



Diversidad genética de enterovirus humanos detectados en aguas residuales de Uruguay y Argentina, y tipificación de casos de enfermedad manos-pies-boca durante epidemias reportadas en el litoral noroeste de Uruguay

Tesis de Doctorado en Ciencias Biológicas
Programa de Desarrollo de las Ciencias Básicas, PEDECIBA
Área Biología, sub área Biología Celular y Molecular
Universidad de la República

Alumno: Andrés Lizasoain Cuelho

Director de Tesis: Dr. Humberto Rodney Colina Muñoz

Codirectores de Tesis: Dr. Matías Victoria Montero y Dr. Edson Elías Da Silva

Tribunal

Presidente:

Dra. Mabel Berois
Sección Virología, Instituto de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Uruguay.

Vocales:

Dr. Gonzalo Bello
Laboratório de AIDS, Instituto Oswaldo Cruz, Fundacao Oswaldo Cruz, Brasil.

Dr. Javier Martin
World Health Organization Global Specialised Polio Laboratory, National Institute for Biological Standards and Control, United Kingdom.

Esta tesis fue posible gracias al financiamiento obtenido desde:

- Comisión Académica de Posgrados. Universidad de la República. Beca de posgrado académico (Doctorado). Periodo 2016-2019.
- Sistema Nacional de Investigadores. Agencia Nacional de Investigación e Innovación (ANII).
- Programa de Desarrollo de las Ciencias Básicas y Comisión Sectorial de Investigación Científica, Universidad de la República. Beca para Pasantía en el Exterior (usufrutuada para realizar una pasantía en el Laboratorio de Enterovirus del Instituto Oswaldo Cruz, de la Fundación FIOCRUZ de Río de Janeiro-Brasil).
- Beca para Pasantías en el Extranjero. Agencia Nacional de Investigación e Innovación. (Usufrutuada para realizar una pasantía en el Laboratorio de Enterovirus y en el Laboratorio de Virología Comparada y Ambiental, del Instituto Oswaldo Cruz, de la Fundación FIOCRUZ de Río de Janeiro-Brasil).
- Programa Polos de Desarrollo Universitario. Comisión Coordinadora del Interior. Universidad de la República.
- Comisión Sectorial de Investigación Científica. Universidad de la República. Proyectos de Iniciación a la Investigación. Convocatoria 2015.

Agradecimientos

Agradezco al Programa de Desarrollo de las Ciencias Básicas (PEDECIBA) por posibilitar la realización de manera gratuita de mis estudios de post graduación en el área de conocimiento de mi interés. A su vez agradezco a la Universidad de la República, por haber posibilitado, y estimulado mediante diversos mecanismos, mi incorporación a la vida académica a través de la docencia y la generación de conocimiento, así como también que se me haya otorgado una beca para realizar mi doctorado mediante la Comisión Académica de Posgrados (CAP-UdelaR).

Especialmente agradezco al Dr. Rodney Colina, al Dr. Matías Victoria y al Dr. Edson E. Da Silva, quienes, orientándome en distintas etapas de esta tesis, me ayudaron a superar múltiples obstáculos y me brindaron un nivel de autonomía que propició mi crecimiento como investigador.

También debo agradecer a aquellos investigadores que desde distintos grupos e instituciones colaboraron en distintas etapas de esta tesis: Dra. Daiana Mir y Dra. Nélica Rodríguez-Orsorio (Unidad de Genómica y Bioinformática, CENUR Litoral Norte, Universidad de la República), Dra. Gisela Masachessi, Dr. Adrián Farías y Dra. Silvia Nates (Instituto de Virología Dr. JM Vanella, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina), Dra. Viviana Mbayed y Dra. Dolores Blanco-Fernández (Cátedra de Virología, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires, Argentina), Dr. Daniel Cisterna (Servicio de Neurovirosis. Departamento de Virología. Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas, ANLIS-Malbrán, Buenos Aires, Argentina), Lic. Nataly Rodríguez y Lic. Sofia Piegas (Departamento de Vigilancia Epidemiológica, Ministerio de Salud Pública, Uruguay), personal investigador y técnico de los laboratorios de Enterovirus y de Virología Comparada y Ambiental, del Instituto Oswaldo Cruz de la Fundación FIOCRUZ de Río de Janeiro, Brasil, especialmente a la Dra. Fernanda Burlandy y al Dr. Ivanildo de Sousa.

Durante distintas etapas de esta tesis, requerí dedicar gran parte de la carga horaria de mi cargo docente del Departamento de Ciencias Biológicas, a la realización de algunas de las actividades de investigación que derivarían en la culminación de la misma. En tal sentido es necesario el agradecimiento al Dr. Daniel Peluffo, quien, en su rol de director de dicho Departamento, fue extremadamente flexible y considerado al asignarme las actividades y responsabilidades de mi cargo docente durante dichas etapas.

De igual manera, agradezco a mis compañeros del Laboratorio de Virología Molecular, por el apoyo constante recibido, y por su apertura para la discusión crítica de resultados.

También quiero agradecer a toda mi familia, en su expresión más amplia. Son pilar fundamental de todo lo que hago.

Esta tesis, como muchos de los cuentos que tendré que leer, ha llegado a su fin. Martino, hijo mío, que estás en el regazo de tu madre, a mi lado, y me haces volar de felicidad mientras escribo estas páginas: ojalá algún día te maravilles con la naturaleza y te entusiasme conocer lo que aún la biología no conozca para entonces. Esta tesis también ha sido gracias a ti, motorcito de la alegría de un hombre que sólo quiere que seas feliz.

Jueves 21 de octubre de 2021, Salto-Uruguay

*A ti Martino,
con la esperanza de que me hagas todas las preguntas del mundo
y sin poder yo contestarlas, busquemos juntos las respuestas.*

Resumen:

Dentro del género *Enterovirus* (EVs) en la familia *Picornaviridae*, encontramos 4 especies virales (*Enterovirus Humanos A, B, C y D*) en las que se incluyen los clásicamente conocidos coxsackievirus, poliovirus, echovirus y varios enterovirus numerados. En total, son más de 100 enterovirus distintos, que se han reportado como causantes de diversas enfermedades en humanos de todas las edades, abarcando desde un cuadro febril sin importancia, hasta enfermedades graves como las encefalitis o las parálisis flácidas agudas. Una de estas enfermedades es la *Hand-Foot-and-Mouth Disease* (HFMD), la cual se presenta como una enfermedad eruptiva, que sucede en contexto de brotes en centros educativos o de cuidado de la primera infancia. Si bien la mayoría de los casos se resuelven espontáneamente al cabo de unos días, existen casos que derivan en complicaciones a nivel cardiopulmonar o del sistema nervioso, con consecuencias fatales para el individuo.

La transmisión de los EVs se da principalmente por la ruta fecal-oral, y al ser éstos excretados en heces en altas concentraciones tanto por individuos sintomáticos como asintomáticos, las aguas residuales domésticas se convierten en una matriz ambiental cargada de dichos patógenos. Mediante el análisis de muestras de agua residual es posible conocer cuáles son las variantes virales que circulan en una determinada población.

Sudamérica es una región con escaso conocimiento acerca de la diversidad de enterovirus que afecta a sus poblaciones. En esta tesis hemos realizado un enfoque de *wastewater-based epidemiology* mediante *next-generation sequencing* de una región genómica de enterovirus obtenida mediante RT-PCR desde muestras de agua residual colectadas en Uruguay y Argentina, para conocer en profundidad la diversidad de enterovirus que circula en la región. A su vez, distintos brotes de HFMD ocurridos en las ciudades uruguayas de Salto y Paysandú durante 2018 y 2019, fueron estudiados mediante la tipificación de enterovirus a partir de muestras clínicas obtenidas desde individuos afectados.

El estudio de aguas residuales de ambos países permitió identificar la circulación de 47 EVs distintos, pertenecientes a las especies A, B y C, constituyendo los primeros reportes de detección en la región sudamericana para muchos de estos tipos. Se detectó la circulación de poliovirus relacionados a la vacuna Sabin en muestras de Córdoba (Argentina), pero no fue posible aislar el virus desde muestras colectadas en Uruguay. Se observaron patrones de recambio con el transcurso del tiempo, en lo que respecta a la circulación de tipos de una misma especie, así como recambio de linajes dentro de un mismo tipo. También se observó una importante diversidad y abundancia de miembros de la especie C, principalmente en las muestras de agua residual más recientemente colectadas.

Para algunos de los EVs detectados, se constató a nivel de distintos países de la región sudamericana, la circulación de cepas estrechamente relacionadas genéticamente, indicando amplios procesos de dispersión geográfica por parte de algunas variantes. La detección de cepas de un mismo tipo, circulando tanto en Argentina como en Uruguay, en diferentes momentos del muestreo, sugiere un carácter endémico para algunos EVs, aunque también se detectaron cepas de emergencia reciente en otras partes del mundo, cuyo ingreso a nuestra región probablemente ocurrió hace relativamente poco tiempo sin que hayan llegado a dispersarse ampliamente, tal es el caso de la variante emergente C1-like de enterovirus A71.

Con respecto a las epidemias de HFMD que afectaron a las ciudades de Salto y Paysandú, se evidenció que fueron tres miembros de la especie A los responsables de los casos: coxsackievirus A6, A16 y A10. Al integrar en análisis filogenéticos secuencias obtenidas desde los casos clínicos de HFMD con secuencias obtenidas desde muestras ambientales, se constató la circulación en Uruguay y en la región, de linajes epidémicos a nivel mundial como es el caso del linaje D3 de coxsackievirus A6 o del linaje F de coxsackievirus A10. Además, se observó una estrecha relación genética entre las cepas detectadas durante las epidemias de Salto y Paysandú a partir del estudio de casos clínicos, con cepas detectadas en muestras de agua residual colectadas previamente.

Esta tesis aporta datos sin precedentes en la región sur de Sudamérica sobre la presencia en el ambiente de un amplio espectro de tipos de EVs, y profundiza en la caracterización de algunas variantes de interés para la salud pública, así como en el estudio de eventos epidémicos de casos de una enfermedad que no había sido abordada en profundidad en Uruguay.

Esta tesis es un aporte para la creación de un programa de *wastewater-based epidemiology* para EVs en Uruguay mediante monitoreo de aguas residuales empleando *next-generation sequencing*.

Índice

Sección	Título	Pág.
1.	INTRODUCCIÓN	9
1.1.	Clasificación y taxonomía	9
1.2.	Enterovirus humanos y la salud humana	11
1.2.1.	Especie A	12
1.2.2.	Especie B	13
1.2.3.	Especie C	14
1.2.4.	Especie D	15
1.3.	Estructura	16
1.4.	Infección y ciclo replicativo	18
1.5.	Mecanismos para la generación de diversidad genética	20
1.6.	Emergencia de tipos y genotipos	22
1.7.	Respuesta inmune ante la infección	23
1.8.	Métodos de detección	25
1.9.	Enterovirus humanos en la región sudamericana	30
1.10.	Enterovirus humanos en Uruguay	37
1.11.	Enterovirus en el ambiente	39
1.12.	Vigilancia ambiental de enterovirus humanos en América del Sur	42
1.13.	Vigilancia ambiental de enterovirus humanos mediante next-generation sequencing	44
1.14.	Algunos aspectos generales sobre la erradicación de poliovirus	48
1.14.1.	Poliomielitis	48
1.14.2.	Vacunas antipoliomielíticas	49
1.14.3.	Erradicación. Situación mundial actual	50
1.14.4.	Estrategia de erradicación	51
1.14.5.	Derivados vacunales y epidemias	51
1.14.6.	Erradicación de poliovirus en las Américas	54
1.14.7.	Actividades de vigilancia ambiental de poliovirus en Sudamérica	56
1.14.8.	Erradicación del poliovirus en Uruguay	58
1.15.	Algunas generalidades sobre la enfermedad manos-pies-boca	59
1.15.1.	Introducción a la enfermedad	59
1.15.2.	Primeros reportes	60
1.15.3.	Cuadro clínico	61
1.15.3.1.	Presentación clásica	61
1.15.3.2.	Presentación atípica	62
1.15.3.3.	Complicaciones	62
1.15.4.	Antecedentes de estudio en la región	64
1.15.5.	Antecedentes en Uruguay	66
2.	OBJETIVOS	67
2.1.	OBJETIVO GENERAL	67
2.2.	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	67
3.	COLABORACIONES ACADÉMICAS QUE POTENCIARON ESTA TESIS	68
4.	RELEVANCIA	69
5.	RESULTADOS	70
5.1.	Artículos científicos generados durante esta tesis que fueron publicados en revistas científicas internacionales arbitradas entre pares e indexadas	71
5.1.1.	Artículo 1	71
5.1.2.	Artículo 2	83
5.1.3.	Artículo 3	102
5.1.4.	Artículo 4	114
5.1.5.	Artículo 5	134
5.1.6.	Artículo 6	142
5.2.	Datos preliminares para un artículo en construcción (Artículo 7)	146
5.2.1.	Descripción de la epidemia de HFMD reportada en Paysandú (Uruguay) en 2019	146
5.2.2.	Comparación de variantes detectadas mediante el estudio de muestras clínicas y de agua residual	147
6.	DISCUSIÓN	153
6.1.	Sobre el abordaje metodológico en el cual se basó esta tesis para describir la diversidad de enterovirus a partir de muestras de agua residual	153
6.2.	Sobre la diversidad de enterovirus humanos detectados en muestras de agua residual de Uruguay y Argentina	157

6.2.1.	Enterovirus de la especie A	157
6.2.2.	Enterovirus de la especie B	158
6.2.3.	Enterovirus de la especie C	161
6.3.	Sobre la detección de poliovirus a partir de muestras de agua residual de Córdoba, y su ausencia en muestras de Buenos Aires y Uruguay	164
6.4.	Sobre la detección de enterovirus A71 y echovirus 30 en muestras de Uruguay y Argentina	169
6.5.	Sobre las epidemias de HFMD que tuvieron lugar en Uruguay durante 2018 y 2019, los enterovirus detectados, su relación con cepas detectadas en la región, así como con cepas detectadas en muestras de agua residual analizadas en esta tesis	172
7.	CONCLUSIONES	179
8.	PERSPECTIVAS	181
9.	BIBLIOGRAFÍA	184

1. INTRODUCCIÓN

Cualquier abordaje epidemiológico que realicemos de los enterovirus humanos, presenta cierta complejidad intrínseca que merece ser detallada. En primer lugar, enterovirus humanos hace referencia a un numeroso grupo de virus, en el cual podríamos citar a más de 100 tipos distintos (Zell et al. 2017), que, estando relacionados genéticamente, presentan características distintivas unos de otros. Estas características distintivas, pueden llegar a ser bastante complejas, citando como ejemplo, la utilización de distintos receptores celulares durante la infección (Wells & Coyne, 2019) y el desencadenamiento de distintas y diversas enfermedades en el humano (Tapparel et al. 2013).

Un grupo tan numeroso y diverso, se ha asegurado su carácter de ubicuo. Los enterovirus afectan humanos de ambos sexos, de todas las edades, y en todas las regiones del planeta, durante las distintas estaciones climáticas del año (Pallansch et al. 2013). A pesar de ello, mientras que en torno a algunos enterovirus se ha generado mucho conocimiento, otros han sido apenas explorados y aún, no se ha llegado a comprender del todo su rol en relación a la salud pública humana, debido a que se trata de variantes inusualmente detectadas (Bessaud & Delpeyroux, 2020). Por supuesto que el sesgo en la atención hacia unos u otros ha estado dirigido por el impacto que han tenido, o tienen, sobre la salud de la población.

Además, a menudo son detectadas nuevas variantes, muchas de las cuales cobran protagonismo rápidamente en epidemias locales, regionales, y globales, incluso asociadas a enfermedades con las cuales no estaban relacionadas previamente (Bian et al. 2015, Zhang et al. 2016a, Baggen et al. 2018a). Esta complejidad propia de los enterovirus humanos demanda que la vigilancia epidemiológica sea un proceso con capacidad de redirigirse todo el tiempo.

1.1. Clasificación y taxonomía

Todos los enterovirus humanos pertenecen al grupo IV de la clasificación de Baltimore, por poseer un genoma constituido por un ARN monocatenario de sentido positivo (Baltimore, 1971). Además, los enterovirus humanos integran el género *Enterovirus* de la familia *Picornaviridae* (Zell et al. 2017). Este género, incluye 12 especies de *Enterovirus* (EV-A a EV-L) y 3 especies de *Rinovirus* (RV-A a RV-C). Las 4 primeras especies de *Enterovirus* (EV-A a EV-D), al igual que los *Rinovirus*, se caracterizan por infectar humanos¹. Los enterovirus humanos EV-A a EV-D incluyen los clásicamente conocidos coxsackievirus, echovirus, poliovirus y enterovirus numerados.

Los coxsackievirus se encuentran distribuidos en las especies A, B y C, mientras que los echovirus integran exclusivamente la especie B y los poliovirus

¹ Los *Rinovirus*, por pertenecer al género *Enterovirus* e infectar humanos, también podrían considerarse enterovirus humanos, pero a los efectos de esta tesis sólo consideraremos como tal a los miembros de las especies A, B, C y D.

exclusivamente la especie C. Por otro lado, los enterovirus numerados se distribuyen en las cuatro especies (desde la especie A hasta la especie D).

La nomenclatura de coxsackievirus, echovirus y poliovirus corresponde a una clasificación originalmente basada en su capacidad para infectar/enfermar ratones de experimentación y humanos, en la que los coxsackievirus eran aquellos virus capaces de causar parálisis flácida (coxsackievirus del tipo A) o espática (coxsackievirus del tipo B) al ser inoculados en ratones recién nacidos, a diferencia de los poliovirus, que eran reconocidos por generar parálisis casi que exclusivamente en humanos, por lo general graves y con daño neurológico permanente. Por otro lado, los echovirus incluían virus que habían sido aislados mediante cultivo celular, pero que no desencadenaban patologías en animales de experimentación, y para los cuales (inicialmente) se desconocía asociación alguna con enfermedad en humanos (Hyypiä et al. 1997, Pallansch et al. 2013).

Esta nomenclatura clásica se continúa utilizando hoy en día, pero los tipos que se fueron descubriendo desde los años 60 a la actualidad han sido denominados mediante numeración consecutiva y la palabra “enterovirus”, a partir del número 68 (Schieble et al. 1967, Melnick et al. 1974). Además, para indicar su pertenencia a una especie determinada, cada enterovirus numerado es nombrado con la letra correspondiente a su especie, por ejemplo, EV-D68, por ser miembro de la especie D. Esto ha evitado el incremento de nuevos miembros en las tres categorías mencionadas anteriormente (coxsackievirus, poliovirus, y echovirus), solucionando así diferentes dificultades planteadas que complicaban la clasificación de nuevas variantes, tal como las patogenicidades distintas para dos cepas de un mismo serotipo, al ser evaluadas en modelo ratón (Hyypiä et al. 1997).

En la actualidad, el género *Enterovirus* se divide en especies en base a la organización del genoma, la similitud de secuencia y también según propiedades biológicas. Para las especies A, B, C y D, se ha determinado que los miembros de cada una de estas comparten más de 70% de identidad aminoacídica a nivel de la poliproteína, más del 60% a nivel de la región P1 y más del 70% en las proteínas no estructurales 2C + 3CD. A su vez, poseen un rango limitado de receptores celulares, y un rango limitado de hospedero, su contenido G+C no varía en más de 2,5%, y presentan una compatibilidad significativa en el procesamiento proteolítico, replicación, encapsidación, y recombinación genética (Pallansch et al. 2013).

En base a estudios moleculares se ha determinado que la secuencia nucleotídica de VP1 permite distinguir a los diferentes enterovirus y asignar serotipo con el mismo valor que si se estuvieran utilizando ensayos de neutralización. El criterio de tipificación está dado por una similitud de al menos 75% a nivel nucleotídico, y 85% a nivel aminoacídico con una cepa prototipo (Oberste et al. 1999a, Oberste & Pallansch, 2005). Estos *cut-off* fueron propuestos hace más de 20 años basándose en un número relativamente pequeño de secuencias en comparación con las que se han reportado hasta la actualidad. Sin embargo, este criterio es ampliamente aceptado y ha funcionado para la mayoría de los enterovirus que conocemos, aunque se ha aceptado que existen zonas grises en la clasificación de algunos tipos (Brown et al. 2009, Lukashev & Vakulenko, 2017), y que en general, la descripción de tipos nuevos, no debe limitarse a este criterio (Harvala et al. 2018).

1.2. Enterovirus humanos y la salud humana

Los enterovirus están asociados con más de 20 síndromes clínicamente reconocibles, entre los que destacan la poliomielitis, encefalitis, meningitis aséptica, enfermedad enteroviral diseminada perinatal, miocarditis, pericarditis, pleurodinia, enfermedad respiratoria, enfermedad febril, síndromes de Reye, exantema, enantema, conjuntivitis, uveítis, gastroenteritis, hepatitis, enfermedad manos-pies-boca, artritis, pancreatitis, y enfermedades crónicas en pacientes inmunocomprometidos. Otras enfermedades son menos frecuentes, o su asociación con enterovirus ha sido objeto de controversia, como la diabetes, desórdenes del tracto urinario, orquitis, síndrome de muerte súbita infantil, rabdomiólisis, y síndrome de fatiga postviral (Stalkup & Chilukuri, 2002; Tapparel et al. 2013).

Aunque muchas de las infecciones por enterovirus son asintomáticas o subclínicas, brotes regulares o esporádicos de enfermedades asociadas a los mismos son comunes en todo el planeta, y conducen a una morbilidad y mortalidad significativa (Pallansch et al. 2013, Pons-Salort et al. 2015). Sólo en Estados Unidos, se estima que estos virus causan entre 10 a 15 millones de infecciones sintomáticas cada año (Centers for Disease Control and Prevention, 2021a).

Desafortunadamente, aunque existe a nivel mundial un programa de vigilancia para poliovirus (uno de los enterovirus humanos de mayor importancia causante de cuadros de parálisis flácidas agudas, AFP por *Acute Flaccid Paralysis*), la vigilancia del resto de los enterovirus humanos (enterovirus no-polio) varía muchísimo entre países y regiones, y en general, se realiza de manera pasiva. Algunos países han realizado esfuerzos adicionales para contar con mayor conocimiento sobre la incidencia de los enterovirus en la salud de la población. Por ejemplo, Japón cuenta con un sistema de vigilancia centinela basado en la identificación de pacientes con meningitis aséptica, enfermedad manos-pies-boca, herpangina y conjuntivitis hemorrágica aguda (Pons-Salort & Grassly, 2018). También en China, se ha dirigido la vigilancia principalmente hacia la enfermedad manos-pies-boca debido a que desde hace muchos años se reportan grandes epidemias y se ha constatado una circulación extendida en el tiempo de una gran diversidad de enterovirus causando estos casos (Xing et al. 2014). Por otro lado, en Estados Unidos la vigilancia se basa en el reporte voluntario por parte de laboratorios con capacidad de tipificación de enterovirus, y los datos principalmente corresponden a casos ocurridos durante brotes, y no tanto a la circulación endémica de los distintos tipos (Pons-Salort et al. 2018). En cambio, en Europa, en general la vigilancia recae en la detección de enterovirus en pacientes con infecciones graves que fueron admitidos en hospitales y presentaron sintomatología de afectación neurológica (Bubba et al. 2020).

Las infecciones por enterovirus ocurren más frecuentemente en niños menores de 10 años. En regiones de clima templado, las infecciones son más comunes durante el verano y el otoño, mientras que en regiones tropicales ocurren a lo largo de las cuatro estaciones climáticas. La edad presenta una fuerte asociación con la presentación clínica: enfermedades a nivel del sistema nervioso central ocurren más frecuentemente en niños de 5 a 15 años de edad, miocarditis en el rango de 20 a 40 años, infecciones severas (incluyendo miocarditis, enfermedades del sistema

nervioso central y enfermedad del tipo séptica) en recién nacidos y niños pequeños, y enfermedad manos-pies-boca en niños menores de 5 años de edad. Un nivel socioeconómico bajo constituye un factor de riesgo para la infección, probablemente por su asociación con la ausencia de saneamiento y condiciones de vivienda precarios (Pallansch et al. 2013).

La relevancia de los enterovirus a nivel de la salud pública mundial, se debe principalmente a que éstos son reconocidos como patógenos emergentes causantes de enfermedades neurológicas, las cuales a menudo acarrearán más complicaciones que las infecciones leves (Morens et al. 2019; Uprety & Graf, 2020). Además, si bien poliovirus ha sido erradicado en casi la totalidad del planeta, las AFP continúan siendo un importante problema de salud pública, asociándose muchos de estos casos con enterovirus no polio (Sousa et al. 2020, Onvimala et al. 2021, Yoon et al. 2021). Por otro lado, la enfermedad manos-pies-boca ha incrementado su incidencia en la región de Asia-Pacífico afectando a millones de niños cada año (Brown et al. 2020), y son cada vez más frecuentes los reportes de epidemias causadas por distintos enterovirus, no sólo en esta región geográfica, sino también en occidente (Osterback et al. 2009, Mirand et al. 2012, Martínez-López et al. 2021). Especialmente, los recién nacidos y niños pequeños desarrollan síntomas severos y cuadros clínicos graves a partir de una infección por enterovirus. De hecho, los enterovirus se encuentran entre las causas más frecuentes de brotes en unidades de cuidado intensivo neonatal cada año en Estados Unidos (Wells & Coyne, 2019).

La correlación entre los distintos cuadros clínicos con los más de 100 tipos de enterovirus humanos es muy variable. Por ejemplo, si bien los tipos de la especie A se relacionan más frecuentemente con enfermedad manos-pies-boca, también han sido documentados casos de la enfermedad asociados a serotipos de la especie B (Sousa et al. 2018a, Chen et al. 2019, Xiao et al. 2021). A su vez, prácticamente todos los enterovirus han sido identificados en casos de AFP, aunque algunos tipos presentan una asociación mucho más estrecha que otros (Suresh et al. 2018). Con estos ejemplos se comprende que, un mismo enterovirus puede estar asociado a múltiples cuadros clínicos.

