica en esta vigilancia, para evaluar el posible nexo de este virus con cuadros neurológicos en nuestro país.

En definitiva, los resultados de este estudio, al igual que lo publicado previamente por Torres durante el 2015, confirman la circulación de EV-D68 en nuestro país y avalan la necesidad de su búsqueda diferenciada.

VII CONCLUSIONES

- Enterovirus D-68 circula en casos de cuadros respiratorios agudos graves en nuestro país.
- EV-D68 se detecta tanto en niños como en adultos con IRAG.
- La baja detección de EV-D68 detectada en este estudio (0.76%) no justifica una vigilancia activa de este virus respiratorio.
- La co-infección de EV-D68 con otros virus respiratorios es frecuente en pacientes con IRAG (40%)
- EV-D68 detectados en pacientes con IRAG en Chile pertenecen al clado B, en concordancia con lo que circula a nivel mundial desde 2014.
- La detección temporal y regional de EV-D68 sugiere que en Chile se presentan casos esporádicos y en brote por este virus.

VIII BIBLIOGRAFÍA

- Ayscue P, Van Haren K, Sheriff H, Waubant E, Waldron P (2014) Acute flaccid paralysis with anterior myelitis - California, June 2012-June 2014. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 63:903-906.
- Badry M, Lednicky J, Cella E, Telisma T, Chavannes S (2016) Isolation of an enterovirus D68 from blood from a child with pneumonia in rural Haiti: close phylogenetic linkage with New York strain. *Pediatr Infect Dis J* 154:45- 48.
- Bertino J (2002) Cost burden of viral respiratory infections: issues for formulary decision makers. *Am J Med* 112:42-49.
- Blomqvist S, Savolainen C, Raman L, Roivanen M, Hovi T (2002) Human rhinovirus 87 and enterovirus 68 represent a unique serotype with rhinovirus and enterovirus features. *J Clin Microbiol* 40:4218-4223.
- Bragstad K, Jakobsen K, Rojahn A, Skram E (2015) High frequency of enterovirus D68 in children hospitalised with respiratory illness in Norway, autumn 2014. *Influenza Other Respir Viruses* 9:59-63.

- Brown A, Nix A, Sheth M, Frace M, Oberste S (2014) Seven strains of enterovirus D68 detected in the United States during the 2014 severe respiratory disease outbreak. *Genome Announc* 2:1201- 1214.
- Brunstein J, Cline C, Mckinney S, Thomas E (2008) Evidence from multiplex molecular assays for complex multipathogen interactions in acute respiratory infections. *J Clin Microbiol* 46:97-102.
- Carney D, Brown M , Siqueira J , Dias E (2015) Enterovirus D68 detected in children with severe acute respiratory illness in Brazil. *Emerg Microbes Infect* 4:66.
- Centers for Disease Control and Prevention (2014) Enterovirus D68. Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, GA.
- Centers for Disease Control and Prevention (2011) Clusters of Acute Respiratory Illness Associated with Human Enterovirus 68 — Asia, Europe, and United States, 2008–2010. *MMWR* 60.
- Drosten C, Gunther S, Preiser W, Van der Werf S (2003) Identification of a novel coronavirus in patients with severe acute respiratory syndrome. *N Engl J Med* 348:1967-1976.

- Engelmann I, Fatoux M, Lazrek M, Mirand A, Henquell C (2017) Enterovirus D68 detection in respiratory specimens: Association with severe disease. *J Med Virol* 89:1201-1207.
- Eshaghi A, Venkata R, Duvvuri S, Philip B (2017) Global Distribution and Evolutionary History of Enterovirus D68, with Emphasis on the 2014 Outbreak in Ontario, Canada. *Front Microbiol* 8: 257.
- Esposito S, Ruggiero L, Madini B, Niesters H, Principi N (2015) Enterovirus D68–associated community-acquired pneumonia in children living in Milan, Italy. *J Clin Virol* 68:94–96.
- Greninger A, Naccache S, Messacar K (2015) A novel outbreak enterovirus D68 strain associated with acute flaccid myelitis cases in the USA (2012–14): a retrospective cohort study. *Lancet Infect Dis* 15:671–682.
- Harvala H, Kalimo H, Dahllund L, Santii J, Hughes P (2002) Mapping of tissue tropism determinants in coxsackie virus genomes. *J Gen Virol* 83:1697- 1706.
- Holm-Hansen C, Midgley E, Fischer T (2016) Global emergence of enterovirus D68: a systematic review. *Lancet Infect Dis* 456-489.

