

# Detección y Alerta de Enterovirus Emergentes y Reemergentes

## Autoría principal

**Magilé C. Fonseca Quintana<sup>1</sup>.**

## Otros autores

**Luis Sarmiento Pérez<sup>2</sup>, Sonia Resik Aguirre<sup>1</sup>, Yenisleydis Martínez Montesino<sup>1</sup>, Lai Heng Hung<sup>1</sup>, Odalys Valdez<sup>1</sup>, Alexander Piñón Ramos<sup>1</sup>, Mayra Muné<sup>1</sup>, Guelsy Gonzalez<sup>1</sup>, Vivian Kourí<sup>1</sup>, Luis Morier Díaz<sup>1</sup>, Dianeya Mendoza Llanes<sup>1</sup>, Hermis Rodríguez<sup>1</sup>.**

## Colaboradores

Helene Norder, Carlos Schrago, Beatriz Mello.

## Entidades ejecutoras principales

<sup>1</sup>Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kourí”.

## Entidades participantes

<sup>2</sup>Cellular Autoimmunity Unit, Department of Clinical Sciences, Skåne University Hospital, Lund University, Malmö, Sweden.

## Autor para correspondencia

Lic. Magilé C Fonseca Quintana.

Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kourí”.

Autopista Novia del Mediodía Km 6½ entre Carretera Central y Autopista Nacional Apdo. postal 601 Marianao 13.

Fax: 53 -7 2553550

Correo electrónico: magile@ipk.sld.cu y magilefonseca@infomed.sld.cu

## Aporte científico de cada autor al resultado

- ✓ Lic. **Magilé C Fonseca Quintana** (20%): Realización del diagnóstico rápido y clásico, secuenciación y análisis filogenético de los aislamientos virales. Coordinación, supervisión e interpretación de todos los resultados. Responsable de revisión de documentos para publicaciones, tesis y eventos.
- ✓ Dr. **Luis Sarmiento Pérez** (15%): Participación en la realización de las pruebas de laboratorio, análisis de los resultados, escritura y revisión de documentos para publicaciones, tesis y eventos. Su participación en los estudios la realizó formando parte del colectivo del Instituto de Medicina Tropical Pedro Kourí con excepción de escritura del capítulo de revisión: Hemorrhagic conjunctivitis: Epidemiological, clinical and virological findings from 45 years of study.
- ✓ Dra. **Sonia Resik** (9%): Participación en la realización de las pruebas de laboratorio, análisis de los resultados revisión de documentos para publicaciones.
- ✓ Lic. **Yenisleydis Martínez Montesino** (9%): Participación en la realización de las pruebas de laboratorio, análisis de los resultados revisión de documentos para publicaciones.
- ✓ Lic. **Lai Heng Hung** (9%): Participación en la realización de las pruebas de laboratorio, revisión de documentos para publicaciones.
- ✓ Dra. **Odalys Valdez** (9%): Participación en la realización de las pruebas de laboratorio, análisis de los resultados revisión de documentos para publicaciones.

- ✓ Dr. Alexander Piñón Ramos (9%): Participación en la realización de las pruebas de laboratorio, análisis de los resultados revisión de documentos para publicaciones.
- ✓ Dra. **Mayra Muné** (9%): Participación en la realización de las pruebas de laboratorio, análisis de los resultados
- ✓ revisión de documentos para publicaciones.
- ✓ Dra. **Vivian Kourí** (2%): Participó en la realización de las pruebas de laboratorio.
- ✓ Tec. **Guelsy Gonzalez** (3%): Participación en la realización de las pruebas de laboratorio.
- ✓ **Luis Morier Díaz** (2%): Aseguramiento técnico para cumplimentar tareas de cultivos celulares de laboratorio.
- ✓ Lic. **Dianeya Mendoza Llanes** (2%): Aseguramiento técnico para cumplimentar tareas de cultivos celulares de laboratorio.
- ✓ Lic. **Hermis Rodríguez** (2%): Aseguramiento técnico para cumplimentar tareas de cultivos celulares de laboratorio.

## Resumen

Con vistas a determinar la emergencia o reemergencia de los enterovirus causantes de diferentes eventos epidemiológicos tales como la epidemia de Conjuntivitis Hemorrágica Aguda, ocurrida entre el 2008 y el 2009 y los sucesivos brotes del síndrome Manos, Pies y Boca, acontecidos a partir del año 2011 nos propusimos el siguiente trabajo.