A continuación, se describirá de manera muy resumida, las implicancias que los enterovirus de cada especie viral presentan para la salud de la población.

1.2.1. Especie A

La especie A incluye varios coxsackievirus del tipo A y algunos enterovirus numerados (Figura 1). Varios de los miembros de esta especie están implicados en meningitis, encefalitis, parálisis, enfermedades del tracto respiratorio inferior y superior, herpangina, onicomadesis, miopericarditis, entre otras (Tapparel et al. 2013). Sin embargo, en general, los miembros de la especie A, se caracterizan por estar asociados a cuadros de enfermedad manos-pies-boca (HFMD por *hand-foot-and-mouth disease*), y son la causa más común de epidemias de esta enfermedad (Esposito & Principi, 2018). Dicha enfermedad se caracteriza por la aparición de ampollas en la boca (herpangina), así como *rash* cutáneo en palmas de manos y plantas de pies. Inicialmente puede incluir fiebre, dolor de garganta y malestar. En

la región de Asia-Pacífico se han reportado grandes epidemias, donde destaca China, con aproximadamente 2 millones de casos cada año (Liu et al. 2021). Coxsackievirus A16 y enterovirus A71 son los dos tipos clásicamente relacionados con la HFMD. El primero de ellos ha sido típicamente caracterizado por causar cuadros leves de la enfermedad, y en los últimos años su incidencia ha perdido importancia ante la emergencia de otros tipos que lo han desplazado (Kimmis et al. 2018, Bian et al. 2019). El enterovirus A71, ha tenido un rol preponderante en la generación de brotes de HFMD, causando en algunas oportunidades, cerca del 80% de los casos (Klein & Chong, 2015), y hasta un 96% de los casos graves de la enfermedad durante algunos brotes (Wang et al. 2017, 2018, Li et al. 2018). A su vez, ha sido implicado en varios brotes de AFP en distintas partes del mundo, y se lo ha catalogado como una causa emergente de las mismas, en las postrimerías de la erradicación del poliovirus (Suresh et al. 2018). Existe una importante diversidad de genogrupos de enterovirus A71 (genogrupos A hasta G), que se han distribuido globalmente según determinado patrón temporal y geográfico (Puenpa et al. 2019). A fines de la década del 2000, se comenzó a reportar la emergencia de tipos como el coxsackievirus A6 o el coxsackievirus A10 durante la caracterización de brotes de HFMD, incluso relacionándolos con casos atípicos de la enfermedad, y algunas veces con derivaciones y complicaciones a nivel del sistema nervioso central de los individuos afectados (Aswathyraj et al. 2016, Chen L et al. 2020, Zhao et al. 2020). A la actualidad, coxsackievirus A6 aparece como la causa más frecuente de HFMD. A su vez, se ha visto la co-circulación de los serotipos CVA6, CVA10, CVA16 y EV-A71 durante grandes epidemias (Lu et al. 2012; Klein & Chong, 2015) lo cual propicia la interacción evolutiva de los mismos.

1.2.2. Especie B

La especie Enterovirus B incluye unos 59 serotipos entre los cuales encontramos todos los coxsackievirus del tipo B, el coxsackievirus A9, todos los echovirus y varios enterovirus numerados (Figura 1). Es la especie más numerosa cuando la comparamos con las otras tres, y además la más frecuentemente reportada a nivel global (Zell et al. 2017, Brouwer et al. 2021).

Muchos de los enterovirus de esta especie, pueden causar una infección del sistema nervioso central, aunque por lo general es limitada a la inflamación de las meninges (meningitis aséptica) sin llegar al parénquima (encefalitis) o la médula espinal (mielitis). Cuando el virus infecta la sustancia gris de la médula espinal se desencadena la AFP (Tapparel et al. 2013).

La AFP es una de las enfermedades más comúnmente relacionada a los enterovirus de esta especie. Diferentes serotipos han estado implicados en el 72% de todos los casos de AFP asociados con enterovirus, siendo algunos tipos apenas encontrados esporádicamente, y otros de manera muy frecuente (Suresh et al. 2018). Por otro lado, más del 90% de las meningitis virales son causadas por enterovirus, aunque apenas 3% de las infecciones del sistema nervioso central por enterovirus llevan a encefalitis (Koskiniemi et al. 1991, Irani 2008). En poblaciones de recién nacidos (muy susceptibles) la infección del sistema nervioso central se asocia con infección sistémica, necrosis hepática, miocarditis, y enterocolitis necrotizante con tasas de

morbilidad y mortalidad estimadas en 70% y 10%, respectivamente. Bebés de mayor edad, niños y adultos muy rara vez presentan meningitis complicadas y por lo general se recuperan sin secuelas (Irani 2008, Tapparel et al. 2013).

Echovirus 30 es uno de los enterovirus de la especie B más comúnmente detectados y es la causa principal de meningitis virales y encefalitis en climas templados, con grandes epidemias recientemente reportadas en Europa, América y la región Asia-Pacífico (Brown et al. 2020). Un estudio realizado en Europa demostró que además del echovirus 30, varios echovirus (E5, E6, E9, E11 y E18) son detectados principalmente a partir de pacientes con síntomas neurológicos, y son responsables de miles de casos anualmente en dicha región. Este y otros estudios colocan a echovirus 6 como un enterovirus muy frecuentemente detectado, al igual que echovirus 30 (Trallero et al. 2010, Wiczorek et al. 2016, Bubba et al. 2020).

A su vez, los coxsackievirus del tipo B se asocian comúnmente con las miocarditis y pancreatitis (Baboonian et al. 1997; Huber & Ramsingh, 2004). Se ha detectado la presencia de enterovirus en hasta el 70% de muestras de miocardio afectado por esta patología (Tapparel et al. 2013).

Además de estos cuadros clínicos, los enterovirus de la especie B también se han reportado desde casos de enfermedad manos-pies-boca, pleurodinia, enfermedad respiratoria, herpangina, o gastroenteritis (Tapparel et al. 2013).

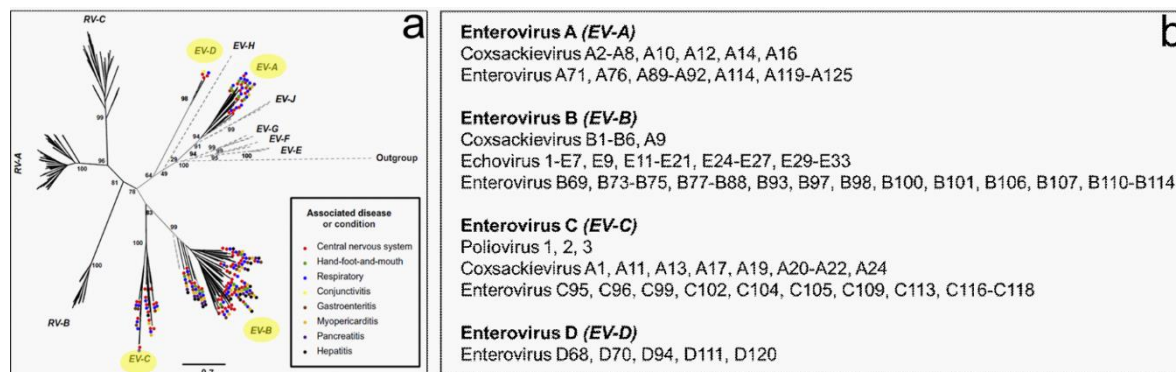


Figura 1. Clasificación de Enterovirus Humanos. Los enterovirus humanos se agrupan en cuatro especies virales distintas (EV-A, EV-B, EV-C y EV-D) e integran junto a otras 11 especies de rinovirus y enterovirus, el género *Enterovirus*, de la familia *Picornaviridae* (a), (la imagen no incluye las especies EV-I, EV-K, y EV-L). Dentro de cada una de estas cuatro especies encontramos distintos tipos de coxsackievirus, echovirus, poliovirus y enterovirus numerados (b), que se asocian con diversas enfermedades o condiciones clínicas en el ser humano. La imagen del panel a) fue tomada y modificada de Tapparel et al. (2013), doi: 10.1016/j.meegid.2012.10.016 y la información mostrada en el panel b) fue tomada desde https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_online_report/positive-sense-rnaviruses/w/picornaviridae/681/genus-enterovirus.

1.2.3. Especie C

Al mencionar la especie C debemos hacer una consideración ya que es la especie en la cual encontramos a los tres tipos de poliovirus (Brown et al. 2003, Rakoto-Andrianarivelo et al. 2008a) y los mismos merecen una sección aparte, no sólo por la alta incidencia que han tenido en los casos de parálisis infantil a nivel mundial,

sino por los esfuerzos a nivel de salud pública que se han realizado en las últimas décadas para lograr su erradicación. Además de estos tres tipos, en la especie C encontramos varios coxsackievirus del tipo A, así como varios enterovirus numerados, totalizando 23 tipos distintos (Figura 1).

Se ha demostrado que los enterovirus no polio de la especie C, circulan de manera frecuente en el continente africano, a partir del estudio de heces de niños sanos y de pacientes con cuadros de AFP (Rakoto-Andrianarivelo et al. 2007, Sadeuh-Mba et al. 2013). A pesar de que no son muy comúnmente reportados desde el estudio de casos clínicos en países desarrollados (Harvala et al. 2014, Brinkman et al. 2017, Pons-Salort et al. 2018), varios estudios basados en el análisis de agua residual doméstica los reportan circulando frecuentemente entre las poblaciones (Harvala et al. 2014, Brinkman et al. 2017, Majumdar et al. 2018a). De todas formas, los enterovirus no-polio de la especie C han sido identificados a partir del estudio de cuadros de AFP (Sousa et al. 2020), meningitis (Nkosi et al. 2021), HFMD (Xu et al. 2017) y enfermedades respiratorias (Supian et al. 2021), entre otras (Tapparel et al. 2013).

Particularmente, una variante de coxsackievirus A24 (CVA24v) ha sido responsable de grandes y extendidas epidemias de conjuntivitis hemorrágica aguda (AHC por *Acute Hemorrhagic Conjunctivitis*). Las infecciones por este tipo son principalmente documentadas en los trópicos durante la temporada de verano lluvioso, y se han reportado importantes brotes en China, Guayana Francesa, India, Brasil y África Occidental (Brown et al. 2020). La variante de CVA24 que causa AHC ha manifestado una naturaleza pandémica, con 10 millones de casos de conjuntivitis reportados mundialmente (Baggen et al. 2018b).

1.2.4. Especie D

Aunque apenas encontramos 4 tipos en esta especie (Figura 1), uno de ellos, el enterovirus D68, re emergió en torno al año 2014 significando grandes problemas para la salud pública de varias regiones.

Si bien este virus se conoce como virus respiratorio desde 1962 (Schieble et al. 1967), recién en 2014 se reportó un gran brote de enfermedad respiratoria severa asociado al mismo en Norteamérica (The Lancet Infectious Diseases, 2014; Midgley et al. 2015, Messacar et al. 2016) con *clusters* de infección más pequeños en Europa y Asia, demostrando la re-emergencia del mismo (Holm-Hansen et al. 2016). Los casos aumentaron en 2016 y 2018, detectándose también en América del Sur y continuando su circulación en el resto del planeta (Carney et al. 2015, Ruggieri et al. 2017, Brown et al. 2020).

Durante la epidemia de 2014, se reportaron casos de mielitis flácida aguda (AFM por *Acute Flaccid Myelitis*) en algunos de los niños con diagnóstico de EV-D68, lo que llevó a considerar un rol de este virus en el aumento de la gravedad de la enfermedad y el desarrollo de síntomas neurológicos. La evidencia acumulada actualmente indica que EV-D68 sería la causa de la serie de casos de AFM reportados (Hixon et al. 2019, Uprety & Graf, 2020; Elrick et al. 2021).

Actualmente, los sistemas de vigilancia continúan en alerta, y se está trabajando activamente en el desarrollo de drogas y vacunas contra dicho patógeno (Dai et al. 2018, Hu et al. 2020, Raychoudhuri et al. 2021).

1.3. Estructura

El nombre de la familia que incluye a los enterovirus humanos (*Picornaviridae*) proviene de pico=pequeño y rna=ARN virus: pico-rna-virus, es decir virus pequeños con genoma ARN, siendo estas, características de dicha familia (Zell, 2018). Por lo general los enterovirus tienen un tamaño aproximado de entre 25 a 30 nanómetros. Los viriones son esféricos, carecen de envoltura y las cápsides están formadas por 60 unidades estructurales (protómeros) que, mediante un ordenamiento en 12 pentámeros, confieren al virión una simetría del tipo icosaédrica (Figura 2). Cada protómero consta de un arreglo de las proteínas denominadas VP1, VP2, VP3 (una unidad de cada una), las cuales representan la cara externa de la cápside y están asociadas hacia el interior con VP4, proteína que reviste la cara interna de ésta (Hyypia et al. 1997, Baggen et al. 2018a).

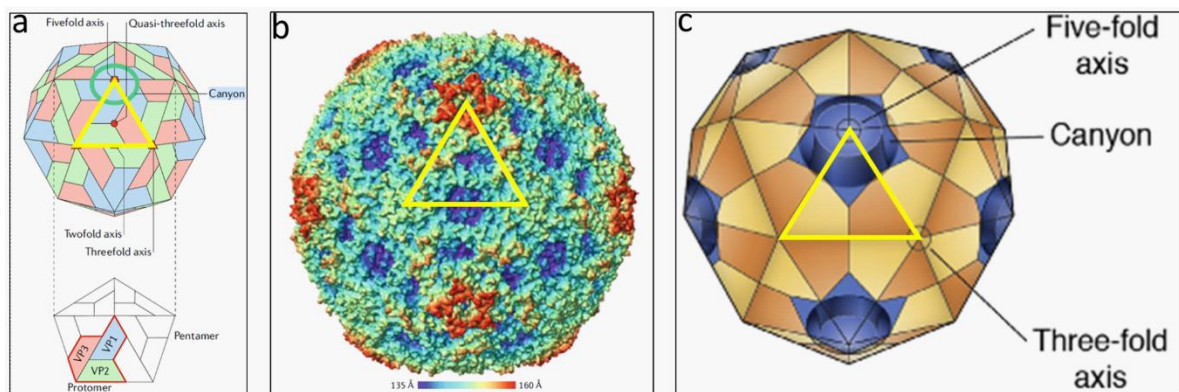


Figura 2. Estructura de una partícula viral de enterovirus. En a) se observa cómo se ensamblan las proteínas VP3, VP2 y VP1 constituyendo la unidad estructural denominada protómero. Cinco protómeros se arreglan de tal manera que dan lugar a una estructura pentamérica. Doce pentámeros se asocian para dar lugar a la cápside del enterovirus, la cual adopta una simetría del tipo icosaédrica. Nótese que, rodeando cada vértice quintuple, se evidencia una estructura denominada “cañón”, la cual sería de suma importancia para la unión de la partícula viral al receptor celular. En b) se observa una reconstrucción de la superficie de la cápside del enterovirus D68 coloreada según la distancia con respecto al centro del virión, como se muestra en la barra de referencia (note que las regiones más protuyentes aparecen de un color rojo intenso, y las depresiones de un color azul oscuro). En c) se esquematiza la estructura de la cápside del enterovirus D68, representando claramente la estructura conocida como cañón. En cada panel, un triángulo amarillo indica uno de los 60 protómeros que componen la cápside del virus. La proteína VP4 se asocia a las demás proteínas estructurales y constituye el revestimiento interno de la cápside (no se muestra en ninguno de los paneles). Las imágenes de los paneles a) y b) fueron tomadas y modificadas de Baggen et al. (2018a), doi: 10.1038/s41579-018-0005-4 y la imagen del panel c) fue tomada y modificada de Elrick et al. (2021), doi: 10.1016/j.jbc.2021.100317.

El genoma de los enterovirus humanos está compuesto por aproximadamente unos 7.500 nucleótidos de ácido ribonucleico, y esta longitud varía dependiendo del tipo de enterovirus en cuestión (Zell, 2018).

Cada genoma posee una proteína VPg covalentemente unida a su extremo 5' y una región de poliadeninas en el extremo 3'. Dos regiones no traducibles (UTRs por *untranslated regions*), en los extremos 5' y 3' flanquean un largo marco abierto de lectura (ORF, por *Open Reading Frame*), que codifica una poliproteína de aproximadamente 2.220 aminoácidos. Esta poliproteína, será luego clivada por proteinasas celulares, para dar origen a polipéptidos virales maduros. En la extensión de la poliproteína encontramos tres regiones: P1, P2 y P3 (Figura 3). La región P1 contiene los genes (1a a 1d) codificantes de las proteínas estructurales (VP4, VP2, VP3 y VP1). La región P2 codifica una proteasa (2Apro), más dos proteínas involucradas en la replicación del ARN (2B y 2C). Finalmente, la proteína VPg (3B), su precursor (3AB), la proteasa viral principal (3Cpro), y la ARN polimerasa dependiente de ARN (3Dpol) se encuentran en la región P3. Cada producto proteico final es el resultado de subsecuentes clivajes de precursores de mayor longitud a partir de la poliproteína inicial (Wang et al. 2020).

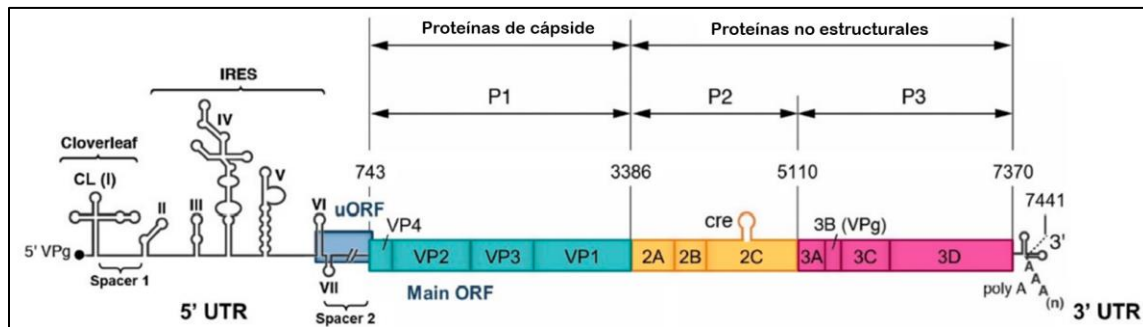


Figura 3. Organización del genoma de enterovirus. El genoma de ARN de hebra simple de sentido positivo, y poliadenilado en el extremo final 3' de los enterovirus, se encuentra unido covalentemente a una proteína viral VPg (también llamada 3B) en el extremo 5'. Además del marco abierto de lectura principal (Main ORF), la mayoría de los tipos de las especies EV-A, EV-B y EV-C, contienen un segundo marco de lectura (uORF), corriente arriba y solapante con el ORF principal, el cual codifica para una proteína que estaría implicada en el crecimiento del virus en el epitelio intestinal. La región codificante es flanqueada por dos regiones no traducibles (5' y 3' UTR). La 5' UTR (743 nucleótidos) se muestra aumentada para indicar las siete estructuras del tipo *stem-loop* (I a VII) que forman dos unidades funcionales: la "hoja de trébol" o "cloverleaf" (CL:I) que se requiere para el inicio de la síntesis de las hebras positivas y negativas de ARN, y el sitio interno de unión al ribosoma (IRES: II-VI) que inicia la traducción cap-independiente mediante la interacción con factores de traducción canónicos y no canónicos para reclutar los ribosomas. La región P1 codifica para las proteínas de la cápside (VP1, VP2, VP3 y VP4) y las regiones P2 y P3 codifican para proteínas no estructurales como ser la 3D ARN polimerasa dependiente de ARN. La imagen fue tomada y modificada de Muslin et al. (2019), doi:10.3390/v11090859.

Como se puede observar, las distintas regiones del genoma tienen asociadas proteínas que cumplirán distintas funciones, por lo que a P1 se la denomina región estructural y a P2 y a P3 regiones no estructurales.

Durante muchos años se pensaba que los enterovirus contaban con un único ORF, pero recientemente se ha descubierto la existencia de un segundo ORF en la mayoría de los enterovirus de las especies A y B, y en aproximadamente la mitad de los del tipo C (Lulla et al. 2019), el cual se localiza corriente arriba y solapando el ORF de la poliproteína. Este segundo ORF codifica una proteína cuyo rol estaría

relacionado con la posibilidad de replicarse en el epitelio intestinal, sitio de entrada en un hospedero susceptible.

Segmentos específicos localizados en las UTRs, serán reconocidas por las subunidades ribosomales de la célula, así como por varios factores que actúan en la replicación del genoma viral. Dichos motivos se encuentran altamente conservados, a diferencia de otras secciones que muestran una gran variación genética (Dutkiewicz et al. 2016, Muslin et al. 2019). También se encuentran altamente conservados algunos segmentos codificantes para las proteínas no estructurales, cuyas funciones son de suma importancia para el ciclo de vida del virus. En cambio, existe una gran variación de largo y secuencia a nivel de P1, como resultado de la presión inmune causada por los anticuerpos del hospedero sobre las proteínas externas de la cápside VP3, VP2 y VP1, las cuales se encuentran expuestas a los mismos.

1.4. Infección y ciclo replicativo

El ciclo replicativo de un enterovirus comienza con la unión del virión a uno, o a varios receptores en la superficie de la célula diana, lo que lleva a una endocitosis mediada por receptor. Los enterovirus pueden utilizar diferentes rutas de endocitosis, dependiendo del serotipo y del tipo celular. La unión al receptor y/o cambios de pH en el sistema endosomal desencadena la decapsidación del genoma y su liberación al citoplasma mediante un poro que se forma en la membrana endosomal (Baggen et al. 2018a, Buchta et al. 2019).

Si bien el repertorio de receptores utilizados es sumamente amplio, y los diversos enterovirus pueden utilizar varias vías de entrada a la célula, muchos de los procesos que ocurren una vez que el virión ingresa a la misma son altamente conservados evolutivamente (Figura 4). Cuando el ARN viral se encuentra ya en el citosol, es traducido en una única poliproteína que será procesada proteolíticamente por las proteinasas virales 2Apro, 3Cpro, y 3CDpro en unas diez proteínas (proteínas de cápside VP0, VP1 y VP3, y proteínas de replicación 2A–2 C y 3A–3D) y algunos intermediarios estables (Baggen et al. 2018a).

La replicación del genoma tiene lugar en estructuras membranosas inducidas por el propio virus denominados Organelos de Replicación (van der Schaar et al. 2016). La síntesis de una nueva hebra es llevada a cabo por la ARN polimerasa dependiente de ARN (3Dpol), comenzando por la síntesis de una hebra negativa (con el genoma de sentido positiva que ingresó como molde) y la generación de un intermediario de replicación doble hebra de ARN.

La hebra negativa oficiará de molde para la síntesis de nuevas hebras positivas. Los nuevos ARN podrán ser tanto utilizados como molde para replications o traducciones adicionales, o ser encapsidados como nuevos viriones. El ensamblado de las proteínas estructurales VP0, VP1 y VP3 en protómeros y pentámeros favorece la formación de las cápsides. Junto al nuevo ARN viral, los pentámeros forman el provirión en un proceso que se acopla estrechamente con la replicación del ARN. Finalmente, se da de manera ARN-inducida, el procesamiento de VP0 en VP2 y VP4 para generar viriones maduros (Baggen et al. 2018a).

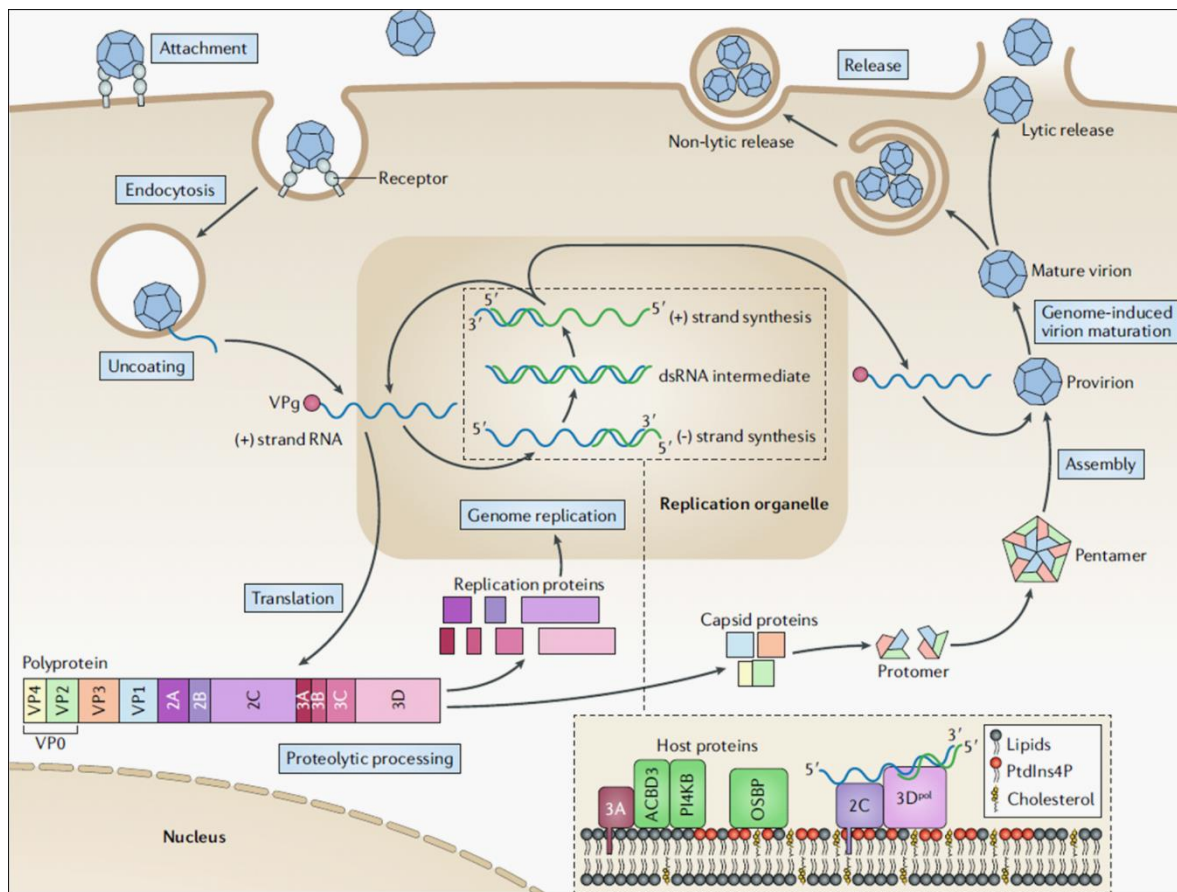


Figura 4. Esquema del ciclo replicativo de un enterovirus. La imagen fue tomada de Baggen et al. (2018a), doi: 10.1038/s41579-018-0005-4.