- Imamura T, Fuji N, Suzuki A, Tamaki R, Saito M, Aniceto R, Galang H, Sombrero L, Lupisan S, Oshitane H (2014) Enterovirus 68 among children with severe acute respiratory infection, the Philippines. *Emerg Infect Dis* 17:1430-1435.
- Karnauchow T, Tolson D, Harrison B, Altman E, Lublin D, Dimock K (1996) The HeLa cell receptor for enterovirus 70 is decay-accelerating factor (CD55). *J Virol* 70:5143–5152.
- Levy J, Roberts J, Lang N (2015) Enterovirus D68 disease and molecular epidemiology in Australia. *J Clin Virol* 69:117–112.
- Liu Y, Sheng J, Fokine A, Meng G, Shin W (2015) Structure and inhibition of EV-D68, a virus that causes respiratory illness in children. *Science* 347:71–74.
- Meijer A, Benschop, S, Donker A, Vander Avoort H (2014) Continued seasonal circulation of enterovirus D68 in the Netherlands, 2011-2014. *Euro Surveill* 19.
- Midgley C, Jackson M, Selvagaran R, Turabelidze E (2014) Severe respiratory illness associated with enterovirus D68 - Missouri and Illinois, 2014. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 63:798-799.

- 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* 82:409-416.
- Oberste M, Maher K, Schnurr D, Flemister M, Lovchik J (2004) Enterovirus 68 is associated with respiratory illness and shares biological features with both the enteroviruses and the rhinoviruses. *J Gen Virol* 85: 2577-2584.
- Rahamat J, Riezebos A, Borger R, Van der Heide R, Brandenburg A, Schölvinck E, Niesters HG (2011) Upsurge of human enterovirus 68 infections in patients with severe respiratory tract infections. *J Clin Virol* 52:103-106.
- Robinson L, Suresh S, Lee E (2014) That other EVD: Enterovirus-D68 - what's it all about?. *J Infect Dis Med Microbiol* 25:296-298.
- Ruggieri M, Peretti M, Rugilo C, Bologna R, Freire C, Vergel S, Savransky A (2017) Enterovirus D68 infection in a cluster of children with acute flaccid myelitis, Buenos Aires, Argentina, 2016. *Eur J Paediatr Neurol* 21:884-890.
- Schieble J, Fox V, Lennette E (1967) A probable new human picornavirus associated with respiratory diseases. *American Journal of Epidemiology* 85:297-310.

- Smura T, Ylipaasto P, Klemola P (2010) Cellular tropism of human enterovirus D species serotypes EV-94, EV-70, and EV-68 in vitro: implications for pathogenesis. *J Med Virol* 82:1940–1949.
- Torres J, Farfan M, Izquierdo G, Piemonte P, Henriquez J, O’Ryan M (2015) Enterovirus D68 infection, Chile, spring 2014. *Emerg Infect Dis* 21:728- 729.
- Tracy S, Chapman M, Drescher M, Kono K, Tappich W (2006) Evolution of virulence in picornaviruses. *Curr Top Microbiol Immunol* 299:193-209.
- Van der Hoek L, Pyrc K, Jebbink M, Vermeulen-oost W, Berkhout J, Wolthers K (2004) Identification of a new human coronavirus. *Nat Med* 10:368-373.
- Van der Linden L, Wolthers C, van Kuppeveld F (2015) Replication and Inhibitors of Enteroviruses and Parechoviruses. *Viruses* 7:4529-4562.
- Vazquez J, Ramirez E, Moreno Y, Hernandez V, Romero J, Castillejos M (2016) EV-D68 infection in children with asthma exacerbation and pneumonia in Mexico City during 2014 autumn. *Influenza and Other Respiratory Viruses* 10: 154–160.
- Wei W, Guo H, Chang J, Yu Y, Liu G, Zhang N, Willard SH, Zheng S (2016) ICAM-5/Telencephalin Is a Functional Entry Receptor for Enterovirus D68. *Cell Host Microbe* 9:631-641

- Woo P, Lau K, Chu M, Chan H, Tsoi W, Huangh Y, Wong H (2005) Characterization and complete genome sequence of a novel coronavirus, coronavirus HKU1, from patients with pneumonia. J Virol 79:884-895.

- Williams C, Thomas R, Pickersgill T, Lyons M, Lowe G, Stiff R (2016) Cluster of atypical adult Guillain-Barré syndrome temporally associated with neurological illness due to EV-D68 in children, South Wales, United Kingdom, October 2015 to January 2016. Euro Surveill 21.