Las investigaciones determinaron la reemergencia de la variante del Coxsackievirus A24(CVA24v) como el agente etiológico de la epidemia de Conjuntivitis Hemorrágica Aguda ocurrida en los años 2008-2009, así como su posible introducción desde el Sudeste Asiático. Por otro lado, teniendo en cuenta la disponibilidad de numerosos aislamientos cubanos representativos de los cuatro períodos epidémicos previos causados por este mismo serotipo, nos propusimos realizar el análisis filogenético de los mismos, así como determinar la utilidad de las heces en el diagnóstico de la enfermedad. De este modo, se confirmó la etiología y se determinó el origen de dichos eventos epidemiológicos donde, con excepción del año 1986, se sugiere que el virus fue introducido desde el Sudeste Asiático posiblemente vía sur América. Se obtuvieron además, evidencias científicas sobre la utilidad de las heces para el diagnóstico de la Conjuntivitis Hemorrágica Aguda, corroborándose la importancia de la vía fecal oral en la transmisión de la enfermedad.

Del análisis de los brotes del síndrome Manos, Pies y Boca se identificó al Coxsackievirus A6 (CVA6) genotipo epidémico y al Enterovirus 71 (EV71) genotipo C2 como los agentes etiológicos. Por otro lado, se detectó además al EV71 como agente etiológico de infecciones graves del SNC, así como se asoció a la Infección Respiratoria Aguda como otra forma clínica de presentación de la infección por el CVA6 genotipo epidémico.

Por primera vez en Cuba y en la región de Las Américas se realiza el análisis filogenético de todos los períodos epidémicos de conjuntivitis hemorrágica aguda producidos por el CVA24v, permitiendo conocer el origen de las cepas causantes de

Conjuntivitis Hemorrágica Aguda en Cuba, constituyendo una aval científico para el desarrollo de estrategias oportunas al Sistema de Control Sanitario Internacional. El estudio constituye el primer reporte en Cuba y segundo en la región de Las Américas, de la circulación de la variante genotípica epidémica emergente del CVA6 así como identifica la emergencia del EV71 en nuestro país como agente etiológico del síndrome Manos, Pies y Boca y su implicación en formas clínicas graves, avalando la urgencia de incorporar a la vigilancia nacional este síndrome. La emergencia en nuestro país del CVA6 y el EV71 y la remergencia del CVA24v, es de interés global, pues constituye una alerta a la Comunidad Científica Internacional sobre la posibilidad de epidemias producidas por estos agentes en la región.

### **Comunicación corta**

#### **Antecedentes y Objetivos del trabajo.**

A pesar de la amplia distribución mundial que presentan los Enterovirus, algunos serotipos han emergido causando importantes epidemias o pandemias convirtiéndose en un problema de salud mundial. En muchos países del sudeste asiático se han considerado como catástrofes nacionales, tanto por el elevado índice de morbilidad que generan, la gran cantidad de vidas que cuestan en edades infantiles y el costo que éstos representan desde el punto de vista económico para el país. Las Conjuntivitis Hemorrágicas Agudas y el síndrome Manos, Pies y Boca, y sus formas graves que incluyen infecciones del SNC, figuran entre estas enfermedades.

Enterovirus 70 (EV70) y una variante antigénica del coxsackievirus A24 (CVA24v) emergen como los agentes etiológicos de grandes epidemias de Conjuntivitis Hemorrágica Aguda a principios de la década del 70. Sucesivos períodos pandémicos de esta enfermedad han tenido lugar hasta la primera década de 2000, prevaleciendo la circulación del CVA24v sobre el EV70 cuyos últimos informes datan de la década de los 90.

Por otro lado, coxsackievirus A16(CVA16) y enterovirus 71(EV71) históricamente constituyeron los principales agentes epidémicos causales del síndrome Manos, Pies y Boca.

Importantes epidemias se han descrito desde el Sudeste Asiático a partir de los 90 con un alto número de casos fatales de infantes asociados fundamentalmente al EV71, debido a la ocurrencia de complicaciones como: Encefalitis, Meningitis Aséptica, Parálisis Fláccida Aguda, Hemorragia/Edema Pulmonar o Miocarditis. A partir del 2008, coxsackievirus A6 (CVA6) emerge como otro importante agente causal de epidemias de este síndrome, y se destaca por una presentación atípica de la enfermedad que incluyen la severidad y distribución de las lesiones, rango de edades y su asociación con el desarrollo de Onycomatosis.