Además del clivaje de la poliproteína viral, las proteinasas virales 2Apro y 3Cpro clivan varias de las proteínas de la célula hospedera para optimizar la traducción, replicación y dispersión del virus, y para suprimir la respuesta celular antiviral (Wells & Coyne, 2019).

Por ejemplo, estas proteinasas virales inducen el silenciamiento del hospedero al clivar factores celulares involucrados en la transcripción y en la traducción CAP-dependiente de los mensajeros celulares, disrumpen el transporte nucleocitoplasmático (mediante clivaje de nucleoporinas), interrumpen las vías del interferón tipo I (clivando sensores de ARN y proteínas señal), y como si fuera poco, desorganizan el citoesqueleto. Todos estos procesos llevan a cambios dramáticos en la morfología celular (entiéndase producción de efecto citopático) y culminan en la muerte y lisis de la célula (Harris & Coyne, 2014; Baggen et al. 2018a) (Figura 4). Si bien clásicamente se ha entendido a los enterovirus como virus obligadamente líticos, se ha acumulado evidencia sobre la capacidad de los mismos para egresar de la célula previo a la lisis, en estructuras unidas a membrana que pueden acomodar múltiples viriones (Lai et al. 2016).

La unión del virión a un receptor celular específico determina en cierta medida el tropismo y la patogénesis. Desde la identificación del receptor para poliovirus (CD155 también conocido como PVR) en 1989 (Mendelsohn et al. 1989) se ha

generado una larga lista de receptores celulares para los distintos enterovirus, la mayoría de ellos receptores del tipo inmunoglobulinas o integrinas. Este repertorio incluye el *Scavenger B2* (SCARB2) y el *P-selectin glycoprotein ligand 1* (PSGL-1) para EV-A71, el receptor coxsackievirus-adenovirus (CAR) para los coxsackievirus tipo B, y el receptor neonatal Fc (FcRn) para echovirus, entre otros (Wells & Coyne, 2019).

La posibilidad con la que cuentan los enterovirus, de unirse a un largo repertorio de receptores distintos, provee una posible explicación para el amplio espectro de enfermedades que desencadenan. Por otro lado, no todos los receptores son capaces de dirigir la unión a la superficie celular, la internalización del virus y de iniciar la decapsidación por sí solos. Sin embargo, a menudo, un virus puede utilizar una variedad de receptores que auxilien en las distintas funciones (Kobayashi & Koike, 2020).

1.5. Mecanismos para la generación de diversidad genética

Los enterovirus humanos, como virus ARN que son, se caracterizan por poseer genomas con una gran variabilidad de secuencia, incluso cuando se consideran poblaciones tan pequeñas como ser la progenie viral de una única célula infectada (Domingo et al. 2012). Esta variabilidad, depende principalmente de dos mecanismos evolutivos distintos: la mutación y la recombinación.

Las ARN polimerasas virales de los enterovirus presentan baja fidelidad en la incorporación de nucleótidos, y además carecen de actividad exonucleasa 3' → 5' correctora de errores, por lo que propician una alta frecuencia de mutaciones durante la replicación (Ferrer-Orta et al. 2015). Esto conlleva a la generación de una progenie heterogénea denominada *quasiespecie*, compuesta por variantes relacionadas entre sí, con unos pocos cambios en relación a una única secuencia consenso (Domingo et al. 2012). Se entiende que un enterovirus no circula en la naturaleza como una entidad genética individual, sino que lo hace como una “nube” de mutantes. Estas nubes, son verdaderos reservorios de variabilidad fenotípica para la adaptación del virus ante nuevos ambientes/desafíos.

La alta tasa de incorporación errónea de nucleótidos, en genomas pequeños como el de enterovirus, con ciclos replicativos cortos, lleva a que estos sean virus que evolucionen rápidamente. Se calculó, por ejemplo, que los distintos tipos de enterovirus humanos acumulan en promedio 9×10^{-3} sustituciones por sitio por año a nivel de VP1 (Lukashev et al. 2018). Debido a que diferentes partes del genoma de enterovirus están asociadas a diferentes funciones, existe variación en la tasa evolutiva a nivel de las mismas. Por ejemplo, hay regiones no codificantes reconocidas por las subunidades ribosomales del hospedero, que son altamente conservadas (poca variabilidad), sin embargo, la región codificante de las proteínas externas de la cápside, las cuales son sujeto de presión inmune, son altamente variables (Hyypia et al. 1997).

Por otro lado, un mecanismo que constituye una gran fuerza impulsora de la evolución y que los enterovirus explotan frecuentemente, es el de la recombinación genómica (Kyriakopoulou et al. 2015, Muslin et al. 2019). Mediante este mecanismo,

fragmentos genómicos pertenecientes a dos viriones que infectaron una misma célula, son combinados para formar el genoma de un nuevo virión (Figura 5).

El carácter de frecuente de la recombinación entre los enterovirus se explica por diversas características ecológicas y biológicas propias de estos virus (revisadas por Muslin et al. 2019): co-circulación de múltiples variantes pertenecientes a las 4 especies de enterovirus durante breves periodos en áreas geográficas acotadas; posibilidad de que un mismo hospedero se infecte con múltiples variantes al mismo tiempo; posibilidad que una misma célula del hospedero se infecte con más de una única variante contenidas en vesículas lipídicas o agregados; co-localización de cepas parentales en mismos compartimentos de replicación; viabilidad de genomas recombinantes y capacidad para diseminarse en la población gracias a compatibilidades existentes entre parentales, y cierta tolerancia a alteraciones genómicas para limitar sus consecuencias negativas.

En enterovirus, la recombinación es factible, ya sea entre cepas de un mismo tipo (Huang et al. 2008, Yip et al. 2011) así como entre diferentes tipos de una misma especie (Yoke-Fun & AbuBakar, 2006; Rakoto-Andrianarivelo et al. 2008b).

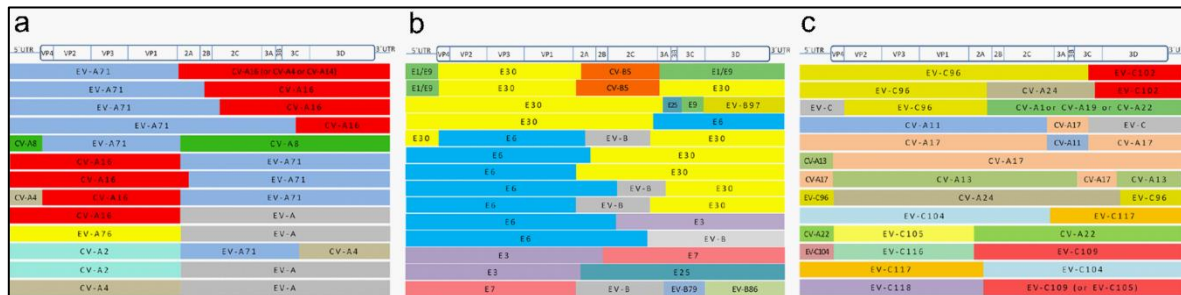


Figura 5. Representación esquemática de eventos de recombinación intertípica entre enterovirus de las especies A (a), B (b) y C (c) basada exclusivamente en secuencias de genomas completos. En cada panel se proporciona un esquema de la organización general del genoma de los enterovirus. Cada tipo dentro de una especie de enterovirus está representado por un color único. Debido a la frecuencia en los eventos de recombinación entre distintos enterovirus, se ha postulado que los genomas de estos virus son verdaderos mosaicos contruidos con fragmentos provenientes de distintos tipos. Obsérvese que, en algunas ocasiones, únicamente se pudo determinar la especie (y no el tipo) de uno de los donantes. La imagen fue tomada y modificada de Kyriakopoulou et al. (2015), doi: 10.1007/s11262-014-1152-y.

La historia macro-evolutiva de los enterovirus nos plantea que este fenómeno ha sido posible también entre tipos de especies diferentes ya que aparentemente, dos eventos de recombinación entre las especies ancestrales de las actuales, a nivel de la unión 5'UTR con la región codificante, tuvo un rol importante en la evolución de los enterovirus y explicaría por qué al analizar filogenéticamente este fragmento, encontramos dos subgrupos: uno formado por las especies C y D y otro por las especies A y B (Santti et al. 1999).

A su vez, la identificación de *hot spots* de recombinación a lo largo de los genomas de los enterovirus, ha evidenciado que la región estructural es una región prácticamente donde estos están ausentes, y que la mayoría de los puntos de recombinación ocurren en las uniones de ésta con la región 5'UTR y con la región codificante para proteínas no estructurales, en la cual encontramos múltiples puntos

de recombinación distribuidos sin ningún patrón claro, dando lugar a verdaderos mosaicos genómicos que conservan la región codificante de cápside inalterada (Figura 5). Estas observaciones nos sugieren la existencia de incompatibilidades estructurales entre las proteínas de cápside de distintos tipos, las cuales podrían dificultar el ensamblaje o la maduración del virión, o incluso la unión al receptor celular cuando los parentales emplean receptores diferentes. Por otro lado, las distintas proteínas no estructurales podrían ser intercambiables entre variantes de una misma especie (Kyriakopoulou et al. 2015, Muslin et al. 2019).

1.6. Emergencia de tipos y genotipos

En un estudio realizado por Lukashev & Vakulenko (2017) se estimó que los enterovirus humanos contemporáneos emergieron durante el último milenio. Sin embargo, aún no está totalmente claro si los nuevos tipos emergen *de novo*, o si son transferidos desde primates, los cuales son hospederos de algunos de los enterovirus de las especies A, B, C y D que aún no fueron detectados en humanos (Mombo et al. 2017).

Las estimaciones realizadas por Lukashev & Vakulenko (2017) sitúan a los ancestros comunes más recientes de los enterovirus, divergiendo apenas hace 55 a 200 años (en general hace menos de 100 años). Por otro lado, sabemos que la mayoría de los enterovirus actuales fueron aislados por primera vez en torno a la década de 1950².

Mediante análisis filogenético se ha sugerido que las poblaciones de los diferentes tipos de enterovirus humanos sufrieron cuellos de botella y extinción de linajes, que podrían haber reseteado repetidamente las edades de los ancestros comunes, generando efectos fundadores. De hecho, para los aislados contemporáneos de la mayoría de los tipos conocidos, se ha planteado que un ancestro común único (o unos pocos ancestros) existían luego del aislamiento de las cepas prototipos en la década del 1950, y que estas últimas pertenecían en su mayoría a linajes que se han extinguido (Lukashev & Vakulenko, 2017).

Estos cuellos de botella podrían estar relacionados con los ciclos anuales que ocurren en climas templados de expansión-extinción de las poblaciones virales (Pallansch et al. 2013), o también podrían deberse a los ciclos epidémicos de varios enterovirus que, se prolongan durante varios años y los cuales podrían explicarse por fluctuaciones en la inmunidad de rebaño (Khetsuriani et al. 2006, van der Sanden et al. 2010).

La interrogante es cómo los distintos tipos son capaces de experimentar regularmente estos cuellos de botella tan severos sin extinguirse completamente. Se ha propuesto un rol de reservorio de variantes a largo plazo para primates no humanos (Sadeuh-Mba et al 2014). A su vez, en base a muestreos de secuencias altamente divergentes en regiones geográficas distantes con respecto a aquellas

² Ver año de aislamiento de cepas prototipo de los diversos enterovirus: https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_online_report/positive-sense-rna-viruses/w/picornaviridae/681/genus-enterovirus. A su vez Lukashev & Vakulenko (2017) aclaran que las cepas prototipo de los enterovirus utilizados en sus análisis fueron aisladas entre los años 1948 a 1955.

desde donde proviene la mayor cantidad de información genética de los enterovirus, se ha planteado que las mismas podrían ser un acervo genético importante con un rol relevante a nivel evolutivo. Por ejemplo, en Madagascar se encontró un genogrupo de enterovirus A71 que no había sido detectado en miles de muestras analizadas provenientes de otras regiones del planeta (Bessaud et al. 2014).

Para muchos de los enterovirus humanos se ha sugerido la existencia de genotipos (diferenciación intratípica) mediante análisis filogenético (Oberste et al. 2003, Bessaud et al. 2014). Sin embargo, la diferenciación de genotipos no es siempre evidente cuando se analizan las poblaciones de los distintos tipos mediante análisis filogenético, y en algunas ocasiones se ha clasificado arbitrariamente para facilitar la descripción epidemiológica (Baillly et al. 2009).

Según Lukashev & Vakulenko (2017), para muchos enterovirus, es posible realizar una asignación de genotipos en base a un amplio criterio de 9 a 20% de identidad nucleotídica, en función del tipo considerado.

La existencia de múltiples genotipos en cada tipo, podría explicarse también por el efecto fundador y por la extinción de variantes ancestrales, tal como se ha hipotetizado para explicar la existencia de más de 100 enterovirus distintos circulando actualmente.

Aunque la recombinación se ha correlacionado con la emergencia de distintos linajes de enterovirus (que han causado grandes epidemias), y con la virulencia excepcional de algunas cepas, el mecanismo exacto, y los elementos que brindan ventajas selectivas y una mejor adaptación, aún se desconocen (Kyriakopoulou et al. 2015).

1.7. Respuesta inmune ante la infección

Una vez que ha ingresado al organismo, el virus replica en la mucosa de la orofaringe o de intestino, para luego alcanzar la sangre vía nodos linfáticos ocasionando una viremia primaria que le permitirá al virus alcanzar diversos tejidos del hospedero. Si bien la mayoría de las infecciones puede acabar en esta etapa, manifestándose como una enfermedad menor, con síntomas no específicos como dolor de garganta, fiebre y malestar, la viremia puede sostenerse y la infección expandirse hacia, por ejemplo, el sistema nervioso central, o el corazón, donde los enterovirus pueden infectar neuronas o cardiomiocitos, respectivamente (Tapparel et al 2013). Otras células blanco podrían ser las fibras musculares, adipocitos, o células epiteliales. Algunos enterovirus tienen un tropismo celular característico, aunque son muchos los que pueden causar más de un único tipo de enfermedad debido a su múltiple tropismo celular (Muehlenbachs et al. 2015). Enterovirus genéticamente muy similares entre sí, a menudo pueden asociarse con manifestaciones clínicas tan diferentes como un resfriado y una parálisis muscular, o incluso propagarse en un individuo sin generar síntoma alguno (Pallansch et al. 2013).

Una infección por enterovirus, se puede resolver mediante una adecuada respuesta del sistema inmune del hospedero, que involucre tanto el sistema inmune innato, como el adaptativo. La generación de anticuerpos es de suma importancia para combatir la infección. En tal sentido, se ha documentado que al menos el 50% de

los adultos y niños mayores poseen anticuerpos neutralizantes contra al menos 2 tipos distintos de enterovirus no polio, y que el 75 % de los adultos y niños posee anticuerpos neutralizantes para poliovirus (cuyo origen es la vacunación³) (Wallace et al. 2016, Zhu et al. 2018). Estos anticuerpos, son de suma importancia en la protección ante re exposiciones a un mismo enterovirus y explicarían por qué los neonatos y niños pequeños experimentan infecciones graves, ante la ausencia de los mismos (Zhu et al. 2018). Una vez adquiridos los anticuerpos contra un enterovirus en particular, se genera una protección contra las reinfecciones, aunque la naturaleza de la reinfección podría ser subclínica (Muehlenbachs et al. 2015).

Una vez activado el sistema inmune adaptativo, las IgM están presentes en el organismo por un periodo de 7 a 10 días, a partir del cual comienza a producirse IgG. La respuesta de anticuerpos neutralizantes (principalmente dirigidos a VP1) aparece aproximadamente a la segunda semana de haber comenzado la infección, alcanzando un máximo a las 5 semanas desde el inicio de la misma, pudiendo ser ésta de existencia prolongada (Gauntt, 1997; Dotzauer et al. 2012, Pallansch et al. 2013).

La respuesta de células B, al parecer reviste mayor importancia en el *clearance* de la infección por enterovirus en comparación con la respuesta de células T CD8+, como lo demuestra el alto requerimiento de anticuerpos para proteger contra un enterovirus que presentan los ratones *knock-out* para células B, los cuales no son capaces de resolver la infección, y en los cuales el virus se propaga en altos títulos a nivel de los distintos órganos del animal; o también la alta susceptibilidad a la infección por enterovirus que presentan aquellos pacientes con agammaglobulinemia, los cuales además pueden excretar el poliovirus vacunal de manera prolongada (hasta por 20 años) luego de la inmunización con las cepas atenuadas de la vacuna antipoliomielítica Sabin⁴ (Pallansch et al. 2013).

Si bien los anticuerpos serán los responsables principales en la resolución de una infección por enterovirus, ya sea mediante neutralización, opsonización del patógeno, o comienzo de la destrucción de células infectadas, la activación de la respuesta inmune innata reviste una gran importancia, sobre todo a nivel del intestino, y de las células infectadas de manera primaria, en lo que sería el comienzo de la eliminación del virus. Determinadas estructuras de los enterovirus (patrones moleculares asociados a patógenos, PAMPs) son reconocidas por receptores que la célula posee, denominados PRRs (receptores de reconocimiento de patrones, PRRs) los cuales son codificados en la línea germinal, e inducen al activarse, un estado antiviral como respuesta a la infección (Wells & Coyne, 2019).

Sin embargo, los enterovirus poseen varios mecanismos que les permiten evadir la inducción de ese estado antiviral en la célula. Esto lo logran, principalmente mediante el clivado de los PRRs con proteasas virales, y así impactan en las cascadas de señales que deberían darse cuando los PRRs se activan ante la presencia viral, evitando o reduciendo la inducción de interferón a nivel celular (Wells & Coyne, 2019).

³ Ver sección “1.14.2. Vacunas antipoliomielíticas”.

⁴ Ver sección “1.14.5. Derivados vacunales y epidemias”.

1.8. Métodos de detección

Desde su clasificación inicial, varios enterovirus fueron agrupados según su capacidad de producir enfermedad ya sea en humanos o en ratones lactantes. Por lo tanto, la inoculación en ratones, y la observación y registro de sus efectos, constituyó un método de detección en los inicios de la identificación de muchos tipos bien conocidos actualmente. Por ejemplo, los coxsackievirus del tipo A fueron caracterizados por producir parálisis flácida en ratones recién nacidos, mientras que los del tipo B generaban parálisis espástica. Sin embargo, los echovirus, se caracterizaban por no desarrollar enfermedad alguna en este sistema biológico (Hyypia et al. 1997). A su vez, el aislamiento en líneas celulares, así como los ensayos basados en serología, constituyeron herramientas muy útiles para la detección, y estudio (incluyendo el descubrimiento) de un gran número de serotipos de enterovirus humanos (Dalldorf & Sickles, 1948; Committee on the ECHO Viruses, 1955). Sin embargo, métodos como los *tests* de seroneutralización serían reemplazados más adelante por métodos moleculares como la RT-PCR, y la secuenciación de regiones genómicas tanto con fines de detección, como de tipificación mediante análisis filogenético de regiones genómicas informativas (Arola et al. 1996, Oberste et al. 1999b, 2000).

Si bien actualmente se considera que el diagnóstico de enterovirus debería recaer lo menos posible en el aislamiento en cultivo de células, (a excepción de poliovirus) debido a que esta técnica es trabajosa, se obtiene un resultado muchas veces luego de varios días, y además se necesita de varios tipos celulares para abarcar la posibilidad de crecimiento de un gran número de enterovirus, o incluso varios pasajes, el aislamiento en líneas celulares, tiene un potencial uso en investigación, como en desarrollo y evaluación de nuevas herramientas diagnósticas (Harvala et al 2018). A su vez, cuando se quiere conocer la capacidad infectiva de los enterovirus contenidos en muestras ambientales, como por ejemplo concentrados provenientes de muestras de agua residual, es necesario inocularlos en un sistema biológico y evaluar la infección experimentalmente. Esto sucede porque, a diferencia de la obtención de una muestra biológica desde un paciente que excreta normalmente enterovirus viables, en el ambiente, los virus podrían haber perdido su capacidad infectiva, principalmente por las condiciones adversas que pueden llegar a plantearse en matrices como pueden ser aguas residuales, o aguas contaminadas con estas, o incluso, simplemente cursos naturales de agua (Reynolds, 2004, Amdiouni et al. 2012).

Por lo tanto, muchos abordajes de virología ambiental, utilizan el aislamiento de enterovirus desde las muestras, o sus concentrados, para demostrar la viabilidad del virus detectado y el potencial riesgo para quien entre en contacto con la matriz ambiental en estudio, entendiendo que por sí sola la detección de genomas (o fragmentos de estos) en el ambiente, brinda un conocimiento limitado acerca de la dispersión de los virus una vez que son excretados por el hospedero (Masachessi et al. 2021). No obstante, la utilización de aislamiento en cultivo de células, utilizado como un método inicial de diagnóstico, introduce un sesgo hacia la detección de aquellos enterovirus que son capaces de infectar y replicar en el tipo de célula que

estamos utilizando (Faleye et al. 2016). Por lo tanto, al tratarse por ejemplo las aguas residuales, de una matriz con una alta concentración de tipos diferentes de enterovirus (Majumdar et al. 2018a), la utilización de aislamiento como método inicial de detección, no permitirá obtener un panorama amplio acerca de la diversidad de enterovirus que cada muestra contiene.

Si bien los métodos serológicos como las pruebas de ELISA, o los test de neutralización fueron de gran importancia durante muchos años para la identificación y diferenciación intratípica de poliovirus, así también como para la tipificación de enterovirus no polio (World Health Organization, 2004), actualmente se considera una técnica obsoleta para estos fines. En particular, el gran número de serotipos de enterovirus no polio, tornaba poco práctica su identificación mediante test de neutralización individuales, por lo tanto, se utilizaba un *pool* de antisueros y un esquema que permitía la identificación, principalmente, de echovirus y coxsackievirus del tipo B, luego de realizar 9 *tests*, los cuales se interpretaban mediante una lista de patrones de neutralización (World Health Organization, 2004). Por otro lado, hay que considerar que los ELISAS de IgG o IgM presentan una utilidad clínica limitada debido a la reactividad cruzada de antígenos entre serotipos, y, además, al existir una alta prevalencia de anticuerpos para enterovirus en la población, debido a exposiciones previas, el testeo serológico carece muchas veces de especificidad clínica (Harvala et al. 2018). Sin embargo, los ensayos de neutralización y de ELISA, revisten utilidad para cuantificar anticuerpos, por lo que son útiles en estudios de seroprevalencia para un serotipo en particular (Zhu et al. 2018, Puenpa et al. 2020, Kim et al. 2021).

Actualmente, los métodos moleculares constituyen probablemente la opción más ampliamente utilizada para la vigilancia de enterovirus, ya sea directamente desde el espécimen, o luego de realizar aislamiento en cultivo de células (Sousa et al. 2017, Benschop et al. 2021, Nkosi et al. 2021, Yoon et al. 2021). Existen sin embargo algunas consideraciones que deben ser mencionadas.

Para la detección y diferenciación intratípica de poliovirus, existe una batería de RT-PCRs diseñadas y aplicables según el algoritmo de la Organización Mundial de la Salud (OMS), a aislados en células RD⁵ y L20B⁶ (Figura 6), que permite tanto la tipificación de polio, como también diferenciar entre aislados del tipo Sabin, *Wild-type*, o incluso si se trata de derivados vacunales. Actualmente esta batería ha evolucionado a una serie de PCRs en tiempo real (Kilpatrick et al. 2009, 2014, Polio Eradication Initiative, 2020), evitando las PCR a tiempo final y la visualización de resultados en gel de poliacrilamida, que se realizaba anteriormente (World Health Organization, 2004). No obstante, la secuenciación del segmento codificante de VP1 en su extensión completa es requisito para poder identificar cabalmente el poliovirus en cuestión, y se han desarrollado múltiples combinaciones de cebadores para este fin (Kilpatrick et al. 2011).

⁵ Células RD: línea celular de Rhabdomyosarcoma humano, sensible a poliovirus y a muchos otros enterovirus.

⁶ Células L20B: línea celular derivada de célula L de ratón transfectada con receptores para poliovirus que soporta selectivamente el crecimiento de poliovirus y de apenas unos pocos enterovirus.

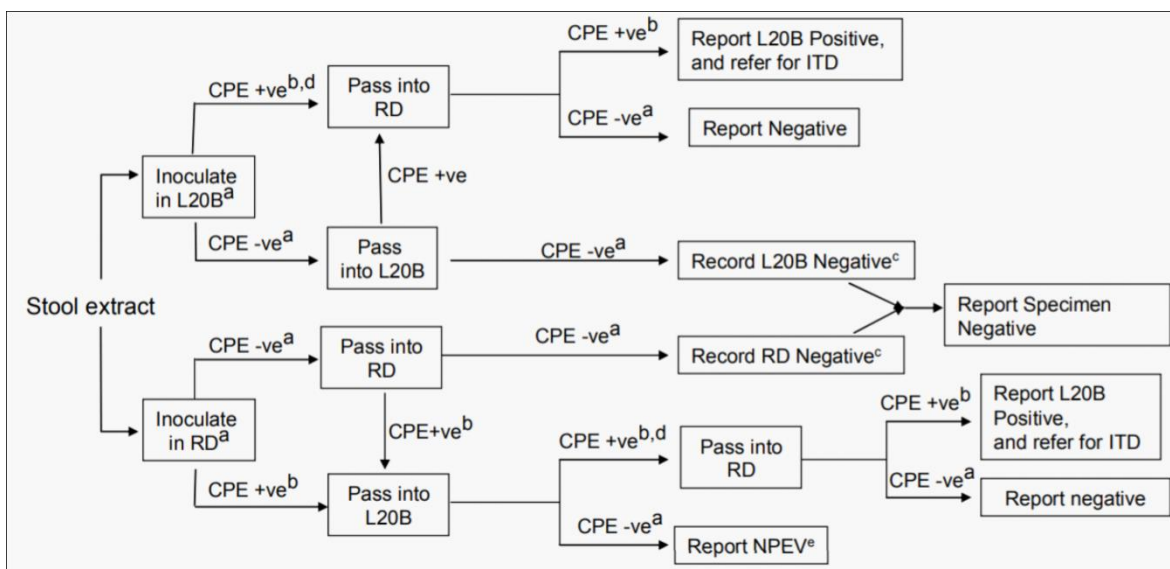


Figura 6. Algoritmo de análisis de muestras de materia fecal obtenidas de pacientes con parálisis flácida aguda (AFP) recomendado por la Organización Mundial de la Salud para el aislamiento y caracterización de poliovirus. El algoritmo se basa en la inoculación inicial de la muestra del paciente en cultivos de células RD y células L20B, y en subsiguientes pasajes en ambos tipos de células dependiendo de si se evidencia o no efecto citopático, así como en la diferenciación intratípica (ITD) de aquellos aislados que presuntamente sean poliovirus.

CPE: Efecto citopático; -ve: negativo; +ve: positivo; NPEV: enterovirus no polio.

a) Observación por un mínimo de 5 días.

b) Observación hasta un score de CPE mayor a 3 (usualmente 1 a 2 días, 5 días máximo; re-inocular si se contamina o se observa toxicidad).

c) Mínima observación total de 10 días (2 x 5 días).

d) Generar un *pool* de tubos positivos (si ambos tubos muestran CPE con *score* > 3 en un mismo día) antes del pasaje final en células RD.

e) Los aislados pueden ser serotipados por laboratorios con un interés particular en el diagnóstico de NPEV o para confirmar competencia.

La imagen fue tomada de "Supplement to the WHO Polio Laboratory Manual An alternative test algorithm for poliovirus isolation and characterization", desde <https://polioeradication.org/wp-content/uploads/2017/05/NewAlgorithmForPoliovirusIsolationSupplement1.pdf>

En cuanto a la detección de enterovirus no polio, los métodos de RT-PCR con 5'UTR como blanco de amplificación, han demostrado ser métodos sensibles, específicos y rápidos, que por lo general detectan un amplio espectro de tipos en una misma reacción al estar dirigidos a una región altamente conservada en el genoma de enterovirus, por lo que a menudo se los utiliza como métodos para el *screening* inicial de muestras en el laboratorio (Nijhuis et al. 2002, Iturriza-Gómara et al. 2006, Oberste et al. 2010).

Sin embargo, la asignación de tipos dentro de las especies recae en el análisis de regiones distintas a 5'UTR, especialmente en la codificante para VP1, para la cual se ha visto que la divergencia de su secuencia correlaciona con propiedades serológicas (también válido para VP2 o VP3, pero VP4 falla para la especie B por lo que su uso debería evitarse). La obtención de la secuencia parcial o completa del gen de VP1 se ha convertido en el método *gold standard* para la tipificación de enterovirus, y se han desarrollado numerosos métodos para obtener dichas

secuencias (Oberste et al. 1999a, 1999b, World Health Organization, 2015). En la medida que estos sean ampliamente reactivos ante la gran diversidad de enterovirus humanos que existen, mayor será la ventaja de aplicarlos directamente sobre el espécimen en estudio. Aunque como será detallado más adelante, las muestras ambientales, al ser complejas mezclas de numerosos serotipos, requieren esfuerzos experimentales extras para desentrañar dicha diversidad.

Uno de los métodos de tipificación ampliamente utilizados a nivel de los laboratorios dedicados al estudio de enterovirus, es el diseñado por Nix et al. en 2006 (Figura 7), el cual además ha sido incorporado a las recomendaciones de la OMS y los Centros para el Control y Prevención de las Enfermedades de Estados Unidos (CDC), para la vigilancia de enterovirus en soporte a la *Polio Eradication Initiative* (World Health Organization, 2015). El mismo consiste en una RT-*seminested* PCR con cebadores que fueron diseñados mediante la estrategia CODEHOP (de *Consensus-Degenerate Hybrid Oligonucleotide Primer*). Estos cebadores fueron diseñados para una amplia especificidad de tipos y fueron probados contra numerosos aislados, incluyendo cepas prototipo de 64 enterovirus, cepas referencia de 22 enterovirus nuevos propuestos y 87 aislados clínicos (Nix et al. 2006).

Tanto el diagnóstico de una enfermedad aguda, la investigación de un brote, o la vigilancia, van a requerir la obtención de una muestra biológica para la tipificación del enterovirus en cuestión. El tipo de espécimen biológico desde el cual se realiza la detección de enterovirus, depende en gran medida de las manifestaciones clínicas, e incluye la posibilidad de heces, líquido cefalorraquídeo (LCR), aspirados nasofaríngeos, o *swabs* nasofaríngeos, fluido vesicular, lavado broncoalveolar, sangre, *swabs* de conjuntiva ocular, biopsias, y orina (Harvala et al. 2018).

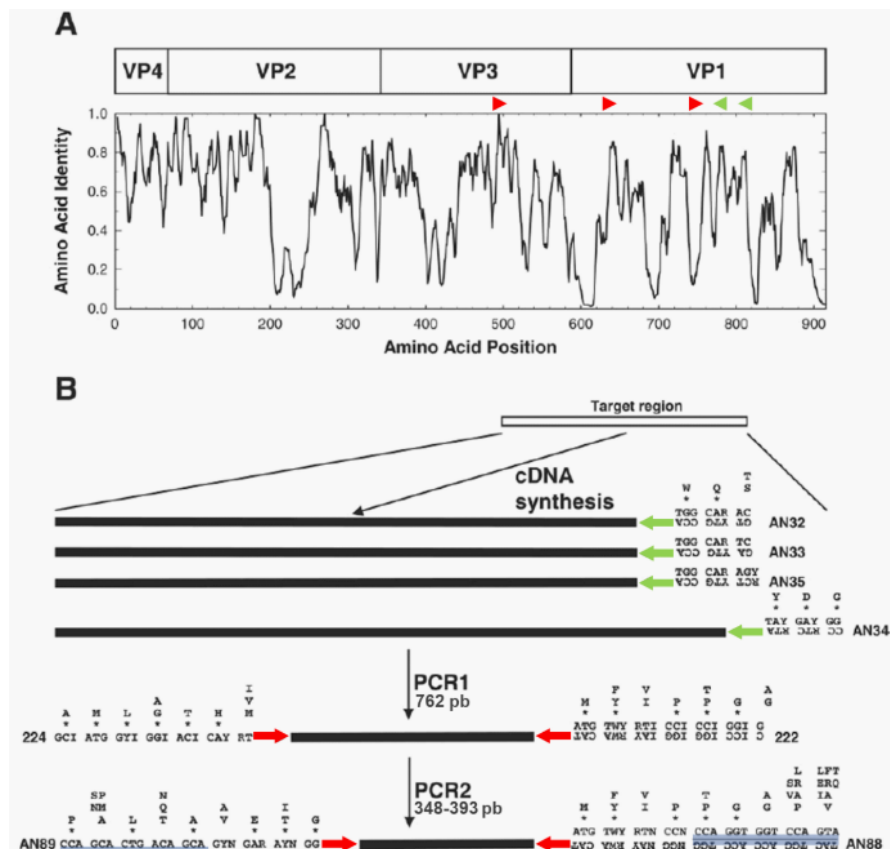


Figura 7. Estrategia propuesta por Nix et al. (2006) para la amplificación de un segmento codificante de la cápside de enterovirus. En A) se indica con flechas verdes la ubicación de los cebadores utilizados para la síntesis de ADN copia a partir del ARN viral (retrotranscripción) sobre la región codificante de VP1, y con flechas rojas la ubicación de los cebadores de la *semi-nested* PCR sobre las regiones codificantes de VP3 y VP1. A su vez se muestra un gráfico de identidad para las 900 posiciones aminoacídicas de la cápside de enterovirus (compuesta por las proteínas VP4, VP2, VP3 y VP1) obtenido a partir del alineamiento de secuencias de 64 cepas prototipo de enterovirus.

En B) se muestran las secuencias de los cuatro cebadores utilizados en la retrotranscripción (AN32, AN33, AN34 y AN35) hibridando en dos regiones distintas de VP1 (verde) así como las secuencias (y reversos complementarios) de los cebadores utilizados en las PCR 1 y 2 de la *semi-nested* PCR (rojo). Los cebadores 224/222 generan un fragmento de 762 pb durante la PCR 1 y los cebadores AN89/AN88 generan un fragmento de entre 348 y 393 pb (dependiendo del enterovirus amplificado) en una segunda PCR. Los cebadores AN89 y AN88 son híbridos entre una región consenso no degenerada (subrayada en gris) y una región consenso degenerada, y resultan de la utilización de la estrategia de diseño de cebadores denominada CODEHOP⁷: *Consensus Degenerate Hybrid Oligonucleotide Primer*. Se muestran los motivos de aminoácidos conservado que se utilizaron para el diseño de cada cebador. Los asteriscos indican que el residuo que aparece sobre el mismo se encuentra presente en dicha posición en al menos el 90% de las cepas prototipo utilizadas; cuando un único residuo aparece, el mismo está presente en todas las cepas prototipo utilizadas. La imagen fue tomada y modificada de Nix et al. (2006), doi: 10.1128/JCM.00542-06.

⁷ Los cebadores CODEHOP contienen una región consenso degenerada, de 9 a 12 bases en su porción 3', que fue diseñada a partir de motivos conservados en el alineamiento de aminoácidos de posibles blancos. La porción 5' del cebador CODEHOP comprende una región-abrazadera consenso no-degenerada de 15 a 25 bases. La región degenerada permite una amplia especificidad de target mientras que la región-abrazadera (no degenerada) incrementa la estabilidad de la dupla cebador-molde, permitiendo el uso de temperaturas de *annealing* superiores y la consecuente reducción de amplificaciones inespecíficas (Nix et al. 2006).

1.9. Enterovirus humanos en la región sudamericana

Sudamérica es una región que presenta notorias disparidades entre sus países, en cuanto a la relevancia que revisten los enterovirus humanos para los sistemas de vigilancia epidemiológica de salud pública. Sin embargo, todos presentan una característica en común: desde al menos el año 1994, cuando la región de las Américas fue declarada libre de circulación de virus polio salvaje, ninguno de estos países ha reportado casos de parálisis por alguno de los tres serotipos salvajes (Pedreira et al. 2017).

La vigilancia de poliovirus a partir de la notificación obligatoria de los casos de AFP se lleva adelante en toda Sudamérica, aunque los distintos sistemas nacionales de vigilancia presentan sensibilidades muchas veces sub óptimas (Falleiros-Arlant et al. 2020). A su vez, también las meningitis asépticas y encefalitis son enfermedades de notificación obligatoria en varios países (Cisterna et al. 2007, Leguizamón et al. 2017, Ramalho et al. 2019, Peñata et al. 2020). Sin embargo, estudios que contribuyan a comprender las dinámicas de circulación para la gran diversidad de enterovirus que existen, no son frecuentes en la región.

Brasil y Argentina han sido los grandes generadores de información acerca de la circulación de enterovirus humanos en Sudamérica, pero en la mayoría de los demás países, o no existen reportes de enterovirus, o estos se han limitado al reporte de casos esporádicos de interés, o al estudio de brotes, especialmente de enfermedades que involucran afectación del sistema nervioso.

En consonancia con la falta de estudios relacionados a enterovirus en nuestra región geográfica, existe una sub representación de la información de secuencias generadas desde nuestros países en el *pool* de secuencias globales (Figura 8), y por supuesto que la misma es fuertemente influenciada por aquellas variantes que circulan en Brasil. Un estudio realizado por Lukashev et al. en 2018 identificó que del total de secuencias nucleotídicas de enterovirus provenientes de Sudamérica y disponibles en GenBank, un 48% representa a Brasil.

Este país se interesó de manera relativamente temprana en comparación con otros países de la región por el rol de los enterovirus en los casos de meningitis ocurridos en su territorio (Nery-Guimarães et al. 1981). Aunque fue más recientemente cuando comenzaron a publicarse reportes de brotes de esta enfermedad, en distintas regiones del país, los cuales fueron atribuidos a echovirus 9, echovirus 6, echovirus 30, o echovirus 13 (Kmetzsch et al. 2006, Luchs et al. 2008, Pinto Junior et al. 2009).

Adicionalmente, algunos estudios han analizado la diversidad de enterovirus en casos esporádicos y provenientes de distintos brotes de meningitis aséptica (y en menor número de encefalitis) ocurridos en distintas regiones de Brasil durante periodos más prolongados que los estudios anteriores, describiendo la presencia de varios tipos involucrados (Tabla 1).

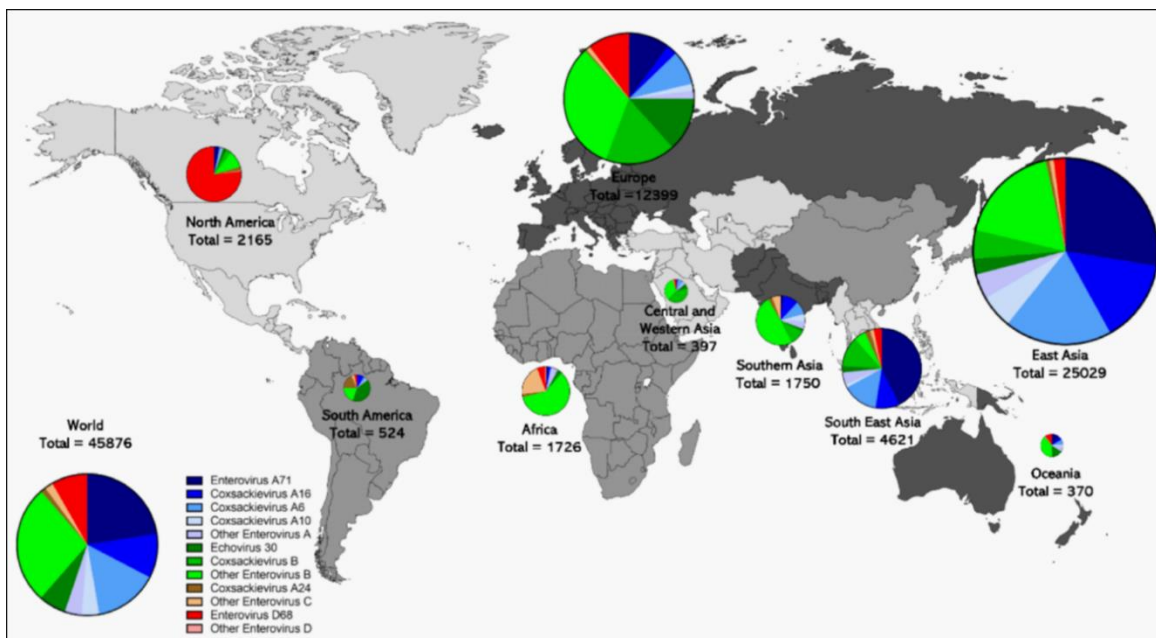


Figura 8. Distribución geográfica del registro de secuencias genómicas de enterovirus no-polio. El origen de las secuencias de enterovirus no-polio de la especie A (azul), B (verde), C (marrón) y D (rojo) reportadas entre 2000 y 2018 muestra distintos patrones de distribución a lo largo de las nueve regiones geográficas del planeta (mostradas en distintos tonos de gris). El tamaño de los gráficos circulares es proporcional a la raíz cuadrada del total de secuencias de cada grupo. Las secuencias provenientes de América del Sur representan apenas un 1,14% de las secuencias reportadas mundialmente, observándose un predominio de secuencias de la especie B. La imagen fue tomada de Brown et al. (2020), doi:10.3390/microorganisms8121856.

Además, cuando se examina la bibliografía científica generada desde los comienzos de la investigación sobre enterovirus en Brasil, se comprende que ha existido siempre una motivación principalmente por el estudio de las parálisis, tanto durante los años en que poliovirus era el agente causal más importante asociado a las mismas, como en las etapas finales de la erradicación global del virus, cuando otros enterovirus han emergido como causa de éstas. Además, una vez erradicado el polio salvaje en Brasil, hubo varios estudios analizando casos de parálisis asociadas a la inmunización con la vacuna preparada con cepas atenuadas Sabin (Friedrich et al. 1995a, 1995b, 1996).

En la medida en que los casos de poliomiелitis fueron disminuyendo en Brasil, el interés en torno a otros enterovirus que generaban cuadros con sintomatología de AFP, fue creciendo. En 1990 se publica la primera evidencia en el país sobre la circulación de enterovirus A71 a partir del estudio de 28 sueros obtenidos de pacientes con síntomas de parálisis evaluados para la presencia de anticuerpos seroneutralizantes contra la cepa prototipo de EV-A71. Nueve de 28 muestras (32%) fueron positivas para el virus. Las edades de estos pacientes oscilaban entre 3 y 28 años y los mismos provenían de cuatro regiones geográficas distintas (da Silva et al. 1990). A su vez, se reportaría el estudio de sueros tomados de 92 niños con sospecha de poliomiелitis y síntomas de AFP durante 1989-1990 en 8 regiones de Brasil, entre los cuales 20 resultarían positivos para EV-A71 mediante ensayo de seroneutralización, 6 de ellos con parálisis residual después de 60 días de haber

comenzado el cuadro clínico (da Silva et al. 1996). Ambos estudios sugirieron la dispersión de enterovirus A71 a nivel de todo Brasil.

Tabla 1. Principales estudios realizados en Brasil sobre el rol de enterovirus humanos en casos esporádicos y brotes de meningitis aséptica y encefalitis

Enfermedad	Periodo	Estado/Región	Tipo de muestras	Casos estudiados	Porcentaje de detección	Tipos detectados	Referencia
Meningitis aséptica	1997-2000	Bahía	LCR-Heces	112	38%	E4,E9 CVB2,B3,B6 EV-A71	Silva et al. 2002
	1998-2003	Varios Estados	LCR	1022	16%	E30 (80%) E1,E4 E6,E13,E18,E25 CVB5	Dos Santos et al. 2006
	1998-2008	Varios Estados	LCR	3186	9,4%	E30 (60%)	Dos Santos et al. 2011
	2004-2014	San Pablo	LCR/heces	824*	16%	E4,E6 E7,E9,E11, E13,E14,E18,E21,E30 ,CVA9 CVB1-B5	Campagnoli Carmona et al. 2020
	2013-2017	Regiones Noreste, Sudeste y Sur	LCR	2659	11,4%	E30 (34%) E6 (31%), CVB5 (9%), E3,E7,E9, E11,E13,E14,E15,E18 ,E21,E25 CVB1-B4 CVA9 EVA71	Ramalho et al. 2019
Encefalitis	2003-2004	Ribeirao Preto (San Pablo)	LCR	89	11%	Sin datos	Mendoza et al. 2007
	2004-2014	San Pablo	LCR/heces	173	11%	CVB5 E6,E9,E11, E13,E18,E30	Campagnoli Carmona et al. 2020
	2012-2013	San Pablo, Acre, Amazonas, Bahía, Ceará, Maranhao, Pará, Paraná	LCR	500	1,4%	Sin datos	Ferreira et al. 2019
	2013-2017	Paraná (Curitiba)	LCR	270	18%	Sin datos	Valle et al. 2020

* Este número de muestras comprende también muestras obtenidas de 51 casos de meningoencefalitis, encefalitis, y otras enfermedades del CNS, además de las meningitis asépticas.

También se realizó un estudio con 426 pacientes menores de 15 años de edad provenientes de San Pablo y Brasilia, que presentaron enfermedad neurológica aguda (AND por *Acute Neurologic Disease*) en el periodo 1988-1990, aislándose EV-A71 en 24 casos, entre los cuales 6 exhibieron deficiencias motoras residuales cuando fueron examinados a los 6 meses de inicio del cuadro clínico. También se detectó la presencia del virus en 15 contactos de un total de 427 contactos seguidos a 165 pacientes (Takimoto et al. 1998).

En el periodo 1998-2000, se colectaron muestras de heces de 44 pacientes afectados por AFP en la región norte de Brasil, constatando la presencia de EV-A71 en un caso ocurrido en Pará en 1999. Se logró obtener una secuencia nucleotídica de un fragmento genómico de interés y mediante análisis filogenético la cepa se clasificó como genogrupo B. A su vez, se estudiaron 389 muestras de suero colectadas entre 1998 y 2001, de individuos entre 0 y 15 años de la ciudad de Belém, Estado de Pará, de las cuales 57% mostró tener anticuerpos neutralizantes para enterovirus A71, sin embargo, apenas el 20% de los niños menores de 3 años tenían anticuerpos para el virus, demostrando una alta susceptibilidad a la infección en esa franja etaria (Castro et al. 2005).

En el año 2010 se publicó un trabajo (Luchs et al. 2010) en el cual se estudiaron sueros obtenidos entre 1999 y 2005 de 442 individuos de todas las edades, con sospecha de infección por enterovirus en el Estado de San Pablo. Se reportó una baja tasa de protección para enterovirus A71 en las muestras estudiadas, al detectar anticuerpos neutralizantes apenas en el 12% de las muestras. A su vez, se observó una diferencia en la seropositividad en función del origen geográfico de la muestra, con un mayor porcentaje de muestras con anticuerpos para enterovirus A71 en municipalidades localizadas por fuera (17%) del área metropolitana (8,7%), las cuales por lo general no contaban con una alta cobertura de saneamiento y acceso a agua potable, a diferencia de ésta.

Recientemente, desde el Laboratorio de Enterovirus del Instituto Oswaldo Cruz de Río de Janeiro, se han publicado resultados de la vigilancia epidemiológica de las AFP realizada durante un periodo de 12 años (2005-2017), con una amplia cobertura geográfica de Brasil (Sousa et al. 2017, 2020)

Sousa et al. (2017), reportaron 5.463 casos de AFP en el periodo 2005-2014, entre los cuales el 48% correspondía a individuos menores de 5 años de edad. La tasa de notificación de AFP presentó valores aceptables para las diferentes regiones geográficas estudiadas (entre 1,0 y 1,4). Se identificó la presencia de poliovirus relacionados a la vacuna atenuada Sabin en el 1,7% de los casos (19% *Sabin like 1*, 14% *Sabin like 2*, 31% *Sabin like 3*, y el porcentaje restante mezclas de serotipos), mientras que se aislaron enterovirus no polio en el 6,4% de las muestras, mostrando valores siempre por encima de 5% en cada año considerado (en 2008 el porcentaje de identificación de enterovirus no polio en casos de AFP mostró un máximo de 8,9%).

Cuando se analizan los casos de AFP vinculados a enterovirus no polio en el periodo 2005-2017 (6.707 casos, para los cuales hubo aislamiento de enterovirus no polio en el 5,3% de estos), se identificaron 341 aislados distintos de las especies A (29,3%), B (57,5%) y C (13,2%), detectándose 13, 27 y 6 tipos, respectivamente. Entre los tipos más frecuentemente detectados se identificó a CVA2 (4,7%) y EV-A71 (7,6%) para la especie A, echovirus 6 (7,3%) y echovirus 11 (6,7%) para la especie B, y CVA13 (5%) y enterovirus C99 (3,8%) para la especie C. Otros serotipos comunes fueron CVA4, CVB3, CVB5 y echovirus 7, los cuales sumados a los anteriores contabilizaron el 51,6% de los casos (Sousa et al. 2020).

Más allá de las afecciones del sistema nervioso relacionadas con los enterovirus, Brasil ha sido afectado en varias oportunidades por epidemias de conjuntivitis, que han sido asociadas a la circulación de coxsackievirus A24 variante y a enterovirus

D70. Estas epidemias han afectado a cientos de miles de brasileiros, de todas las regiones geográficas del Brasil (Santos et al. 1987, Waldman et al. 1990, Moura et al. 2006, Tavares et al. 2006, 2011; Sousa et al. 2019).

Por otro lado, en 2009 se realizaría el primer reporte en Brasil de casos de enfermedad respiratoria aguda severa asociados a enterovirus D68. Esta primera descripción fue en el marco de la vigilancia epidemiológica realizada durante la pandemia de Influenza de 2009 e involucró a dos niños de 2 meses y 4 años de edad de Salvador de Bahía, de los cuales se obtuvo hisopado nasofaríngeo durante la consulta médica. Ambos cuadros se resolvieron al cabo de algunas semanas, pero la sintomatología requirió internación en unidades pediátricas de cuidado intensivo (Carney et al. 2015). Años más tarde, en un estudio realizado con 11.922 muestras obtenidas en 2018 en el marco de la vigilancia de infecciones respiratorias severas agudas (SARI por *severe acute respiratory infections*) y de enfermedades del tipo influenza (ILI por *influenza-like illness*) en el Estado de Paraná, se detectó enterovirus D68 en 36 muestras, constando mediante secuenciación y análisis filogenético la presencia en el país del linaje B3 (Raboni et al. 2020), un linaje genético con historial de circulación asociado a brotes de mielitis en Estados Unidos y Europa durante 2016.