En Cuba, siete importantes períodos epidémicos de Conjuntivitis Hemorrágica Aguda han acontecido a partir de 1981, dos ocasionados por EV71 (1981-1984; 1989-1990) y cinco por CVA24v (1986-1987; 1992-1993, 1997, 2003-2005, 2008-2009). En cambio, del síndrome Manos, Pies y Boca solo se han informado hasta el 2010, brotes aislados y muy pequeños, producidos por CVA16 en Cienfuegos (2002, 2009, 2010). Sin

embargo, a partir del año 2011 y hasta la fecha, notable ha sido el aumento del número de casos y provincias a lo largo de la isla que reportan este síndrome. Es de señalar que esta enfermedad en el país no está sujeta a vigilancia epidemiológica, por lo que no se conoce con certeza la magnitud de la transmisión ni la incidencia real.

El presente trabajo estuvo dirigido a i) realizar el diagnóstico temprano y oportuno de la última epidemia de Conjuntivitis Hemorrágica Aguda ocurrida entre los años 2008 y 2009, ii) analizar filogenéticamente los cuatro periodos epidémicos previos causados por CVA24v, iii) determinar la utilidad de las heces en el diagnóstico de la enfermedad, así como iii) identificar la etiología de los casos o brotes de Manos, Pies y Boca que han tenido lugar en el país a partir del año 2011 hasta la actualidad.

### **Resultados**

Las investigaciones identificaron al CVA24v como el agente etiológico del último período epidémico de Conjuntivitis Hemorrágica Aguda ocurrido entre los años 2008-2009, así como su posible introducción desde el Sudeste Asiático. Por otro lado, se confirmó la etiología y se determinó el origen de los cuatro periodos epidémicos de Conjuntivitis Hemorrágica Aguda ocurridos en nuestro país entre los años 1986 y 2005 causados por CVA24v, donde con excepción del año 1986, los análisis sugieren que el virus fue introducido desde el Sudeste Asiático posiblemente vía Sur América. Se determinó, que las epidemias de Conjuntivitis Hemorrágica Aguda cubanas, al igual que en el resto del mundo, son originadas por el mismo genotipo durante un periodo bianual generalmente. Este trabajo permitió portar evidencias científicas sobre la utilidad de las heces para el diagnóstico de la Conjuntivitis Hemorrágica Aguda, corroborándose la importancia de la vía fecal oral en la transmisión de la enfermedad, aspecto a tomarse en cuenta para la implementación de acciones oportunas de prevención y control. Al mismo tiempo se introdujo, un nuevo algoritmo de diagnóstico para la Conjuntivitis Hemorrágica Aguda que emplea herramientas moleculares específicas, reduciendo el tiempo de identificación del agente etiológico de 3 semanas a 48 horas.

Del análisis de los brotes del Síndrome Manos, Pies y Boca ocurridos a partir del año 2011, se detectó en Cuba la emergencia del CVA6 genotipo epidémico y del EV71 como los agentes etiológicos. El análisis filogenético de dichos aislamientos permitió determinar que las secuencias nucleotídicas del EV71 se agruparon filogenéticamente con cepas del genotipo C2 causante de epidemias de Manos, Pies y Boca con un número significativo de casos severos en el Sudeste Asiático y Europa. Por otro lado, las secuencias nucleotídicas del CVA6 presentaron similitud con aislamientos obtenidos en el Sudeste Asiático y Europa correspondientes al genotipo epidémico emergente en el año 2008. Se identificó además, al CVA6 emergente en asociación con las formas graves o atípicas descritas recientemente y con la Infección Respiratoria Aguda, así como al EV71 como agente etiológico de infecciones graves del SNC.

### **Impactos Científicos y Sociales.**

- ✓ Por primera vez en Cuba y en la región de Las América, se realiza el análisis filogenético de todos los períodos epidémicos de Conjuntivitis Hemorrágica Aguda producidos por CVA24v permitiendo conocer el posible origen de las cepas en cada etapa, sirviendo de aval

científico para el desarrollo de estrategias oportunas al Sistema de Control Sanitario Internacional.