Particularmente, en Argentina se han publicado varios estudios analizando el rol de echovirus 30 en casos esporádicos y brotes de meningitis asépticas reportados en distintas provincias del país. En 2002, Palacios et al. (2002), realizan el estudio filogenético de echovirus 30 aislados durante dos brotes ocurridos en una ciudad de la Provincia de Buenos Aires y en la ciudad de Mendoza (Provincia de Mendoza) en 1997 y 1998, respectivamente, y proponen una clasificación para este virus en dos genotipos (I y II), en base al análisis filogenético, integrando secuencias de aislados a nivel global.

Años más tarde, también se analizarían 79 echovirus 30 aislados en células RD a partir de muestras de LCR, heces, y exudado de garganta, colectadas durante brotes y casos esporádicos reportados en el periodo 1998-2012 en distintas provincias de Argentina durante la vigilancia epidemiológica de casos sospechosos de meningitis que el Instituto Malbrán realiza (Lema et al. 2019). El estudio filogenético de los aislados argentinos, permitió clasificarlos como cepas de los linajes E (circulando en 1998 y en 2001, durante 2003-2004, en 2008, y durante 2011-2012) y F (circulando en 1998 y durante 2001-2007). Adicionalmente, cepas reportadas en Brasil también agruparon con secuencias de estos dos linajes.

Sin embargo, un estudio realizado en la Provincia de Córdoba, a partir de 168 muestras de LCR colectadas en el periodo 2007-2008 desde pacientes hospitalizados debido a cuadros clínicos con sospecha de infección del sistema nervioso central, detectó enterovirus en aproximadamente el 8% de las muestras, entre las cuales el 80% correspondía a cepas del linaje H de echovirus 30. También se detectó la presencia de CVA9 y CVB4 en apenas una muestra (Farías et al. 2011).

Más allá de la importancia que echovirus 30 ha demostrado tener a nivel nacional, se han registrado brotes de meningitis también ocasionados por echovirus 4, los cuales fueron reportados en 1996 en Tucumán (Freire et al. 2003) y en 2005 en Misiones (Grenón et al. 2008).

Si bien la información generada durante estos estudios es de suma relevancia, en general éstos estuvieron acotados a un enterovirus en particular, ya sea por interés del grupo de investigadores, o por tratarse del estudio de un brote ocasionado por un único serotipo. No obstante, hay dos estudios que lograron describir la presencia de más de 30 enterovirus en Argentina, mediante el estudio de muestras clínicas obtenidas de pacientes con distinta sintomatología de infección viral en el sistema nervioso central, en los periodos comprendidos entre 1991 a 1998 (Cisterna et al. 2007) y 1998 a 2003 (Mistchenko et al. 2006), abarcando gran parte del territorio nacional argentino.

Cisterna et al. (2007) estudiaron 2.167 muestras obtenidas de pacientes con AFP, meningitis aséptica, y encefalitis, mediante aislamiento en cultivo celular y detección por PCR. Detectaron un total de 28 tipos de enterovirus no polio en el 19,5% de los pacientes con AFP (130/666) y poliovirus Sabin en el 5,4% (36/666). Con respecto a las meningitis, los enterovirus fueron detectados en el 28,8% de las muestras estudiadas (231/801), constando la presencia de echovirus 4, 9, 17 y 30 en casos asociados a brotes, y de coxsackievirus A2, B2, B5, echovirus 7, 11, 24, 29 y enterovirus A71 en casos esporádicos. Se detectó la presencia de enterovirus en el 3% (21/700) de las muestras obtenidas de pacientes con encefalitis, reportándose la presencia de echovirus 4, 7 y 24.

Más allá de la descripción de la diversidad de tipos involucrados en la casuística de enfermedades neurológicas de origen viral, se realizaron aportes a la epidemiología de las mismas, por ejemplo, se estableció un patrón de estacionalidad para las meningitis, ya que se observó un aumento de casos durante el verano y el otoño, así como también la ausencia de dicho patrón para las encefalitis y parálisis. A su vez, se estableció que las infecciones por enterovirus en la Argentina afectan fundamentalmente a la población infantil.

Considerando todas las muestras positivas para enterovirus no polio efectivamente tipificadas (162/382), la especie B representó el 93,4% de los casos tipificados, la especie C el 5,4% y la especie A el 1,2%. Desafortunadamente, las secuencias nucleotídicas obtenidas durante este estudio no se encuentran disponibles públicamente.

Por otro lado, el estudio realizado por Mistchenko et al. (2006) involucró 1.242 muestras de LCR obtenido de individuos menores de 15 años con sospecha de infección del sistema nervioso central, provenientes de la ciudad de Buenos Aires y localidades cercanas. Los cuadros clínicos estudiados fueron meningitis asépticas, encefalitis, convulsiones febriles, enfermedad neonatal enteroviral, fiebre infantil, encefalomiелitis aguda diseminada, y AFP. La caracterización de enterovirus fue realizada mediante RT-PCR y secuenciación de un fragmento codificante de VP1 directamente desde el ARN obtenido del LCR (PCR específica para la especie B). Se detectó enterovirus en el 27% de las muestras (335/1.242), con una amplia variación del porcentaje de positividad, en función del año considerado.

Los cuadros de meningitis aséptica fueron los más frecuentemente asociados a enterovirus (72,5%), seguidos por las encefalitis (7,5%). A diferencia de lo observado en el estudio de Cisterna et al. (2007), se detectó enterovirus en apenas un caso entre los 30 considerados de AFP, el cual fue tipificado como echovirus 33.

La especie B correspondió al 34,6% de los casos positivos (116/335), y el análisis filogenético de aproximadamente el 50% de los casos tipificados como especie B permitió constatar la presencia de echovirus 30 en el 35% de las muestras (21/60) y echovirus 9 en el 16,6% (10/60) seguidos por menores porcentajes de echovirus 2, 5, 7, 14, 18, 33, coxsackievirus B2, B3, B4 y B6.

Basados en el incremento en el número de casos positivos durante los meses de primavera y verano, los autores sugirieron un patrón de estacionalidad en la detección de enterovirus para la ciudad de Buenos Aires.

A principios del año 2017 se publicó un trabajo en la revista Archivos Argentinos de Pediatría (Pérez et al. 2017), el cual reportaba un incremento inusual de casos de mielitis a partir de la primera semana de abril de 2016, al constatar que 10 niños de 4 años de edad en promedio, de la Provincia de Buenos Aires y de la Ciudad Autónoma de Buenos Aires, sin relación entre ellos, presentaban parálisis flácida asimétrica de aparición repentina con involucramiento de uno o ambos miembros y MRI (Imagen por Resonancia Magnética) mostrando signos de mielitis longitudinal con involucramiento de la materia gris del asta anterior (además de otros signos y ausencia de características definidas como criterio de exclusión). La mayoría de los niños (8/10) cursó una infección respiratoria dentro de los 10 días previos al comienzo de la parálisis.

El análisis virológico demostró la presencia de EV-D68 en 4 individuos (en 3 niños el virus fue detectado en secreciones nasofaríngeas y en 1 niño en secreciones nasofaríngeas y LCR).

Cuatro pacientes requirieron admisión en la Unidad de Cuidados Intensivos, y todos ellos experimentaron parálisis residual en los miembros afectados. Este fue considerado el primer brote en Argentina y en América Latina de mielitis asociada a EV-D68 (Ruggieri et al. 2017).

También en el periodo abril-agosto de 2016, fueron reportados 6 casos adicionales de mielitis en otro hospital de niños de Buenos Aires, con una presentación de síntomas neurológicos precedidos de cuadro respiratorio y afectando niños entre 1 y 5 años de edad. A partir del estudio de muestras de heces y de hisopado nasofaríngeo se obtuvo un resultado positivo para EV-D68 mediante RT-PCR en 4 y 2 pacientes, respectivamente. El análisis filogenético permitió constatar la presencia del clado B3 circulando en Argentina. La mitad de los individuos afectados requirió admisión en la unidad de cuidados intensivos, y todos presentaron secuelas a nivel neurológico (Carballo et al. 2019).

Con respecto a los casos de AFP asociados a poliovirus luego de declarada la erradicación en el continente americano, la Argentina ha reportado parálisis con detección de VDPV⁸ (por *Vaccine Derived Polio Virus*) en al menos 3 ocasiones.

En 1998 se reportó un caso de poliomielitis en un niño de 3 años con hipogammaglobulinemia, sin historial de vacunación anti polio, desde el cual se aisló a partir de una muestra de heces, un poliovirus con 97,2% de similitud con la cepa Sabin 1. Este caso habría sido el primer reporte de una parálisis asociada a una VDPV en América Latina continental (Hidalgo et al. 2003).

⁸ Ver sección "1.14.5. Derivados vacunales y epidemias".

En abril de 2009, un niño de 15 meses de edad con agammaglobulinemia, que había recibido tres dosis de la vacuna atenuada Sabin durante su primer mes de vida, desarrolló un cuadro de AFP. Se aislaron iVDPVs del tipo 1 durante el análisis de dos muestras seriadas de heces, y las mismas fueron 3,6% y 3,8% divergentes con respecto a la cepa Sabin. El testeo de 87 contactos no identificó VDPV adicionales (Centers for Disease Control and Prevention, 2009).

En 2018, un caso de AFP fue reportado en una niña de 9 meses con diagnóstico de agammaglobulinemia, y con historial de 2 dosis de IPV (*Inactivated Poliovirus Vaccine*) y 1 dosis de bOPV (*bivalent Oral Poliovirus Vaccine*) en noviembre de 2017. En noviembre de 2018 se aisló una iVDPV⁹ del tipo 3 (1,4% de divergencia con cepa atenuada Sabin) a partir de una muestra de heces. En agosto de 2019 se procedió a realizar un nuevo aislamiento a partir de una muestra de heces, y el mismo fue 2,9% divergente con respecto a la cepa atenuada Sabin (Macklin et al. 2020).

1.10. Enterovirus humanos en Uruguay

En Uruguay, el conocimiento que se ha generado sobre los enterovirus humanos es escaso (Salamano et al. 2009). La legislación sanitaria indica la notificación obligatoria de casos sospechosos de meningitis, encefalitis y meningoencefalitis virales, así como de poliomiелitis ocurridos en todo el territorio nacional en un plazo no mayor a 24 horas desde que se toma conocimiento. A su vez, exige la notificación obligatoria de toda sospecha de brote (registro de dos o más casos de una situación en un período de hasta 7 días) en un plazo no mayor a 24 horas¹⁰. Ello, potencialmente sería útil para detectar la presencia de muchos de los enterovirus, ya que es común que causen estos eventos.

Sin embargo, si bien en Uruguay existen directrices para la notificación y estudio de estas enfermedades¹¹, no existe un relevamiento sistemático sobre el rol de los distintos enterovirus que causan estas enfermedades en nuestro país. Hasta el momento, por ejemplo, no se conoce públicamente cuáles enterovirus son responsables de las AFP que ocurren en Uruguay.

La información sobre los distintos tipos que circulan en el país proviene de tesis de grado y posgrado de la Facultad de Ciencias y del Programa de Desarrollo de las Ciencias Básicas (PEDECIBA) de la Universidad de la República, y en menor medida de algunas publicaciones en revistas médicas locales.

Salamano et al. (2009) estudiaron muestras de LCR mediante PCR para conocer la presencia de enterovirus humanos en casos de encefalitis y meningitis víricas en una población de adultos (n=34) y niños (n=25) que requirieron asistencia en

⁹ Ver sección “1.14.5. Derivados vacunales y epidemias”.

¹⁰ Decreto Nacional 41/012 (Ministerio de Salud Pública, Uruguay), actualizando el Código Nacional sobre Enfermedades y Eventos Sanitarios de Notificación Obligatoria (aprobado por Decreto 64/004): <https://www.impo.com.uy/bases/decretos-originales/41-2012>

¹¹ Guía Nacional de Vigilancia y Control de Enfermedades y Eventos Sanitarios de Notificación Obligatoria. Ministerio de Salud Pública, División Epidemiología, Departamento de Vigilancia en Salud (2015): https://www.gub.uy/ministerio-salud-publica/sites/ministerio-salud-publica/files/documentos/publicaciones/GUIA_VIGILANCIA_2015_enviada_ago2016%20%281%29.pdf

distintas instituciones médicas de Montevideo en el periodo 2001-2006. Los autores encontraron a enterovirus como la causa principal de meningitis víricas tanto en la población que estudiaron de adultos como en la de niños, sin embargo, con respecto a las encefalitis, los enterovirus fueron una causa relativamente menor en comparación con algunos herpes virus como el herpes simple 1, citomegalovirus, y varicela-zóster virus. Si bien utilizaron RT-PCR dirigidas a distintas regiones del genoma viral, no realizaron secuenciación de los fragmentos amplificados para su tipificación.

Un estudio realizado en el marco de una tesis de grado de la Licenciatura en Ciencias Biológicas de la Facultad de Ciencias de la Universidad de la República, a partir de 209 muestras de LCR de niños de hasta 15 años de edad admitidos en un hospital de Montevideo con cuadros de meningitis/encefalitis durante 2011, detectó la presencia de enterovirus en 33 de estas muestras mediante una PCR dirigida a la región 5'UTR. El 64% de los casos positivos ocurrió en menores de 1 año de edad, el 21% en la franja etaria de 1 a 4 años, el 3% en niños de 5 a 9 años, y el 12% de los casos ocurrió en niños de entre 9 y 15 años. A su vez, se evidenció un claro patrón de estacionalidad, con el mayor número de casos positivos en verano, y decreciendo a medida que transcurrían las distintas estaciones del año (Chacón, 2012).

Por otro lado, también en el marco de una tesis de dicha Licenciatura, se estudiaron 177 muestras de LCR obtenido de pacientes con posible cuadro de neuro virosis, admitidos en un hospital de niños ubicado en Montevideo en el periodo 2010-2014, que inicialmente fueron positivas para una PCR dirigida a la 5'UTR de enterovirus. Sin embargo, luego de varias etapas de aislamiento en cultivo de células y amplificación mediante distintas combinaciones de cebadores dirigidos a la región codificante de VP1, fue posible realizar la tipificación de 18 casos mediante secuenciación y análisis filogenético. Se evidenció la presencia de distintos tipos de la especie B: E3, E5, E6, E13, E18, CVB1, CVB3 y CVB5 en 2012 (12 casos), E11 y CVB1 en 2013 (5 casos) y E11 en 2014 (1 caso). La mayoría de estos casos correspondieron a pacientes menores de 1 años de edad (14/18) (Hernández, 2014).

Además, en el marco de una tesis de Maestría en Ciencias Biológicas del PEDECIBA (Recarey, 2011) fue posible tipificar mediante amplificación, secuenciación y análisis filogenético de un fragmento parcial del segmento codificante de VP1, unas 7 muestras de LCR (de un total de 18) obtenidas de niños menores de 15 años hospitalizados por encefalitis/meningitis en una institución de salud de Montevideo en el periodo 2005-2010. En 2005 fueron detectados E4 y CVB2, en 2006 CVB4, en 2007 CVA9, y en 2010 E11 y E14.

A estos estudios, se le suman algunos reportes de casos clínicos que se han documentado desde el ámbito médico en revistas de carácter local.

Si consideramos estos estudios en su conjunto, podemos decir que, en Uruguay, apenas se ha reportado la presencia de 8 echovirus (E3, E4, E5, E6, E11, E13, E14, E18) y 6 coxsackievirus (CVA9, CVB1, CVB2, CVB3, CVB4 y CVB5); lo cual sin duda significa un conocimiento limitado sobre la diversidad genética de los tipos que circulan en la población. A la fecha de inicio del proyecto de doctorado que dio lugar

a esta tesis, una búsqueda en GenBank utilizando los términos “enterovirus” + “Uruguay” devolvía 9 *hits* de secuencias nucleotídicas parciales.

1.11. Enterovirus en el ambiente

Considerando que un gramo de materia fecal humana puede contener hasta 6,5 log₁₀ TCD₅₀ de enterovirus, la presencia de estos virus en las diversas matrices acuáticas en las que frecuentemente son detectados, es prácticamente consecuencia de su abundante concentración en las aguas residuales domésticas (Melnick & Rennick, 1980; Bosch et al. 2008). El flujo del agua residual doméstica (tratada o no) hacia los cursos naturales de agua ya sea como práctica para su disposición final o resultado de fugas accidentales de los sistemas colectores del saneamiento, asegura la presencia de enterovirus en ríos, lagunas, arroyos e incluso en océanos. A su vez, distintas secreciones humanas (Centers for Disease Control and Prevention, 2021a), principalmente las nasofaríngeas, pueden contribuir a la presencia de enterovirus humanos en estas matrices acuáticas si su descarte se realiza mediante el saneamiento doméstico.

Distintos estudios documentan concentraciones de enterovirus en agua residual que superan ampliamente los 10 millones de partículas virales por litro (La Rosa et al. 2010, Qiu et al. 2015, Bisseux et al. 2018, Majumdar et al. 2018a, Kiulia et al. 2021). Incluso se ha demostrado que muchas de estas partículas son infectivas, mediante su inoculación y aislamiento en cultivo de células (Qiu et al. 2015, Majumdar et al. 2018a), por lo que la ingesta de las mismas por parte de individuos susceptibles, podría favorecer la continuidad de ciclos de infección desde el ambiente (La Rosa et al. 2012, Battistone et al. 2014a).

En un artículo publicado en *Annual Reviews of Microbiology* en el año 1996 titulado “*My role in the discovery and classification of the Enteroviruses*”, Joseph Melnick describía a los enterovirus como agentes resistentes a todos los antibióticos conocidos y agentes quimioterapéuticos, los cuales no eran inactivados fácilmente por desinfectantes como el alcohol, fenol y compuestos de amonio cuaternario. A su vez, describía que los enterovirus no eran afectados por el éter ni por el desoxicolato, y tampoco por muchos detergentes que destruían arbovirus, ortomixovirus, o paramixovirus. En cambio, le confería eficacia al tratamiento con soluciones de formaldehído, ácido clorhídrico, o cloro libre, como también a la exposición de viriones a temperaturas superiores a los 50°C (Melnick, 1996). A su vez, hoy sabemos que los enterovirus son inactivados por luz ultravioleta, especialmente cuando se irradian superficies. También el secado de superficies disminuye el título viral, y tanto la porosidad de la superficie, como la presencia de materia orgánica, son factores que afectan la degradación de los enterovirus (Pallansch et al. 2013).

Las características descritas anteriormente dan cuenta de cuán resistentes son los enterovirus a los distintos tratamientos químicos y físicos, lo cual sin duda se relaciona con la potencial resistencia que estos virus pueden presentar en las diversas matrices ambientales desde donde se los ha detectado, incluso en aquellos efluentes de aguas residuales que fueron sometidas a distintos procesos de desinfección en plantas de tratamiento (La Rosa et al. 2010, Qiu et al. 2015).

El estudio de enterovirus humanos en el ambiente se ha desarrollado en torno a tres necesidades: por un lado, se los ha utilizado como indicador en procesos de tratamiento y desinfección de aguas residuales (Simhon et al. 2019), así como de residuos sólidos provenientes del saneamiento y sus enmiendas higienizadas (Monpoeho et al. 2004). A su vez, algunas normativas de calidad ambiental, utilizan los niveles de concentración de enterovirus humanos como parámetro microbiológico para clasificar la inocuidad de determinados tipos de muestras^{12, 13}, o incluso algunas herramientas de *Quantitative Microbial Risk Assessment* estiman el riesgo de infección/enfermedad que conllevan determinadas actividades que el ser humano realiza y en las cuales se encuentra expuesto a enterovirus (Lodder et al. 2015, Moazeni et al. 2017).

Sin embargo, el estudio de enterovirus en el agua residual, con el ánimo de conocer de manera indirecta cuáles son los tipos que circulan en la población que circunda los puntos de colecta, ante la falta de mecanismos de vigilancia y reporte desde el ámbito médico/clínico, o incluso como complemento a la información que se obtiene desde este ámbito, es quizá el abordaje más extendido (Richter et al. 2011, Apostol et al. 2012, Monge et al. 2018, Tiwari & Dhole, 2018).

Considerando que gran parte de las infecciones causadas por los enterovirus humanos resultan asintomáticas o subclínicas, y que incluso muchas veces estas son de rápida resolución sin que requieran consulta médica, la vigilancia clínica provee de una visión parcial acerca de la diversidad de enterovirus que circula en una comunidad. Esta visión estará sesgada probablemente hacia aquellos tipos que causan enfermedades más graves, como las AFP, las meningitis asépticas o las encefalitis. Por lo tanto, estudiando las variantes que están presentes en el agua residual, se puede obtener una perspectiva más amplia sobre la circulación de los diferentes enterovirus presentes en una comunidad (*wastewater-based epidemiology*); incluso es posible constatar la circulación silenciosa de algunas variantes, es decir, detectarlas antes de que se reporten casos de enfermedad asociados a estas en una comunidad (Hovi et al. 2007).

Si bien los abordajes de *wastewater-based epidemiology* permiten generar un conocimiento más profundo sobre la diversidad de enterovirus que circulan en una población en comparación con lo reportado desde casos sintomáticos durante la consulta médica (Figura 9), es difícil establecer el modo en que esas variantes están impactando en la salud de la comunidad. A su vez, si bien en muchos casos se ha documentado una correspondencia entre los tipos detectados en el ambiente y en pacientes en un mismo marco temporal, esta correspondencia no siempre es tan

¹² Resolución N° 375 del 29 de agosto de 2006. Conselho Nacional do Meio Ambiente. Ministério do Meio Ambiente. República Federativa do Brasil. Disponible desde: https://incaper.es.gov.br/Media/incaper/PDF/legislacao_biosolido/res_conama37506-1.pdf

¹³ Code for Federal Regulations. Title 40. Protection of Environment. Chapter I – Environmental Protection Agency (continued). Subchapter O- Sewage Sludge. PART 503—STANDARDS FOR THE USE OR DISPOSAL OF SEWAGE SLUDGE. Disponible desde: <https://www.govinfo.gov/content/pkg/CFR-2018-title40-vol32/xml/CFR-2018-title40-vol32-part503.xml>, conjuntamente con el manual guía para el Control of Pathogens and Vector Attraction in Sewage Sludge, (Environmental Regulations and Technologies, United States Environmental Protection Agency, USEPA), disponible desde: https://www.epa.gov/sites/default/files/2015-04/documents/control_of_pathogens_and_vector_attraction_in_sewage_sludge_july_2003.pdf

clara y existen diversos factores que podrían alterarla (Monge et al. 2018, Ivanova et al. 2019).

La detección en agua residual de una variante cuya circulación en una comunidad no había sido descrita anteriormente (Majumdar & Martin, 2018, Majumdar et al. 2021), puede constituir una alerta temprana a los prestadores de salud, así como un importante aviso a las autoridades de salud pública, a los efectos de enfocar acciones de prevención o preparar los servicios de salud antes de que ocurran brotes o casos esporádicos.

El aumento en el interés del estudio del agua residual con fines epidemiológicos, data de los años 80, cuando se comenzó a desarrollar la vigilancia de poliovirus en el ambiente como un complemento al estudio de brotes de parálisis en distintas poblaciones. Hovi et al. (2012) comentan distintas experiencias en las cuales la vigilancia ambiental fue crucial; se trata de los brotes de Finlandia (1984), Israel (1988) y Holanda (1992), aunque los antecedentes de búsqueda del virus polio en el agua residual durante brotes, ya era una práctica conocida antes de los años 80 (Melnick, 1947).

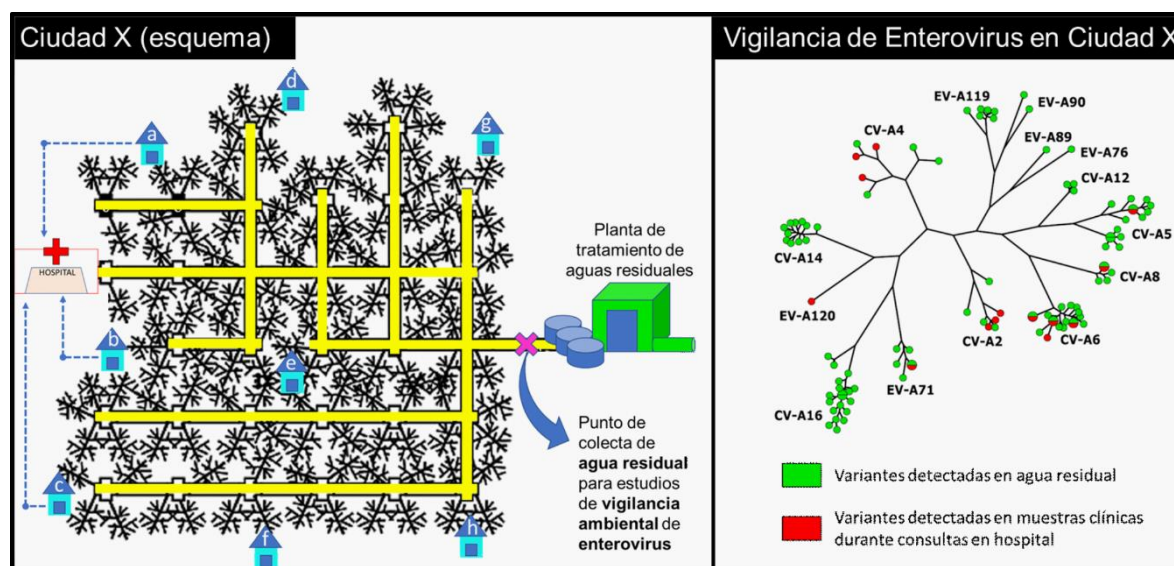


Figura 9. Complemento de la vigilancia ambiental y clínica. En el panel de la izquierda se observa el esquema de una ciudad ficticia (Ciudad X) donde se muestra la red de saneamiento (tramos largos amarillos con ramificaciones negras cuyos extremos representan conexiones a hogares) y sólo se muestran los hogares (a-h) donde hay personas cursando infecciones por enterovirus, así como el hospital y la planta de tratamiento de aguas residuales de la ciudad. Una cruz rosa indica el punto de colecta de aguas residuales desde donde se obtienen las muestras para la vigilancia ambiental de enterovirus. Solamente los individuos que habitan los hogares a, b y c concurren al hospital debido a los síntomas presentados. En el panel de la derecha, se muestra el análisis de las variantes de distintos enterovirus detectados mediante la vigilancia clínica (a partir de individuos que concurren al hospital), así como mediante la vigilancia ambiental (a partir del estudio del agua residual generada por toda la población). Nótese que la mayoría de los enterovirus detectados fueron evidenciados desde la vigilancia ambiental, e integrando esta información con la obtenida de la vigilancia clínica, se obtiene una visión más amplia sobre la circulación de enterovirus en la ciudad X. La imagen del panel izquierdo fue tomada y modificada de Hovi et al. (2012), doi: 10.1017/S095026881000316X y la imagen del panel derecho fue tomada de Bisseux et al. (2020), doi: 10.1016/j.watres.2019.115246.