- ✓ Aporte a la comunidad científica mundial de 322 secuencias (149 regiones VP1, 173 regiones 3C) de aislamientos cubanos del CA24v obtenidos en todos los periodos epidémicos ocurridos en la región de las Américas.
- ✓ El estudio constituye el primer reporte en Cuba y segundo en la región de Las Américas, de la circulación de la variante genotípica epidémica emergente del CVA6.
- ✓ La descripción de la Infección Respiratoria Aguda por CVA6 como forma clínica de infección permitió actualizar el algoritmo de diagnóstico de las IRA en nuestro país.
- ✓ Se identifica la emergencia del EV71 en Cuba como agente etiológico del síndrome Manos, Pies y Boca así como su implicación en formas clínicas graves, avalando la urgencia de incorporar a la vigilancia nacional, clínico-epidemiológica todos los cuadros clínicos capaces de causar este serotipo.
- ✓ Los resultados obtenidos permitieron alertar al Sistema de Salud Nacional acerca de la emergencia y reemergencia de enterovirus potencialmente epidémicos causantes del síndrome Manos, Pies y Boca, de sus formas severas y de la Conjuntivitis Hemorrágica Aguda respectivamente.
- ✓ La emergencia en nuestro país del CVA6 y EV71 y la reemergencia del CVA24v, es de interés global, pues constituye una alerta a la Comunidad Científica Internacional sobre la posibilidad de epidemias producidas por estos agentes en la región.
- ✓ Permitieron la incorporación nuevas metodologías, algoritmos de diagnóstico y el desarrollo de capacidades humanas para el enfrentamiento de la emergencia y reemergencia de los enterovirus en general.
- ✓ Como valores añadidos de estos estudios realizados en Cuba se encuentran la visibilidad internacional de los logros y capacidades del Sistema de Salud cubano en el diagnóstico molecular, secuenciación y análisis filogenético de los enterovirus emergentes y reemergentes.

## **Publicaciones**

- ✓ Fonseca MC, Sarmiento L, Resik S, Pereda N, Rodríguez H, Kourí V, Martínez PA, Piñón A, Limonta D, Más P, Hung LH Isolation of Coxsackievirus A24 variant from patients with hemorrhagic conjunctivitis in Cuba, 2008-2009. J Clin Virol 2012; (53)77– 81.
- ✓ Fonseca MC, Sarmiento L, Resik S, Martínez Y, Hung LH, Luis Morier, Alexander Piñón A, Valdéz O, Kouri V, Gonzáles G Coxsackievirus A6 and Enterovirus 71 causing hand, foot, and mouth disease in Cuba, 2011-2013..2014. Arch Virol (2014); 159:2451–2455.
- ✓ Fonseca MC and Sarmiento L. Hemorrhagic conjunctivitis: Epidemiological, clinical and virological findings from 45 years of study. In: Elias H Bazile, editor. Conjunctivitis: Etiology, Diagnosis and Clinical Management. New York: Nova Science Publishers 2014. pp 73-90.

## **Bibliografía**

1. Lim KH, Yin-Murphy M. An epidemic of acute hemorrhagic conjunctivitis in Singapore in 1970. Singapore Med J 1971; 12:247-49.
2. Sawyer LA, Hershov RC, Pallansch MA, Fishbien DB, Pinsky PF, Broerman SF, Grimm BB, Anderson LJ, Hall DB, Schonberger LB. 1989. An epidemic acute hemorrhagic

conjunctivitis in America Samoa caused by coxsackievirus A24 variant. *Am J Epidemiol* 130:1187-1198.