En Finlandia, luego del reporte de un caso de parálisis por poliovirus 3 y excreción del virus por parte de contactos cercanos al caso índice, hacia fines de 1984, se demostró mediante el análisis de aguas residuales colectadas a lo largo de todo el país, que la variante epidémica se había dispersado ampliamente por Finlandia sin que hubiera otros casos de parálisis identificados al momento. En Israel, en 1987-1988, ante un brote de parálisis por poliovirus 1 con casos en distintas partes de su territorio, se implementó un programa de vigilancia ambiental a nivel nacional, y se detectó la presencia del virus en 6 de 197 muestras, las cuales incluían sitios en donde no se habían registrado casos de parálisis. La experiencia holandesa, resulta más interesante aún. En 1992-1993 se detectó un brote de poliomiелitis en un grupo minoritario que rechazaba la vacunación por razones religiosas. Aunque no se detectaron casos de parálisis o excreción de virus en la mayoría de la población inmunizada, se detectó poliovirus 3 en 23 muestras de un total de 269 colectadas en 120 sitios distribuidos a lo largo de todo el país. Sin embargo, el virus se recuperó en aquellas muestras que provenían de villas principalmente habitadas por quienes se oponían a la vacunación, pero no en donde mayoritariamente residía la población inmunizada. Incluso, poliovirus 3 se detectó en muestras de agua residual doméstica colectada unas semanas antes de que se registrara el primer caso de parálisis en esa misma región. Hoy en día, considerando la potencial erradicación global del poliovirus, la vigilancia ambiental de este patógeno lejos está de agotarse. Con la intensificación de la vigilancia ambiental de enterovirus ha aumentado el conocimiento que tenemos sobre la circulación de muchos tipos. Incluso, se ha observado que, aunque la presencia de ciertos enterovirus no se evidencia comúnmente durante el estudio de casos clínicos en una población, estos están ampliamente diseminados en el agua residual que la misma genera y son fácilmente detectables (Harvala et al. 2014, Bisseux et al. 2020).

1.12. Vigilancia ambiental de enterovirus humanos en América del Sur

Un análisis de la bibliografía que describe la presencia de enterovirus humanos no polio en matrices ambientales de América del Sur, nos permitirá constatar que prácticamente todos los estudios que se han publicado han sido llevados a cabo en Argentina y Brasil. De hecho, en la mayoría de estos la detección de enterovirus se realiza con la finalidad de identificar signos de contaminación humana en cursos naturales de agua (Vecchia et al. 2012a, Maurer et al. 2015, Masachessi et al. 2018), reportando incluso altos niveles de detección de enterovirus con capacidad infectiva, planteando un riesgo de infección para quienes entran en contacto con estos cursos de agua (Masachessi et al. 2018, 2021), o también con la finalidad de evaluar el funcionamiento de plantas de tratamiento de aguas residuales para la remoción de estos (Vecchia et al. 2012b, Hachich et al. 2013), o para explorar el grado de contaminación por enterovirus en aguas de irrigación de cultivos de hojas verdes producidos para consumo humano (Prez et al. 2018, Werneck et al. 2019). Sin embargo, abordajes de virología ambiental que contribuyan al conocimiento de la diversidad de los enterovirus humanos que circulan en las comunidades fueron desarrollados en la región sudamericana principalmente por el Instituto de Virología Dr. JM Vanella de la Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad Nacional de

Córdoba, mediante el estudio de aguas residuales, y aguas de cursos naturales que reciben descargas de éstas en la ciudad de Córdoba (Farías et al. 2018, 2019); y por el Instituto Malbrán de Buenos Aires a partir del estudio de muestras de agua provenientes del Riachuelo y del Río de la Plata (Cisterna et al. 2008).

En el periodo comprendido entre 2013 y 2014, se estudiaron muestras del afluente de una planta de tratamiento de aguas residuales que recibe los efluentes domésticos de aproximadamente el 60% de la población de Córdoba (1.330.023 habitantes en 2010). También se incluyeron en este estudio muestras de agua del río Xanaes, colectadas durante 2012 en su trayecto localizado a 45 km de la ciudad de Córdoba al pasar por una pequeña ciudad de unos 13 mil habitantes. La detección de enterovirus se realizó mediante RT-PCR dirigida hacia la región codificante de VP1 directamente aplicada al ARN viral extraído desde los concentrados de agua residual, y los productos de PCR fueron secuenciados mediante el método de Sanger y analizados filogenéticamente (Farías et al. 2018). El 59% de las muestras de agua residual y el 21% de las muestras de agua de río Xanaes fueron positivas para enterovirus. Fue posible secuenciar aproximadamente el 70% de las muestras de agua residual y el 17% de las muestras de agua de río que habían sido positivas. Se evidenció la presencia de E14 (35%), CVA9 (20%), E6 (15%), E16 (10%), y en menor medida los tipos E20, E25, E13, y CVA24.

A su vez, estos datos fueron incorporados en una vigilancia ambiental más prolongada, y realizada de manera similar a la anterior, que abarcó el periodo 2009-2014 (Farías et al. 2019), y mediante la cual se pudo evidenciar la frecuente detección también de E6 (28%), E14 (17%), E16 (14%), CVA9 (11%), E20 (9%) y CVA24 (6%) durante todo el periodo. Otros tipos detectados en menor proporción fueron E7, E13, E21, E25, y CVB4, los cuales representaron un 14% del total.

Esta información complementó lo que se sabía previamente acerca de la circulación de algunos tipos en Córdoba mediante el estudio de casos de meningitis, que habían sido asociados principalmente a E30, CVA9, y CVB4 (Farías et al. 2011), ampliando el conocimiento acerca de la diversidad de enterovirus que circulan en la población cordobesa.

Por otro lado, en el estudio realizado por Cisterna et al. (2008), se colectaron 57 muestras de agua (2 litros cada una) en distintos puntos del recorrido del Riachuelo (n=30) en la ciudad de Buenos Aires, y en el Río de la Plata (n=27) entre octubre de 2005 y febrero de 2006. Los enterovirus fueron detectados directamente desde los concentrados virales mediante RT-PCR, y mediante aislamiento en sistema de células RD y L20B, para luego realizar secuenciación de VP1 y análisis filogenético para la tipificación de las muestras positivas. En el Riachuelo, todas las muestras fueron positivas para enterovirus y se reportó la detección de echovirus 6, 7, 11 y 19, coxsackievirus B1, B3 y B5, y poliovirus vacunal Sabin 2 y 3. En cambio, 55% de las muestras del Río de la Plata resultaron positivas para la presencia de enterovirus, reportándose apenas los tipos echovirus 6 y 19.

1.13. Vigilancia ambiental de enterovirus humanos mediante *next-generation sequencing*

El estudio de enterovirus en el ambiente, ha estado ampliamente favorecido por la vigilancia ambiental de poliovirus, y en cierta medida, el aumento en el conocimiento que tenemos sobre la circulación de diversos tipos es un subproducto de dicha actividad.

Son varios los enterovirus no polio que pueden infectar y replicarse en una de las líneas celulares (células RD) que los laboratorios de la GPLN utilizan para el aislamiento de poliovirus en muestras ambientales (World Health Organization, 2004). Por ello, la OMS emplea un algoritmo analítico de aislados virales, que permite identificar mediante métodos moleculares si se trata de un poliovirus, o de otro enterovirus (Kilpatrick et al. 2009; World Health Organization, 2015), lo cual posibilita además la tipificación de los enterovirus no polio, si el laboratorio que realiza la vigilancia tiene interés en ello. Por lo tanto, muchos estudios enfocados en la vigilancia de poliovirus, caracterizan la diversidad de enterovirus más allá de la circulación de polio (Adeniji et al. 2014, Battistone et al. 2014b, Wang et al. 2014). Debido a que las muestras de agua residual son representativas de un gran número de excretores en una población, a menudo constituyen una compleja matriz, donde coexisten numerosas variantes de un mismo tipo, variantes de tipos distintos, e incluso variantes de tipos de especies virales distintas (Tao et al. 2016, Majumdar et al. 2018a). Esto ha llevado a que el algoritmo de estudio de las muestras de aguas residuales, proponga realizar varias réplicas de aislamiento, en distintas líneas celulares, a partir de fracciones de volumen del concentrado viral original, para maximizar la posibilidad de crecimiento de las distintas variantes que están presentes en esa muestra (Global Polio Eradication Initiative, 2015). Ello introduce un trabajo y costos extras al momento de estudiar las aguas residuales, pero posibilita que mediante secuenciación por el método de Sanger sea posible discernir la presencia de más de una única variante por muestra, y así obtener un conocimiento más cercano a la diversidad viral real en el ambiente. Este abordaje cuenta con una dificultad inherente a la utilización de líneas celulares para la detección de enterovirus, ya que se ha demostrado que las líneas más utilizadas y recomendadas para el aislamiento de poliovirus, favorecen el crecimiento de unos enterovirus sobre otros, e incluso hay enterovirus para los cuales aún no existen líneas celulares en las que se los pueda aislar (Pallansch et al. 2013, Faleye & Adeniji, 2015).

Numerosos estudios han realizado la detección de enterovirus en muestras de agua, mediante la amplificación de fragmentos informativos en el genoma de estos virus utilizando RT-PCR directamente sobre los concentrados obtenidos a partir de dichas muestras (Chen et al. 2008, Hsu et al. 2008, Harvala et al. 2014, Farías et al. 2019). Pero, esto también acarrea la desventaja de la necesidad de clonar el amplicón en un vector y seleccionar un determinado número de clones para secuenciar mediante el método de Sanger, si se desea identificar más de una variante por muestra (Apostol et al. 2012, Connell et al. 2012).

La gran diversidad de tipos dentro de las distintas especies virales de enterovirus humanos, plantea un desafío también al momento de realizar su detección mediante

métodos de RT-PCR. En general se ha optado por la aplicación de métodos cuyos cebadores hibridan con una amplia variedad de tipos, y la tipificación es posible luego mediante secuenciación del fragmento amplificado y su análisis filogenético. Se han diseñado métodos cuyo blanco son todos los miembros de una misma especie (Bessaud et al. 2016, Chen et al. 2020), o incluso todos los miembros de las cuatro especies virales (Nix et al. 2006, Joffret et al. 2018, Majumdar et al. 2018a). Aunque también se utilizan métodos diseñados específicamente para la detección y/ o caracterización de un único tipo, cuando el interés recae exclusivamente sobre este y no sobre una categoría más amplia (Kanbayashi et al. 2017, Volle et al. 2020). Sin embargo, en lo relacionado a la vigilancia ambiental de enterovirus, por lo general se procura obtener una descripción lo más amplia posible de la diversidad circulante -entendiendo que ésta será posiblemente una aproximación de la existente realmente- por lo que aquellas estrategias que logren amplificar varios enterovirus mediante la utilización de apenas un juego, o pocos juegos de cebadores, probablemente sean las más utilizadas.

Con el advenimiento de las herramientas de *next-generation sequencing* se abrió un abanico de posibilidades para estudiar en profundidad la diversidad de secuencias contenidas en un único amplicón. Mediante una tecnología de secuenciación diferente a la diseñada por Sanger, era posible ahora obtener cientos de miles de secuencias, que representaban de manera más fidedigna la diversidad contenida en la muestra original que se había sometido a estudio (Figura 10), superando la observación permitida por la secuenciación mediante el método de Sanger, de apenas aquellas variantes más abundantes contenidas en una muestra. Sin embargo, inicialmente los estudios basados en *next-generation sequencing* de muestras ambientales, estuvieron enfocados en la capacidad de obtención de secuencias completas de genomas de poliovirus presentes en las mismas, y su validez como complemento/reemplazo de las metodologías tradicionales empleadas en la vigilancia ambiental que la GPLN realiza. Un ejemplo claro fue el estudio realizado por Furtak et al. (2016), el cual se basó en la secuenciación profunda del ARN total extraído de muestras de agua residual. En el mismo, se evidenció la necesidad de enriquecer las muestras de alguna manera para poder discernir cuáles enterovirus estaban presentes en la amplia diversidad de virus provenientes tanto de humanos, como de otros animales y plantas, que se encuentran en este tipo de matriz ambiental. Para ello se utilizó, no sólo el aislamiento en líneas celulares específicas para polio y algunos enterovirus, sino también, el enriquecimiento de poliovirus mediante inmunoprecipitación, demostrando que estos abordajes tenían gran capacidad para identificar los tipos de virus polio presentes en las muestras, pero brindaban poca información sobre la diversidad de enterovirus no polio que co-circulaba, cuando se secuenciaba el *target* enriquecido.

A inicios de 2018 se publicó un protocolo de amplificación de genomas completos de enterovirus para *next-generation sequencing* a partir de sobrenadantes de células RD y L20B inoculadas con concentrados de agua residual provenientes de Londres (Majumdar et al. 2018b). El mismo permitió identificar hasta 6 tipos distintos por muestra, entre ellos poliovirus. La secuenciación de los genomas polio permitió diferenciar distintas cepas del tipo Sabin en una misma muestra, así como el mapeo

de mutaciones de reversión de atenuación, y la existencia de un recombinante inter-tipos PV1/PV3. Es de destacar que las secuencias de VP1 de todos los aislados de poliovirus determinadas por *next-generation sequencing* fueron idénticas a las obtenidas mediante secuenciación Sanger. A mediados de 2018, un estudio similar propuso un protocolo de amplificación de dos fragmentos solapantes que cubrirían la extensión completa del genoma de los miembros de las 4 especies virales de enterovirus humanos, para luego ser secuenciados mediante *next-generation sequencing* y determinar mezclas de serotipos en una misma muestra. Este método se evaluó con sobrenadantes de células RD inoculadas con concentrados de agua residual provenientes de Madagascar, posibilitando la detección de entre 2 a 5 tipos por muestra (Joffret et al. 2018). Más tarde, este método se utilizó para descifrar la diversidad de enterovirus contenida en sobrenadantes de células RD que habían sido inoculadas con concentrados de agua residual colectados en Rumania durante 2015-2016, mostrando, que al menos un tercio de las muestras contenía dos o más enterovirus distintos (entre 2 a 5 enterovirus por muestra) (Baicus et al. 2020).

Sin embargo, ya en 2017 se había publicado un trabajo utilizando *next-generation sequencing* de regiones informativas del genoma de enterovirus amplificadas directamente desde el concentrado viral, sin que este sea inoculado en cultivo celular. En el mismo, investigadores de la Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos, analizaron de manera retrospectiva, muestras de agua residual colectadas mensualmente en el periodo comprendido entre marzo de 2010 y febrero de 2011, en dos plantas de tratamiento de aguas residuales del Estado de Ohio. Para ello amplificaron regiones codificantes de VP4 y VP1 mediante dos RT-PCRs distintas y secuenciaron mediante tecnología de 454 GS FLX de Roche, obteniendo entre aproximadamente 5.000 y 24.000 *reads* por muestra, que luego de ser filtrados según determinados parámetros de calidad, permitieron identificar un total de 85 enterovirus distintos (Brinkman et al. 2017).

En 2018, se publicaron dos estudios en los cuales, productos de RT-PCR de cápside completa amplificados con cebadores pan-enterovirus, directamente desde los concentrados de agua residual y desde sobrenadantes de células RD inoculadas con estos, fueron sometidos a *next-generation sequencing*. Se analizaron muestras de agua residual proveniente de distintos países (Escocia, Inglaterra, Pakistán y Senegal), y se detectaron entre 9 (Escocia) y 60 (Pakistán) enterovirus distintos por muestra. Sin embargo, luego de inocular las muestras en células RD, apenas fue posible identificar 14 tipos de un total de 93 identificados directamente desde los concentrados de agua residual (Majumdar et al. 2018a, Majumdar & Martin 2018).

Recientemente, este abordaje se utilizó para estudiar la diversidad de enterovirus no polio contenida en 8 muestras colectadas desde cursos naturales de agua contaminados por efluentes de agua residual doméstica de Nigeria, que habían mostrado previamente ser negativas para el aislamiento de poliovirus y positivas para enterovirus-no polio mediante la utilización del algoritmo de testeo de muestras de agua residual para la vigilancia de poliovirus recomendado por la OMS. El estudio permitió detectar entre 2 y 21 enterovirus por muestra y reportó la presencia de 45 enterovirus distintos en el conjunto de muestras colectadas, representando a las cuatro especies virales (A=10, B=26, C=8, D=1). Diez de estos enterovirus, fueron

reportados por primera vez en Nigeria durante este estudio, y 2 de ellos, por primera vez en el continente africano (Majumdar et al. 2021).

Una serie de trabajos de similares características, realizados en distintas partes del mundo, fueron publicados en el año 2020.

El primero de ellos, analizó muestras de agua residual colectadas cada dos semanas, en el periodo octubre 2014-octubre 2015 desde una planta de tratamiento de la ciudad de Clermont-Ferrand (Francia). En cada colecta, 20 litros fueron llevados mediante una combinación de distintos pasos de concentración a unos 60 ml, de los cuales se tomó 1 ml y se sometió a extracción de ARN y RT-PCR para un fragmento parcial de la región codificante de VP1, que luego fue secuenciado mediante Illumina MiSeq (2 x 300 *bp paired end*). Se logró identificar la presencia de 48 tipos distintos de las especies A (13), B (23) y C (12), de los cuales 26 aparentemente circulaban en la comunidad sin ser detectados desde el ámbito médico (Bisseux et al. 2020).

Otro estudio, realizado con muestras de agua residual colectadas mensualmente durante 2016 desde una planta de tratamiento localizada a 30 kilómetros de Barcelona (España), generó 4 grupos de muestras según la estación del año y concentró los mismos (42 ml) mediante un protocolo de ultra centrifugación para someter una fracción del concentrado viral a extracción de ARN y RT-*nested*-PCR también dirigida hacia una región parcial de VP1. La secuenciación fue realizada mediante Illumina MiSeq (2 x 300 *bp paired end*). El estudio detectó la presencia de 14 tipos pertenecientes a las especies A (4), B (7), y C (3). Se encontró que CVB5, E18, y E30 fueron los tipos más frecuentemente detectados en primavera y verano, y que E14 y EV-C99 lo fueron en otoño e invierno (Martínez-Puchol et al. 2020).

También Tao et al. (2020) estudiaron muestras de agua residual (1 litro cada una) colectadas mensualmente durante 2018 en Jinan, (Shandong-China), las cuales fueron concentradas mediante un método de adsorción-elución. Para ello amplificaron tanto un fragmento parcial de VP1, como la región P1 en su extensión completa (la cual fue amplificada mediante dos PCRs distintas: una específica para las especies A y C y otra para las especies B y D), directamente desde los concentrados virales y analizaron dichos amplicones mediante *next-generation sequencing*. Mediante la secuenciación de la región P1, fueron capaces de detectar la presencia de 32 enterovirus distintos (11 de la especie A, 14 de la especie B, y 7 de la especie C), detectando entre 5 a 23 enterovirus por muestra. Por otro lado, detectaron apenas 16 de estos tipos a partir de la secuenciación del fragmento parcial de VP1. Este estudio encontró una correlación entre lo que circula en el ambiente y los serotipos responsables de AFP en la comunidad para el periodo estudiado.

En julio de 2020, Shaw et al. propusieron un método que amplifica la región codificante de VP1 de enterovirus (incluyendo poliovirus) y obtiene, valiéndose de secuenciación con tecnología Oxford Nanopore (MinION) y una plataforma de análisis en tiempo real, secuencias consenso a partir de muestras que fueron multiplexadas. Esta metodología fue probada con ocho muestras de agua residual colectadas durante 2015 y 2017 en Pakistán, obteniendo una distribución de enterovirus en cada muestra muy similar a la que mostraron *reads* ensamblados de la misma región genómica cuando fueron secuenciados mediante Illumina MiSeq

(Figura 10). Se detectaron más de 40 enterovirus en total. Más allá de la exactitud del método al identificar los enterovirus contenidos en una única muestra, el mismo presenta los beneficios asociados al uso de la tecnología Nanopore, como ser la practicidad de un dispositivo de secuenciamiento portable, el bajo costo y la rapidez, lo cual probablemente le asegurará un lugar destacado en la vigilancia ambiental de los enterovirus (y probablemente poliovirus también) a nivel global.

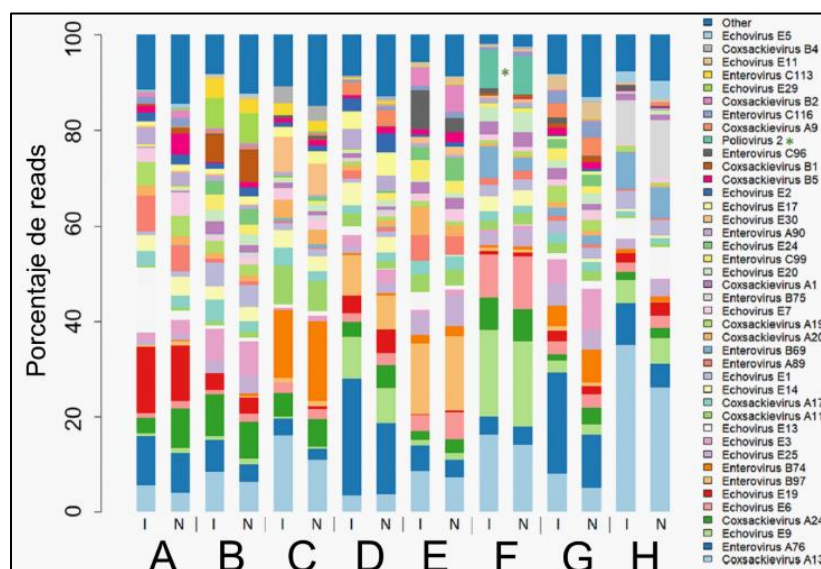


Figura 10. Muestras de agua residual contienen mezclas de múltiples enterovirus que co-circulan en la comunidad. Se observa la diversidad de enterovirus evidenciada mediante *next-generation sequencing* de productos de PCR obtenidos con cebadores pan-enterovirus, en ocho muestras de agua residual (A-H) colectadas en Pakistán. I: Illumina MiSeq, N: Oxford Nanopore. La detección de poliovirus es indicada por un asterisco. La imagen fue tomada y modificada de Shaw et al. (2020), doi:10.1128/JCM.00920-20.

1.14. Algunos aspectos generales sobre la erradicación de poliovirus

1.14.1. Poliomiélitis

Entre las diversas enfermedades mencionadas en secciones anteriores, las parálisis musculares han sido quizás las más notorias desde el punto de vista de la salud pública, y junto a ellas los poliovirus, los enterovirus que más han llamado la atención durante gran parte del siglo pasado.

La poliomiélitis es el resultado de la destrucción de motoneuronas en la médula espinal por acción de alguno de los tres serotipos de poliovirus. Clínicamente se distingue como una parálisis flácida asimétrica, sin pérdida sensorial permanente. El periodo de incubación de la enfermedad es de 7 a 14 días, y el contagio se da entre los 7 a 10 días antes del inicio de síntomas. A su vez, el virus, se excreta en las heces hasta 8 semanas después de la aparición de los síntomas (Nathanson, 2008; Mosquera-Gordillo et al. 2014). Esta presencia en la materia fecal (y también en secreciones faríngeas), le permite al virus diseminarse en la población humana

ya que su transmisión justamente se da principalmente de persona a persona a través de la vía fecal-oral (Nathanson & Kew, 2010).

La recuperación de una infección por poliovirus puede ser prolongada e incompleta, ya que las extremidades pueden debilitarse permanentemente y desarrollar atrofia (Muehlenbachs et al. 2015). No obstante, apenas entre 1 a 2% de las infecciones por poliovirus, llegan a la etapa de diseminación hacia el sistema nervioso (Racaniello, 2006), y la relación entre parálisis/infección depende del serotipo: 1 caso de parálisis cada 200 infecciones para PV1, 1 caso cada 1.800 infecciones para PV2 y 1 caso cada 1.200 infecciones para PV3 (Nathanson & Kew, 2010).

Poliovirus también es capaz de causar parálisis espinal o bulbar, lo que resulta en falla respiratoria y puede ser fatal (Garon et al. 2015, Muehlenbachs et al. 2015).