3. Poblete J, Bemudez-Walcott A, Ebbesen-Fludd V, Heyliger J, Hatcher A. 1998. Acute hemorrhagic conjunctivitis –St Croix, US Virgin Islands, September-October 1998. *JAMA* 280:1737.
4. 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* 64:269-274.
5. Moura F.E.A., Ribeiro D.C.S., Gurgel N., Da Silva Mendes A.C., Tavares F.N., Timóteo C.N.G., Da Silva E.E. 2006. Acute haemorrhagic conjunctivitis outbreak in the city of Fortaleza, northeast Brazil. *Br J Ophthalmol* 90:1091-1093.
6. Gopalkrishna, V., P.R. Patil, R.M. Kolhapure, H. Bilaiya, P. V. Fulmali, and R.P. Deolankar. 2007. Outbreak of Acute hemorrhagic conjunctivitis in Maharashtra and Gujarat states of India caused by coxsackie virus A-24 variant. *J Med. Virol.* 79:748-753.
7. Leveque, N., I.L. Amine, G. Cartet, A.B. Hammani, Y. C. Khazraji B., Lina J. J., Muyembe, H. Norder, and J.J. Chomel. 2007. Two outbreaks of acute hemorrhagic conjunctivitis in Africa due to genotype III coxsackievirus A-24 variant. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 26:199-202.
8. Cabrerizo M., Echevarria J.E., Otero A., Lucas P., Trallero G. 2008. Molecular characterization of a coxsackievirus A24 variant that caused an outbreak of acute hemorrhagic conjunctivitis in Spain, 2004. *J Clin Virol* 43(3):323-7.
9. Yeo DS, Seah SG, Chew JS, Lim EA, Liaw JC, Loh JP, Tan BH. 2007. Molecular identification of coxsackievirus A24 variant, isolated from an outbreak of acute hemorrhagic conjunctivitis in Singapore in 2005. *Arch Virol* 152(11):2005-16.
10. Wu D, Ke CW, Mo YL, Sun LM, Li H, Chen QX, Zou LR, Fang L, Huang P, Zhen HY. 2008. Multiple outbreaks of acute hemorrhagic conjunctivitis due to a variant coxsackievirus A24: Guangdong, China, 2007. *J Med Virol* 80(10) 1762-8.
11. Chu P.Y, Ke G.M., Chang C.H, Lin J.C., Sun C.Y., Huang W.L., Tsai Y.C., Ke L.Y., and Lin K.H. 2009. Molecular epidemiology of coxsackie A type 24 variant in Taiwan, 2000-2007. *J Clin Virol* 45 (4) 285-291.
12. Ishiko H, Takeda N, Miyamura K, Tanimura M, Yamanaka T, Kasuga K, Oda K, Imai K, Yamamoto Y, Mochida Y, Uchida K, Nakagawa H, Yamazaki S. 1992. Phylogenetic different strains of a variant of coxsackievirus A24 were repeatedly introduced but discontinued circulating in Japan. *Arch Virol* 126:179±193.
13. Ishiko H, Takeda N, Miyamura K, Kato N, Tanimura M, Lin KH, Yin-Murphy M, Tam JS, Mu GF, Yamazaki S. 1992. Phylogenetic analysis of a coxsackievirus A24 variant: the most recent worldwide pandemic was caused by progenies of a virus prevalent around 1981. *Virology* 187:148±759.
14. Lin KH, Takeda N, Miyamura K, Yamazaki S, Chen CW. 1991. The nucleotide sequence of 3C proteinase region of the coxsackievirus A24 variant: comparison of the isolates in Taiwan in 1985-1988. *Virus Genes* 5:121±131
15. Lin KH, Wang HL, Sheu MM, Huang WL, Chen CW, Yang CS, 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* 31:1160±1166.

16. CDC. Acute hemorrhagic conjunctivitis caused by coxsackievirus A24 variant, Puerto Rico. 1988. MMWR; 37:123-4,129.
17. Tavares F, Costa E, Oliveira S, Nicolai C, Baran M, Da Silva E. 2006. Acute hemorrhagic conjunctivitis and coxsackievirus A24v, Rio de Janeiro, Brazil, 2004. *Emerg Infect Dis* 12:495-497.
18. Dussart P, Cartet G, Huguet P, Leveque N, Hajjar C, Morvan J, Vanderkerckhove J, Ferret K, Lina B, Chomel JJ, 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* 75:559-565.
19. Más P, Goyenechea A, Jacobo M, Palomera R. Conjuntivitis hemorrágica. Estudio virológico de la epidemia de 1981. *Rev. Cub. Hig. Epid.* 1985; 23: 384-390.
20. Comellas M. Estudio de un brote de conjuntivitis hemorrágica, Cuba 1986. *Rev Cub. Hig. Epidemiol.* 1989; 27: 71-79.
21. Delgado BJ. 1997. Conjuntivitis hemorrágica epidémica en Cuba. Caracterización peidemiológica, cronología y situación actual. 1981-1997. *RTV* 2(7).
22. Avalos RI, Mas LP, Sarmiento PL, Palomera PR, Bello CM. 1999. Outbreak of Acute hemorrhagic conjunctivitis in Cuba . *Mem Inst Oswaldo Cruz* 94: 467-468.
23. Morales Palanco I.C., Gonzáles Cruz R., Quintana Jardines I. 2004. Conjuntivitis hemorrágica aguda en Cuba: Caracterización epidemiológica. *RTV* 9(1).
24. Dirección Nacional de Salud Pública de Cuba. Informe Anual 2005.
25. Melnick JL, Wimber IL. Liophilized combination of the Enterovirus equine antisera. New LBM pools prepared from reserves of antisera stored frozen for two decades. *Bull WHO* 1984; 63: 543-50.
26. Nix WA, Oberste MS, Pallansch MA (2006) Sensitive, seminested PCR amplification of VP1 sequences for direct identification of all enterovirus serotypes from original clinical specimens. *J Clin Microbiol* 44:2698–2704
27. Lin KH, Chern CL, Chu PY, Chang CH, Wang HL, Sheu MM, Huang WL, Pongsuwanna Y, Yamamoto S, Yoshino S, Ishiko H, Takeda N. Genetic analysis of recent Taiwanese isolates of a variant of coxsackievirus A24. *J Med Virol* 2001;64(3):269–74.
28. Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Mol Biol Evol* 2011 Oct;28(10):2731–9.