Con fines de vigilancia epidemiológica, la poliomielitis fue considerada como una enfermedad dentro del espectro de las AFP, las cuales se definen como cuadros clínicos en los cuales hay un inicio agudo de debilidad en las extremidades, con grados variables de disfunción del sistema nervioso autónomo y somático. Bajo el término de AFP quedan comprendidos una variedad de síndromes clínicos como el de Guillain-Barré o la mielitis transversa, pero también incluye diversas causas de parálisis flácida como traumatismos, tumores, y trastornos inmunopatológicos (de Quadros et al. 1997).

1.14.2. Vacunas antipoliomielíticas

Existen dos vacunas que han sido ampliamente utilizadas en la población humana debido a su eficacia en la prevención de las parálisis musculares causadas por poliovirus. Una de ellas es preparada con cepas atenuadas de los serotipos PV1, PV2 y PV3, de suministro oral y desarrollada por el científico Albert Sabin (licenciada en 1960-1961), conocida como OPV (del inglés *Oral Poliovirus Vaccine*), aunque también se le refiere como vacuna Sabin. La otra es una vacuna preparada con cepas de los tres serotipos de PV que fueron inactivadas, y que fuera desarrollada por el científico Jhonas Salk en 1955 y se la conoce como IPV (del inglés *Inactivated Poliovirus Vaccine*), o también vacuna Salk (Kew & Pallansch, 2018).

Si bien ambas vacunas son altamente eficaces, la OPV ha sido ampliamente utilizada en las campañas de erradicación mundial de la poliomielitis. La vacunación ha provocado que los casos de poliomielitis debidos a virus polio salvaje disminuyan drásticamente, habiéndose erradicado el virus en la mayoría de los países del planeta, siendo restringida actualmente su circulación únicamente a Afganistán y Pakistán.

Los virus atenuados que componen la vacuna OPV se administran vía oral, y éstos replican en el tracto digestivo del individuo vacunado, simulando un proceso natural de infección para luego eliminarse en las heces. A su vez, estimula la producción de anticuerpos secretorios IgA y circulantes IgG. Al tratarse de virus vivos, la vacuna puede ser transmitida desde la persona vacunada a los contactos más cercanos que no estén inmunizados, así como puede difundirse en el ambiente llegando a personas vacunadas o no vacunadas. Además, la circulación de la vacuna a nivel comunitario, desplaza al virus salvaje, interrumpiendo su transmisión (Organización Panamericana de la Salud, 2005; Oberste, 2018).

Por otro lado, la vacuna IPV es no replicativa ya que está preparada con virus muertos. Su aplicación es de tipo parenteral subcutánea o intramuscular. Los virus que componen esta vacuna no son eliminados en las heces. Si bien la vacuna estimula la producción de anticuerpos circulantes y bloquea la excreción faríngea, la inmunidad intestinal es relativamente menor que la humoral, por lo que no ofrece resistencia a la infección y propagación del poliovirus salvaje en la comunidad (Onorato et al. 1991, Oberste 2018).

Existen otras diferencias entre ambas vacunas que se han transformado en ventajas y desventajas, las cuales están más relacionadas a cuestiones logísticas para su aplicación, o a la economía de las campañas de erradicación del virus, que no analizaremos aquí (Kew & Pallansch, 2018). La diferencia que más nos atañe, es la que está dada entre ambas vacunas por la inestabilidad genética de las cepas Sabin (vacuna OPV), que puede llevar a una reversión de las mutaciones de atenuación durante su replicación en un individuo vacunado, y así adquirir nuevamente un fenotipo neuro virulento. Esto será explicado en detalle más adelante, pero sin duda es una desventaja que presenta la vacuna replicativa OPV ante la no replicativa IPV (Kew et al. 2005, Burns et al. 2014).

1.14.3. Erradicación. Situación mundial actual

En el año 1988, cuando la Asamblea General de las Naciones Unidas lanzó la Iniciativa para la Erradicación de la Poliomielitis, se estimaban 350.000 casos de parálisis a nivel mundial debido a los tres serotipos de poliovirus, y un total de 125 países se consideraban endémicos al no haber interrumpido hasta entonces la transmisión del virus (World Health Assembly, 1988; Kew & Pallansch, 2018). La Iniciativa planteaba el año 2000 como fecha límite para la cual la humanidad debía haber erradicado la circulación en el planeta de los tres serotipos y con ello, erradicado la enfermedad.

Los esfuerzos de erradicación liderados por la Iniciativa fueron agresivos, y a pesar de que nos encontramos a 21 años de la fecha objetivo inicialmente propuesta, las distintas etapas de la erradicación pueden resumirse en algunos hitos que se detallan a continuación.

Desde que se lanzó la Iniciativa para la Erradicación de Polio, los casos de parálisis debido al virus se redujeron en un 99.99% a nivel mundial (Tuma et al. 2021).

Desde 2017, únicamente Afganistán y Pakistán han reportado casos de AFP debido a poliovirus salvaje, totalizando 373 casos de AFP a nivel mundial. En 2021, únicamente han sido reportados 2 casos de AFP con aislamiento de poliovirus salvaje (tipo 1) en estos países (1 en Afganistán y 1 en Pakistán)¹⁴. Estos dos países son los únicos del planeta donde no se ha interrumpido la circulación de poliovirus y por lo tanto se consideran endémicos. Hasta 2016, también Nigeria se consideró endémico (4 casos de AFP por poliovirus 1 en 2016), sin embargo, luego de 4 años

¹⁴ Datos de vigilancia al 8 de agosto de 2021: <https://polioeradication.org/wp-content/uploads/2021/08/weekly-polio-analyses-WPV-20210803.pdf>

sin que existan reportes de casos de parálisis por polio salvaje en Nigeria, el continente africano fue certificado como una región *polio-free* en agosto de 2020¹⁵. En noviembre de 2012 se reportó el último caso de parálisis debido a polio salvaje 3 (Kew et al. 2014) mientras que el último caso debido al tipo salvaje 2 había sido reportado en 1999, y se declaró erradicado en 2015 (Global Commission for the Certification of Poliomyelitis Eradication, 2015). Desde hace aproximadamente 8 años el único serotipo de polio salvaje que ha causado parálisis es el tipo 1 (Tuma et al. 2021).

1.14.4. Estrategia de erradicación

La erradicación del poliovirus en 5 de las 6 regiones geográficas definidas por la OMS (Centers for Disease Control and Prevention, 2021b), se ha basado principalmente en ampliar al máximo posible la cobertura de inmunización de rutina en las poblaciones, así como en el desarrollo de actividades de inmunización complementarias. A su vez, se ha planteado una vigilancia exhaustiva del virus y su contención/eliminación en áreas de transmisión continua. Históricamente, poliovirus ha sido la principal causa de AFP en niños. Por lo tanto, la vigilancia de las AFP es el *gold standard* para la detección de casos ocasionados por poliovirus. Las muestras de heces obtenidas de individuos afectados por AFP son enviadas a laboratorios acreditados por la OMS para su análisis, y los resultados obtenidos asisten en la toma de decisiones para direccionar los esfuerzos de inmunización (Diop et al. 2017; Oberste, 2018). A su vez, la vigilancia ambiental se ha utilizado de manera incrementada para monitorear la presencia del virus en el agua residual o en otras muestras ambientales, principalmente como complemento de la vigilancia de AFP, identificando la transmisión residual del virus salvaje en áreas endémicas particularmente cuando las cadenas de transmisión se dan sin que aparezcan síntomas de parálisis (Tuma et al. 2021). También es útil para detectar de manera temprana la importación de poliovirus salvajes en áreas libre del virus, o de derivados vacunales, o incluso para identificar la presencia de cepas relacionadas a la vacuna luego de campañas de vacunación con OPV, o para conocer el grado de dispersión del virus en el ambiente ante la ocurrencia de brotes de AFP (Vinjé et al. 2004, Mueller et al. 2009, Esteves-Jaramillo et al. 2014, Shulman et al. 2014, Cassemiro et al. 2016). No obstante, en un escenario de erradicación, la vigilancia ambiental también puede proveer información importante acerca del estatus de *polio-free* para certificar una región, o incluso para monitorear la ausencia de cepas relacionadas a la vacuna una vez que la OPV deje de utilizarse.

1.14.5. Derivados vacunales y epidemias

Mediante el uso efectivo de la OPV, la Iniciativa Global para la Erradicación de la Polio (GPEI) ha llevado al virus polio hacia el umbral de la erradicación (Tuma et al.

¹⁵ La Comisión Regional de Certificación certificó el 25 de agosto de 2020 a África como una región libre de polio luego de 4 años sin detección de parálisis por poliovirus salvaje: <https://www.who.int/news/item/25-08-2020-global-polio-eradication-initiative-applauds-who-african-region-for-wild-polio-free-certification>

2021). Sin embargo, en casos muy raros, las cepas atenuadas de la vacuna OPV pueden llegar a causar la enfermedad mediante tres mecanismos. Primero, la Poliomiелitis Parálitica Asociada a la Vacuna (VAPP) ocurre en un muy pequeño número de individuos vacunados y sus contactos cercanos (1 caso cada 750.000 dosis de vacunas suministradas, en Estados Unidos). Segundo, en poblaciones con bajos niveles de inmunidad a poliovirus, la transmisión sostenida de persona a persona de cepas Sabin entre individuos susceptibles puede resultar en la emergencia de cepas “revertantes” que hayan adquirido características de neurovirulencia y transmisibilidad del poliovirus salvaje. Finalmente, la replicación prolongada de virus Sabin en pacientes con ciertos tipos de inmunodeficiencias, puede resultar en la emergencia de poliovirus derivados de vacuna asociados a inmunodeficientes (iVDPV), los cuales pueden causar parálisis en el individuo y potencialmente en sus contactos más cercanos, aunque es un fenómeno muy raro (Minor, 2009).

Actualmente, los aislados de PV se dividen en tres categorías:

- 1) Poliovirus salvajes (más de 15% de divergencia a nivel nucleotídico con la cepa Sabin correspondiente).
- 2) PV del tipo vacunal, para los cuales se sabe que existe una divergencia menor a 1% (PV1 y PV3) o menor a 0,6% (PV2) en la secuencia nucleotídica de VP1 de la cepa Sabin correspondiente;
- 3) PV derivados de la vacuna (VDPV), donde la divergencia es superior al 1% (PV1 y PV3) o al 0,6% (PV2) en la secuencia nucleotídica de VP1 de la cepa Sabin correspondiente.

A su vez, las VDPV se dividen en tres clases: las cVDPV (circulantes) cuando existe evidencia de transmisión persona a persona en la comunidad, las iVDPV (aisladas de pacientes inmunodeficientes en los cuales la VDPV replicó de manera prolongada en el tiempo), y las aVDPV (ambiguas), las cuales pueden ser tanto aislados clínicos de personas inmunocompetentes sin evidencia de transmisión, o también aislados ambientales (a partir de agua residual) que no guardan relación con cVDPV o iVDPV conocidas y cuya fuente es desconocida (Kew et al. 2005).

La mayor importancia epidemiológica recae sobre las cVDPV, ya que estas recuperan las propiedades biológicas de los poliovirus salvajes y son capaces de circular indefinidamente en poblaciones con bajas coberturas vacunales, con el riesgo de producir parálisis en individuos susceptibles. De hecho, desde el año 2000 los brotes de AFP por cVDPV significan un gran problema, y han dificultado los objetivos de erradicación del virus polio (Kew & Pallansch, 2018).

Los brotes de parálisis ocasionados por cVDPV presentan un fuerte sesgo en el serotipo (Figura 11), ya que cVDPV-2 ha significado más del 85% de los casos, seguido por cVDPV-1 y por último cVDPV-3. Desde 2006 hay una clara predominancia de cVDPV-2 (Kew & Pallansch, 2018).

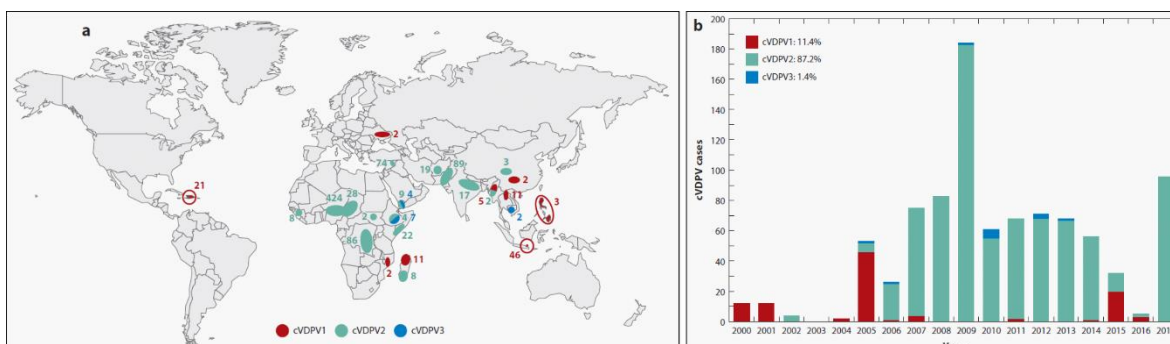


Figura 11. Brotes de parálisis flácidas agudas generados por cVDPV (*circulating Vaccine-Derived Poliovirus*) en el periodo 2000-2017. a) Localización y personas afectadas en los distintos brotes de parálisis flácidas agudas que han ocurrido en el mundo y que han sido atribuidos a derivados vacunales circulantes de cada uno de los serotipos de poliovirus incluidos en la vacuna atenuada Sabin. b) Evolución en el número de casos de parálisis flácidas agudas a nivel mundial atribuidas a los derivados vacunales circulantes de poliovirus en el periodo 2000-2017. Nótese la predominancia de casos por cVDPV-2 a partir del año 2006. La figura fue tomada y modificada de Kew & Pallansch, (2016); doi: 10.1146/annurev-virology-101416-041749.

En los últimos 5 años (2016-2020), se han registrado 76 casos por cVDPV-1, 1.604 por cVDPV-2, y 7 por cVDPV-3, afectando 8, 28, y 1 países, respectivamente¹⁶. En lo que va de 2021 (al 27 de julio) ya se han reportado 170 casos por cVDPV-2, y 9 casos por cVDPV-1. Si comparamos estos números con los 408 casos de AFP causados por poliovirus salvaje en el mismo periodo (2016-2020)¹⁷ podremos comprender la relevancia que tienen los cVDPV para la salud pública.

Considerando que el poliovirus salvaje tipo 2 no circula desde 1999, y que la mayoría de los brotes relacionados a cVDPV implican a cVDPV-2, se diseñó una estrategia de retiro de la cepa Sabin 2 de la vacuna trivalente OPV (tOPV), sustituyéndola por una bivalente (bOPV) con los serotipos 1 y 3, más una dosis (al menos) de IPV-2, la cual se programó para abril de 2016 con la finalidad de que sucediera de manera sincronizada en todo el planeta. De esta manera se pretendió disminuir el número global de casos de AFP causados por poliovirus (Garon et al. 2016).

Esta estrategia, por supuesto no ha estado exenta de dificultades, la mayor de ellas quizá fue generada por el uso de una vacuna monovalente OPV contra el serotipo 2, que se utilizó en respuesta a los brotes de parálisis causados por cVDPV-2 residuales luego del *switch* tOPV por bOPV, y que también ha propiciado la generación de casos de parálisis debido a cVDPVs (Alleman et al. 2020; Roberts, 2020).

¹⁶ Polio Eradication Initiative. Circulating Vaccine-Derived Poliovirus: <https://polioeradication.org/wp-content/uploads/2021/07/weekly-polio-analyses-cVDPV-20210727.pdf>

¹⁷ Ver conteo de casos de AFP debido a poliovirus salvaje entre 2016 y 2020: <https://extranet.who.int/polis/public/CaseCount.aspx>

1.14.6. Erradicación de poliovirus en las Américas

El último caso de parálisis con aislamiento de virus polio salvaje en América tuvo lugar en Perú, en el año 1991. Tres años más tarde, sin que fueran detectados nuevos casos en todo el continente, la OMS declaró a las Américas como la primera región del mundo libre de circulación de los tres serotipos del virus polio salvaje. En este sentido nuestro continente fue pionero, ya que el mismo estatus sería alcanzado por otras regiones recién a partir del año 2000 (de Quadros et al. 1997, Mosquera-Gordillo 2014).

La vigilancia de las AFP es la forma primaria para detectar posibles parálisis causadas por poliovirus, por lo tanto, un sistema de vigilancia de buena calidad es necesario para asegurar la ausencia de circulación del virus en la comunidad, y mantener el estatus de región libre de poliovirus salvaje. Sin embargo, y contrastando con los esfuerzos que otrora llevaron a la erradicación del virus en el continente, en la actualidad los sistemas de vigilancia de Latinoamérica se han caracterizado por un subregistro de notificación de AFP, y por las ineficiencias tanto en lo relacionado a la obtención y envío de muestras para su análisis en el tiempo recomendado, como en el seguimiento de casos (Falleiros-Arlant et al. 2020; Pan-American Health Organization, 2020).

Las AFP pueden tener diversos orígenes no relacionadas a poliovirus, por lo que suceden independientemente de la presencia del virus en una región. Las recomendaciones para la vigilancia de las AFP son claras en tanto establecen que la tasa anual esperada de notificación de AFP en una población debería ser de 1 caso cada 100.000 personas menores de 15 años. En la mayoría de los países del continente americano no se alcanza ese valor (Figura 12). Únicamente México, Honduras, Costa Rica, Cuba y Chile reportan tasas superiores a 1. Si bien algunos países tienen tasas superiores a 0,8 en general no se logran los estándares recomendados para la obtención de muestras adecuadas durante las primeras 48 horas siguientes a la notificación. Por otro lado, son 9 países que reportan tasas inferiores a 0,8. Lamentablemente, en los últimos 15 años, Uruguay en general ha estado muy por debajo, o por debajo de la tasa esperada¹⁸, incluso llegó a no reportar ningún caso de AFP en 2010¹⁹, lo cual es indicador de un sistema de vigilancia con notorias deficiencias.

Esta problemática a nivel regional, se complementa con las coberturas vacunales heterogéneas y bajas que algunos países poseen (Figura 12), lo cual impide la eficacia vacunal. Esto se traduce, por ejemplo, en que en Ecuador haya 100.000 niños en riesgo de contraer poliomyelitis, que en Venezuela sean 226.000, en México 348.000 o en Brasil 400.000 (Alfaro-Murillo et al. 2020).

Si bien el éxito de la erradicación del virus polio en las Américas se debe principalmente al uso de la vacuna atenuada OPV, hoy en día, su uso constituye un

¹⁸ Ver “Performance of acute flaccid paralysis (AFP) surveillance and incidence of poliomyelitis, 2014. Wkly Epidemiol Rec. 2014 Nov 28;89(48):541-4” y “Performance of acute flaccid paralysis (AFP) surveillance and incidence of poliomyelitis, 2016. Wkly Epidemiol Rec. 2016 Nov 25;91(47):556-60”.

¹⁹ Ver “Performance of acute flaccid paralysis (AFP) surveillance and incidence of poliomyelitis, 2010. Wkly Epidemiol Rec. 2011 Apr 1;86(14):136-40”.

riesgo de circulación silenciosa de VDPVs. Actualmente todos los países de Latinoamérica han introducido al menos una dosis de IPV. Entre estos son sólo 4 países (Costa Rica, Chile, Uruguay y Argentina) que han dejado de utilizar totalmente la OPV y siguen la recomendación de la Sociedad Latinoamericana de Infectología Pediátrica (SLIPE) de inmunizar con al menos 4 dosis de IPV (Falleiros-Arlant et al. 2020).

Uruguay cambió completamente su esquema de vacunación anti polio desde la aplicación de la trivalente OPV hacia la trivalente IPV, en mayo de 2012. Argentina realizó el cambio en abril de 2016 (comenzando a fines de 2015) desde la trivalente OPV hacia el esquema combinado de bivalente OPV (serotipos 1 y 3) más la monovalente IPV-2, y más tarde (en julio de 2020) cambió hacia un esquema de IPV trivalente exclusivamente.

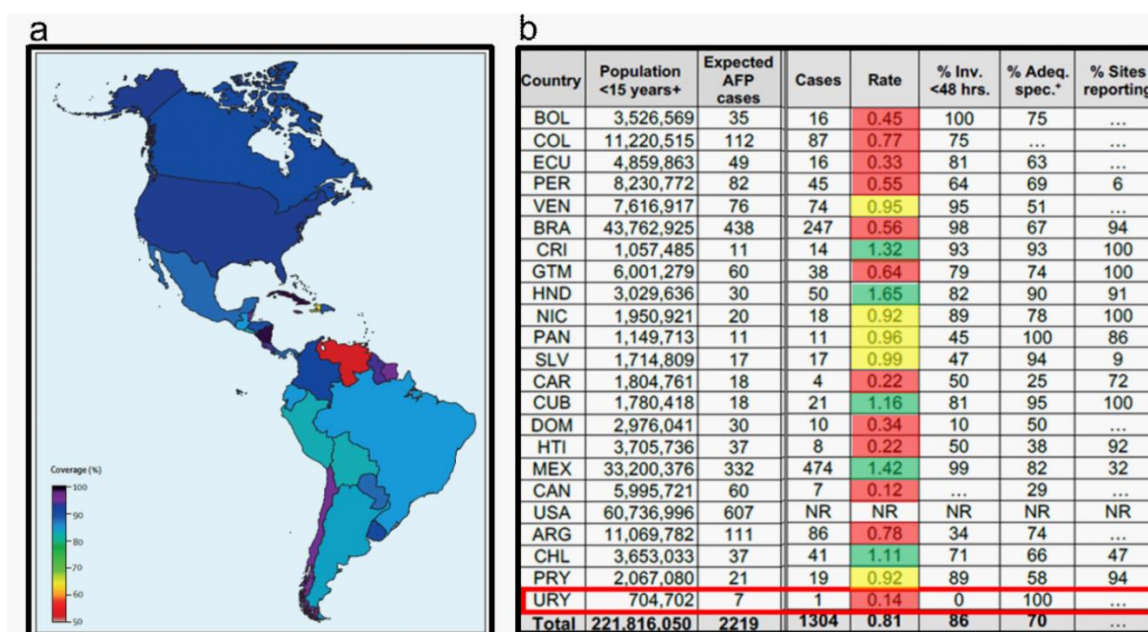


Figura 12. Vacunación y vigilancia de poliovirus en las Américas. En a) se muestra el mapa político de América con cada país coloreado según el porcentaje de la población con tres dosis de vacuna anti polio, según datos de 2018 que cada país reportó a la OMS. En b) se muestran datos de vigilancia clínica de parálisis flácidas agudas (AFP) en los países de las Américas (mencionados según el código de países de tres letras) para el año 2020. Las tasas de notificación de AFP no alcanzan el mínimo recomendado (1 cada 100.000 individuos < 15 años) en la mayoría de los países del continente. De igual manera, no se logra el mínimo porcentaje recomendado (80%) de casos investigados dentro de las primeras 48 horas siguientes a la notificación, ni de muestras de heces colectas adecuadamente de personas con AFP, ni de establecimientos reportando al sistema de vigilancia en cada país, en varios países. Por lo que puede decirse que, en general en la región, la vigilancia de poliovirus se realiza de manera sub-óptima. Estados Unidos (USA) no reporta al sistema de vigilancia. Los valores de tasa de AFP (Rate) para cada país fueron coloreados de verde cuando están por encima del mínimo recomendado de 1 caso cada 100.000 individuos menores de 15 años, de amarillo cuando el valor oscila entre 0.8 y 1, y de rojo cuando el valor está por debajo de 0.8. En el año 2020, Uruguay (URY) reportó 7 veces menos parálisis de las que debería haber reportado para lograr al menos un indicador óptimo de vigilancia. La imagen a) fue tomada de Alfaro-Murillo et al. (2020), doi: 10.1016/S0140-6736(20)30213-0 y los datos mostrados en b) corresponden al *Polio Weekly Bulletin* de la Organización Panamericana de la Salud Vol.36 N°14 (<https://www.paho.org/es/documentos/boletin-semanal-polio-14-10-abril-2021>).

1.14.7. Actividades de vigilancia ambiental de poliovirus en Sudamérica

Al indagar los antecedentes del estudio de poliovirus en muestras ambientales en la región de América del Sur nos remontamos al menos al año 1967, cuando investigadores de la Facultad de Higiene y Salud Pública de la Universidad de San Pablo (Brasil) reportaron la presencia de poliovirus 1 y 3 (sin llegar a determinar si se trataba de cepas vacunales Sabin, o salvajes) en muestras de agua de irrigación de huertas del Estado paulista, mediante la inoculación de concentrados obtenidos a partir de estas, en ratones recién nacidos y en cultivo de células HeLa (Christovão et al. 1967).

A su vez, destaca el rol que jugó el laboratorio creado en 1968 por el Dr. Hermann Schatzmayr en la Escuela Nacional de Salud Pública (ENSP), el cual se convirtió en referencia a nivel de Brasil para la erradicación de la poliomielitis, y desde donde se realizaron también trabajos pioneros sobre virus entéricos en colecciones de aguas y aguas residuales de Brasil, mediante los cuales se desarrollaron metodologías de concentración de virus, que serían más tarde, transferidas a la *Companhia Ambiental do Estado de São Paulo* (CETESB). Dicho organismo es el responsable del diagnóstico y monitoreo de calidad ambiental del Estado de São Paulo, y desde 1999 ejecuta un Programa de Vigilancia de Enterovirus en el cual se estudian muestras de agua cada 15 días en puntos de alta movilidad humana, como aeropuertos y puertos, así como de plantas de tratamiento de agua residual. Los poliovirus que se detectan son enviados al Laboratorio de Enterovirus del Instituto Oswaldo Cruz, en Río de Janeiro, para su caracterización (Schatzmayr & Cabral, 2009).

Sin embargo, los estudios más relevantes han sido los que se han desarrollado posteriormente a la erradicación del virus en la región, los cuales han estado centrados en descartar la presencia de poliovirus salvaje, o evaluar el efecto en la circulación de las cepas vacunales que tuvo el reemplazo de OPV por IPV, como también evaluar el grado de dispersión de variantes relacionadas a la vacuna atenuada OPV.

En 2000-2001 ocurrió un brote de poliomielitis en República Dominicana y Haití debido a un derivado vacunal del tipo 1 (Centers for Disease Control and Prevention, 2001). Ello significó un punto de inflexión en nuestra región debido a que activó las alarmas de los sistemas de salud pública, y a partir de entonces diversos países realizaron actividades de vigilancia ambiental de poliovirus.

En el año 2004, se publicó un trabajo en el cual se estudiaron 14 muestras de agua residual y agua corriente colectadas en 6 provincias de Ecuador que poseían alto riesgo de circulación de poliovirus. Dicho trabajo reportó la presencia de poliovirus en 6 de las 14 muestras, identificándose en todos los casos, cepas del tipo Sabin (Dayan et al. 2004).

A su vez, en el periodo comprendido entre 2003 y 2005, la ciudad de Córdoba en Argentina, utilizó de rutina la vacuna IPV en su programa de inmunización infantil, y la OPV únicamente fue utilizada en agosto-setiembre de 2005 de manera intermitente. Entre los meses de mayo de 2005 y abril de 2006, investigadores de la Universidad Nacional de Córdoba colectaron semanalmente muestras de agua

residual de la ciudad de Córdoba, así como también de tres poblados cercanos a dicha ciudad, que nunca habían interrumpido la vacunación con OPV, y las estudiaron para la detección y caracterización de poliovirus según las recomendaciones de la OMS (Mueller et al. 2009). Los resultados mostraron que mientras se utilizaba la IPV, un 19% de las muestras fue positiva para poliovirus, aunque este porcentaje se incrementó al 100% en los dos meses posteriores al uso intermitente de OPV en agosto de 2005. Al reincorporar el uso de IPV a partir de setiembre de 2005, al cabo de tres meses, un 25% de las muestras fue positivas para poliovirus. A su vez, promediando mensualmente, más de la mitad (54%) de las muestras tomadas en los poblados que nunca interrumpieron el uso de OPV, fueron positivas para poliovirus (variando entre un 20% a 80%).

El total de los poliovirus para los cuales se pudo obtener información genética mostró ser del tipo Sabin. Un 77% de estos presentó al menos una mutación en VP1 y el 3% presentó 5 o más mutaciones. Si bien se detectaron algunas mutaciones de reversión de atenuación en algunos aislados, la máxima divergencia genética con respecto a las cepas Sabin fue de 0,77% para los serotipos 1 y 3, y de 0,44% para el serotipo 2. No se detectó recombinación con otros enterovirus.

El decline en la detección de poliovirus luego de la implementación de IPV, así como la baja divergencia con respecto a las cepas Sabin junto a la ausencia de recombinación con otros enterovirus, llevó a sugerir que no había una circulación sostenida de cepas OPV en la comunidad al suministrar la IPV con buena cobertura en la población.

Este estudio, pionero en la región, más allá de analizar el efecto del reemplazo de una vacuna por otra en la circulación de poliovirus, caracterizó un gran número de poliovirus aislados desde el ambiente, por lo que constituyó un importante antecedente de vigilancia ambiental no sólo para Córdoba, sino que también para la Argentina y la región Sudamericana en su conjunto.

Más recientemente, en el periodo 2011-2012, el Laboratorio de Enterovirus del Instituto Oswaldo Cruz de Río de Janeiro, realizó un estudio de aguas residuales colectadas semanalmente (n=31) en la entrada a una planta de tratamiento, para monitorear la presencia de poliovirus, en un contexto de vacunación con OPV y una cobertura superior al 95% en la población (de Oliveira Pereira et al. 2016). Las muestras fueron estudiadas según recomendaciones de la OMS, y se aisló poliovirus a partir de 8 muestras, tratándose en todos los casos de cepas del tipo Sabin. Sin embargo, se encontraron algunas sustituciones nucleotídicas de interés, a nivel de 5'UTR, asociadas con el fenotipo neuro virulento de poliovirus. No hubo evidencia de VDPV ni de eventos de recombinación.

Adicionalmente, actividades de vigilancia ambiental de poliovirus han sido llevadas a cabo en Colombia, (Municipio de Armenia, Quindío) con el objetivo de conocer la circulación del virus en la comunidad durante periodos de inmunización con OPV, así como de conocer la diversidad de cepas polio en el ambiente, antes del cese del uso de OPV. Estos estudios han identificado únicamente cepas del tipo Sabin 1 y 3 (González et al. 2012, 2019).

En enero de 2014, en el marco del Programa de Vigilancia de Enterovirus llevado a cabo por CETESB junto al Centro de Vigilancia Epidemiológica del Estado de San Pablo, se aisló un poliovirus a partir de una muestra de agua de mar obtenida en el

Puerto de San Sebastián, al norte del Estado de San Pablo (Casseiro et al. 2016). Dicho aislado fue caracterizado como un VDPV del tipo 2, con una divergencia de 8,6% con respecto a la secuencia de VP1 de la cepa Sabin, y distintas regiones de su genoma evidenciaron procesos de recombinación con otros enterovirus de la especie C. A su vez, se detectaron reversiones en mutaciones de atenuación en 5'UTR y VP1. Se estimó que la fecha en que la cepa OPV original fue suministrada en un evento de vacunación fue aproximadamente 8,5 años antes de que fuera identificada desde la muestra colectada en el mar, lo que indica que el virus habría replicado durante varios años, posiblemente a partir de su transmisión a través de varios individuos.

A pesar de esta detección, no se registraron cepas relacionadas en Brasil o en algún otro sitio, ya sea circulando en ambiente, o en personas.

Sin embargo, meses más tarde (marzo de 2014) se detectaría un poliovirus salvaje del tipo 1 en aguas residuales colectadas en el Aeropuerto Internacional de Viracopos, (Campinas, San Pablo), y su análisis genético indicó una relación cercana con un polio identificado en un caso de parálisis en Guinea Ecuatorial (Pan-American Health Organization, 2014). A partir de este hallazgo, las autoridades de salud pública de Brasil fortalecieron la vigilancia de las AFP mediante una búsqueda activa de casos en todo el estado de San Pablo. Si bien no se reportaron casos de parálisis, ni se detectó la presencia del virus desde otra fuente, la vigilancia mostró por sí misma su importancia como una herramienta fundamental para la detección temprana de importación de poliovirus salvaje en territorios donde fue erradicado.

1.14.8. Erradicación del poliovirus en Uruguay

Desde que se cuenta con registro, en el año 1956 Uruguay contabilizó un máximo de 21 casos de poliomiélitis cada 100.000 habitantes (aproximadamente unos 550 casos). Al año siguiente, se introdujo en el país la vacuna Salk (inactivada), y en 1962 se la sustituyó por la vacuna Sabin (atenuada), la cual comenzó a aplicarse de forma masiva en la población (Quian, 2010). En el 1966 la vacuna Sabin se estableció como componente permanente en el plan de vacunación, y en 1982 se hizo obligatoria mediante Ley 15.272 (Quian, 2010; Sorondo & Frantchez, 2014). Desde principios de los años 90, Uruguay sostuvo un porcentaje de cobertura vacunal superior al 95% (Sorondo & Frantchez, 2014).

En el año 1978 ocurrió el último caso de parálisis con aislamiento de poliovirus salvaje en Uruguay (de Quadros et al. 1997, Mosquera-Gordillo et al. 2014). Desde entonces, no han sido reportados otros casos de estas características, aunque, en 1989 se reportaron tres casos de polio parálítica asociada a vacunación (Sorondo & Frantchez, 2014).

En mayo de 2012 se reemplazó totalmente la vacuna OPV por la IPV en todo el territorio nacional, y desde entonces se inmuniza a la población mediante un esquema que indica su aplicación a los 2, 4, y 6 meses de vida, y una cuarta dosis a los 4-6 años de edad (Alfaro-Murillo et al. 2020, Falleiros-Arlant et al. 2020).

1.15. Algunas generalidades sobre la enfermedad manos-pies-boca

1.15.1. Introducción a la enfermedad

La enfermedad manos-pies-boca (HFMD del inglés *Hand-Foot-and-Mouth disease*) está asociada a la infección por distintos enterovirus humanos y consiste en un *rash* maculopapular vesicular transitorio, en manos, pies y boca, acompañado de síntomas de una infección viral leve (Muehlenbachs et al. 2015). De acuerdo al Centro para el Control y Prevención de las Enfermedades de Estados Unidos, es una enfermedad común en niños menores de 5 años, debido a la falta de inmunidad contra dichos patógenos en los primeros años de vida (Centers for Disease Control and Prevention, 2021c).

Epidemias de la enfermedad ocurren cada pocos años en la medida que aumenta la cantidad de niños sin exposición previa al virus causante. Éstas comúnmente afectan niños pequeños en escuelas o centros de cuidado infantil. Los cuadros son leves y en torno a los 7 a 10 días se resuelven, aunque pueden existir complicaciones a nivel del sistema nervioso central, en raras ocasiones. La enfermedad se disemina entre individuos por el contacto fecal-oral, oral-oral, o por el contacto con secreciones respiratorias. Por lo tanto, el contagio se da principalmente mediante contacto directo con un individuo infectado (mediante tos o estornudos, besar, abrazar o compartir vasos o utensilios de comida con éste), o mediante el contacto con heces, o superficies y materiales contaminados (Saguil et al. 2019; Centers for Disease Control and Prevention, 2021c).

El periodo de incubación lleva entre 3 a 6 días y el paciente es más infeccioso durante la primera semana de la enfermedad. Se ha detectado virus activo en las heces de individuos que cursaron la enfermedad hasta unas 8 semanas desde iniciado el cuadro. La transmisión a nivel del núcleo familiar sucede en el 52% al 84% de los casos de infección con enterovirus A71. Si bien los adultos por lo general cursan infecciones asintomáticas, pueden desarrollar la enfermedad, e incluso, más frecuentemente, transmitir el virus en su entorno (Saguil et al. 2019).

En América del Norte y zonas templadas, los brotes de HFMD ocurren comúnmente desde la primavera hasta el otoño, aunque también son posibles durante el invierno, principalmente a partir de la emergencia de coxsackievirus A6 como agente causante de la enfermedad. En regiones de clima tropical, los brotes ocurren a lo largo de todo el año (Flett et al. 2012, Centers for Disease Control and Prevention, 2021c).

La HFMD ha recibido una gran atención en las últimas dos décadas, especialmente a nivel de la región de Asia-Pacífico, no sólo debido al reporte de grandes brotes, sino también porque lejos quedó el concepto de que se trataba de una infección viral leve con manifestaciones clínicas típicas que se resolvían espontáneamente al cabo de unos días y sin complicaciones. Hoy se sabe que la HFMD presenta características clínicas, epidemiológicas e incluso etiológicas muy distintas a las que presentó originalmente. De hecho, su importancia ha sido tal para algunos sistemas de salud, que, por ejemplo, China estableció un sistema nacional de vigilancia para la enfermedad a partir de 2008, (Xing et al. 2014) y otros países de la región Asia-

Pacífico han montado sistemas o desarrollado experiencias para el reporte de casos y su estudio correspondiente (González G et al. 2019, Nhu et al. 2021).

Esposito y Principi (2018) han resumido algunas características que han llevado al incremento en el interés por el estudio de la HFMD no sólo a nivel de las regiones endémicas, sino también en otras regiones donde la enfermedad ha mostrado ser emergente. En primer lugar, citan el incremento que ha habido en los últimos años de casos atípicos de la enfermedad, en conjunto con el reporte de infecciones en millones de niños. También explican, que ha suscitado un gran interés que algunos enterovirus involucrados clásicamente en enfermedades muy graves, puedan ser el agente etiológico también de HFMD. Por último, consideran que la asociación entre casos de HFMD y algunos problemas neurológicos y cardiorrespiratorios graves que, en algunos casos, han provocado la muerte, incrementa el interés por esta patología.

Si bien coxsackievirus A16 y enterovirus A71 han sido los dos enterovirus más frecuentemente vinculados a los cuadros de HFMD, (no sólo en la región de Asia-Pacífico, sino también a nivel mundial), el espectro de serotipos que han sido reportados como causantes de cuadros de HFMD es amplio, e incluye a los coxsackievirus A5, A6, A7, A9, A10, B2, B5, entre otros. Incluso, virus totalmente diferentes como pueden ser algunos adenovirus, han sido detectados durante el estudio de casos (Tapparel et al. 2013, Sousa et al. 2018b).

1.15.2. Primeros reportes

Durante la década de 1950 se consolidó el conocimiento acerca de la asociación de los coxsackievirus del tipo A con el cuadro clínico conocido como herpangina (Parrott et al. 1952; Jack & Chenoweth, 1958) pero aún restaba mucho por conocerse acerca de estos patógenos y su asociación con la gran diversidad de enfermedades desde las cuales se reportan hoy en día.

Hacia finales de junio y principios de julio del año 1957, un brote de enfermedad febril de corta duración, con características inusuales, tuvo lugar en los suburbios de la ciudad de Toronto, en Canadá (Robinson et al. 1958, 1961).

El brote afectó a unas 60 personas, las cuales presentaron inicialmente fiebre, malestar, y dolor de garganta y/o dolor en la cavidad oral en general. Casi el 80% de los afectados durante el brote presentó lesiones a nivel de orofaringe o fauces, las cuales consistían de enrojecimiento o úlceras en un ambiente de inflamación. Las úlceras estaban precedidas por vesículas que se desarrollaban a partir de pequeñas máculas rojas. Algunas vesículas ulceraban, mientras que otras se absorbían espontáneamente. A su vez, casi la mitad de los casos presentaron *rash* cutáneo, de forma maculopapular, y en aproximadamente el 25% de los casos se observó también un *rash* vesicular. Por lo general, las extremidades, manos y pies fueron las partes más afectadas.

Estos síntomas aparecieron en distintos porcentajes de individuos afectados, y en diferentes combinaciones. Además, se registraron síntomas respiratorios, gastrointestinales, conjuntivitis, o dolor de cabeza.

El brote afectó a individuos de ambos sexos y de todas las edades, aunque casi la mitad de estos pertenecía a la franja etaria de 1 a 4 años. La enfermedad era

altamente infecciosa, ya que afectó a 60 de los 115 miembros de los núcleos familiares involucrados en el brote (27 familias).

El estudio virológico realizado mediante inoculación de muestras a ratones lactantes o de aislamiento viral en cultivos celulares de riñón de mono, posibilitó junto a ensayos de seroneutralización con diferentes antisueros monotípicos, la identificación de cepas de coxsackievirus del tipo A16.

A este primer reporte de un brote de una enfermedad nueva, le siguieron reportes similares en 1959 en Birmingham, Inglaterra (24 casos) y en las Islas Británicas (69 casos) también con identificación de coxsackievirus A16 (Alsop et al. 1960). También en 1959, se reportó un brote de HFMD relacionado a CVA16 en California, en otros Estados del oeste de Estados Unidos, y en Hawai, con la particularidad de que un caso de los estudiados en California estuvo asociado a coxsackievirus A4 (Magoffin et al. 1961).

En 1960-1961, a partir del estudio de 7 casos similares a los descriptos anteriormente, ocurridos durante la temporada veraniega en Birmingham, en poblados aledaños y en la ciudad de Bristol (Inglaterra), se identificó la presencia de coxsackievirus A5 como agente causal de los mismos (Flewett et al. 1963).

Estos estudios pioneros demostrarían que la HFMD causaba cuadros similares en distintas poblaciones, con síntomas que podían incluir desde apenas algunos hasta una larga lista, de severidad variable, y lo más importante, fue posible comprender que varios coxsackievirus del tipo A (inicialmente) podían causar cuadros clínicos muy similares, apenas distinguibles unos de otros.

1.15.3. Cuadro clínico

1.15.3.1. Presentación clásica

La presentación clásica de la enfermedad se da como una afección febril autolimitada, acompañada de malestar, ulceración a nivel oral, que causa dolor de garganta o de la cavidad oral, y particularmente puede aparecer un exantema vesicular en las manos y en los pies. Inicialmente se registra una fiebre leve que se resuelve al cabo de unas 48 horas, acompañada por malestar, inapetencia y dolor de garganta. Al cabo de 1 a 2 días pueden comenzar a aparecer lesiones dolorosas en la boca (lengua, paladar, y mucosa). Máculas eritematosas de la cavidad oral evolucionan a vesículas que al reventarse causarán ulceraciones dolorosas (Repass et al. 2014).

Las lesiones y el dolor a nivel oral, puede causar molestia al alimentarse y beber líquidos, lo que puede llevar a la deshidratación. El *rash* cutáneo generalmente se manifiesta en las palmas de manos y plantas de pies, y en ocasiones también en nalgas y en la región genital (Aswathyraj et al. 2016).

Las lesiones en la piel típicamente son vesículas rodeadas de eritema, pero también pueden aparecer pequeñas máculas, pápulas, vesículas agrupadas, e incluso ampollas. Por lo general estas lesiones no son pruríticas, pero sí a menudo dolorosas. Es común que el individuo afectado presente sólo algunos de estos síntomas. Pasados los 7 a 10 días los cuadros por lo general se resuelven sin complicaciones (Nassef et al. 2015).

1.15.3.2. Presentación atípica

Si bien no ha sido posible establecer una correlación directa entre sintomatología y serotipo (Nassef et al. 2015), existe una sólida evidencia acerca del rol de coxsackievirus A6 en el incremento de casos atípicos de la enfermedad. No obstante, también hay reportes de casos atípicos asociados a coxsackievirus A16 (Huang et al. 2013, Sinclair et al. 2014; Esposito & Prinicipi, 2018; Horsten et al. 2018, Broccolo et al. 2019).

Los casos atípicos se caracterizan por presentar lesiones cutáneas con una distribución más amplia, involucrando el tronco y extremidades del paciente afectado (Figura 13). También, puede darse el “*eczema coxsackium*” con erosiones localizadas en áreas donde previamente hubo o está activa una dermatitis atópica. Otro síntoma posible de los cuadros atípicos, son las erupciones del tipo Gianotti Crosti, con lesiones distribuidas de manera acral en el rostro, brazos y piernas, pero relativamente separadas del tronco. Por último, también puede darse la aparición de signos de hemorragia en forma de petequias, o lesiones purpúricas. Las ampollas al parecer son más comunes en niños menores de 1 año, y petequias/ lesiones purpúricas y alteraciones en las uñas son más comunes en niños mayores de 5 años. El *eczema coxsackium* fue la presentación atípica más común en pacientes con historial de dermatitis atópica (Flett et al. 2012, Mathes et al. 2013, Sinclair et al. 2014).

Durante la caracterización de casos atípicos de HFMD, Sinclair et al. (2014) describieron lesiones semejantes al *eczema herpeticum* o a la varicela, así como también, Flett et al. (2012) describieron la aparición de erosiones superficiales con costra y vesículas simétricamente distribuidas en las regiones perioral y perianal, y en el dorso de las manos.

La aparición de líneas de Beau y onicomadesis, pueden también ocurrir, por lo general en una etapa tardía de la sintomatología de HFMD, o incluso varias semanas después de resolverse el cuadro. Las primeras son una especie de líneas horizontales en forma de crestas o surcos en la uña, y la segunda se caracteriza por una separación completa de la región proximal de la uña con respecto a su base (Nassef et al. 2015).

También puede darse la descamación de manos y pies, entre 1 a 3 semanas luego del inicio de la enfermedad (Mathes et al. 2013).

La similitud con cuadros eruptivos causados por otros virus, la aparición de sintomatología atípica para la cual muchas veces los pediatras no estaban acostumbrados a ver en la clínica, así como la prolongada duración de los síntomas, o incluso la aparición de síntomas tardíos, introdujeron nuevas dificultades al abordaje de esta enfermedad.

1.15.3.3. Complicaciones

Si bien un gran porcentaje de los casos de HFMD se resuelven sin complicaciones para el paciente, y no requieren hospitalización, existe la posibilidad de desarrollar

algunas complicaciones las cuales derivan de la infección del sistema nervioso central, y por lo general conlleva a un aumento en la gravedad del cuadro.

La meningitis aséptica, la AFP, y la encefalomiелitis (con o sin debilidad muscular) son las complicaciones más comunes. Cuando existe daño a nivel del tronco encefálico, tanto la desregulación autonómica, el edema pulmonar o el deterioro del miocardio, pueden conducir a la muerte (Solomon et al. 2010). Si bien, los cuadros complicados pueden resolverse y el paciente recuperarse, en la mayoría de los casos los pacientes desarrollan secuelas tales como deficiencias motoras y cognitivas (Huang et al. 2006, Chang et al. 2007).

Las complicaciones a nivel del sistema nervioso central, son casi que exclusivamente debidas a enterovirus A71 (Zhang et al. 2014, Huang et al. 2015), aunque en epidemias recientes, coxsackievirus A6 ha sido asociado hasta en el 18,2% de los casos de HFMD con complicaciones a nivel neurológico, así como también se han reportado casos de este tipo asociados a otros enterovirus, tales como coxsackievirus A10 (Lu et al. 2012, Hongyan et al. 2014, Li et al. 2014, Yang et al. 2014).

Un estudio epidemiológico realizado en China en el periodo 2008-2012 documentó unos 7,2 millones de casos de HFMD, de los cuales aproximadamente el 1,1% se trató de casos con complicaciones a nivel neurológico y cardiopulmonar. Se registraron unas 2.457 muertes (0,03%), identificando enterovirus A71 en el 91% de los decesos mediante análisis virológico en laboratorio (1.617/1.773) (Xing et al. 2014).

Según un estudio realizado por Chong et al. (2003), los casos graves asociados a enterovirus A71 podrían detectarse antes si se tiene precaución en pacientes con síntomas atípicos, recuento total de glóbulos blancos elevado, vómitos y ausencia de úlceras bucales. Otros signos tempranos relacionados a complicaciones del sistema nervioso central, son la letargia, agitación o irritabilidad, movimientos involuntarios, ataxia troncal, y movimiento rotatorio ocular sin fijación (Lu et al. 2004; World Health Organization, 2011).

Según un meta-análisis, la duración de la fiebre durante 3 o más días, temperatura corporal mayor o igual a 37.5°C, letargia, hiperglicemia, vómitos, conteo de neutrófilos elevado, infección por enterovirus A71, y los primeros años de vida, son factores de riesgo para desarrollar HFMD grave, con complicaciones (Fang et al. 2014).



Figura 13. Lesiones a nivel de la piel en casos atípicos de HFMD. En A-C se observan imágenes de niños afectados durante un brote que tuvo lugar en Boston (Estados Unidos) durante el invierno de 2012. Las imágenes D-F corresponden a casos también atípicos reportados en Dinamarca durante 2014-2016. Obsérvese la presentación clínica con lesiones más allá de las manos, pies y la boca, como la espalda, extremidades, y región perianal. En la imagen F se observa la aparición de onicomadesis, lo cual ocurrió varias semanas después de la remisión de la erupción cutánea. Coxsackievirus A6 fue identificado como responsable de todos estos casos. Para una descripción más detallada de las manifestaciones clínicas, visitar los artículos originales desde donde fueron obtenidas y modificadas las imágenes: Flett et al. (2012), doi: 10.3201/eid1810.120813 (imágenes A-C) y Horsten et al. (2018), doi: 10.2340/00015555-2853 (imágenes D-F).

1.15.4. Antecedentes de estudio en la región

La HFMD no es de notificación obligatoria en la mayoría de los países sudamericanos, y por lo tanto no existe una vigilancia activa de casos esporádicos o brotes a nivel de laboratorio.

Los antecedentes de la enfermedad en la región sudamericana no son recientes (Aguirrezabala et al. 1973; Pons, 1977; Moreira et al. 1995, Russo et al. 2006), aunque desde hace menos de 10 años ha aumentado el número de publicaciones abordando este tipo de cuadros clínicos, su descripción, y la identificación del agente causante.

En Brasil, se estudiaron 75 casos de HFMD reportados entre 2009 y 2016 en los estados de Amapá, Bahía, Paraná, Rio Grande do Sul, y Rio de Janeiro, a partir de muestras de heces y sueros de individuos de edades entre 5 meses a 50 años (promedio 4.7 años). Se identificó a coxsackievirus A16 y A6 como los dos enterovirus más frecuentemente detectados (57% y 16%, respectivamente). Además, se detectó echovirus 25, y coxsackievirus A2 en tres casos. Hasta 2012 únicamente se detectó CVA16, y en los años siguientes, por lo general se detectó más de un único serotipo asociado a los casos estudiados en cada Estado (Sousa et al. 2018b).

A su vez, en 2012 se registró un caso de HFMD asociado a EV-B74 en un niño de un año de edad residente en el estado de Paraná, el cual presentó un cuadro de fiebre e irritabilidad conjuntamente con un rash papulovesicular en palmas, boca y plantas de pies, así como lesiones en las nalgas (Sousa et al. 2018a).

Un estudio reciente documentó la ocurrencia de distintos brotes de HFMD en diferentes distritos del Estado de Pará durante el primer semestre de 2019, realizando la detección de enterovirus en el 83% de las muestras obtenidas (heces, suero, hisopados nasofaríngeos y de lesiones en piel) de individuos afectados durante estos eventos (40/48).

El 55% de las muestras provenía de individuos de edades entre 12 y 36 meses, aunque el total de muestras representaba edades entre 10 meses a 15 años.

La mayoría de los casos fueron atípicos, con una presentación de exantema vesículo-ampolloso, lesiones en rostro, extremidades (rodillas y/o codos), nalgas y muslos, por aproximadamente unas dos semanas. Se reportó descamación de palmas y plantas de pies en el 90% de los individuos con detección de enterovirus. En el 30% de los individuos enterovirus-positivos se constató onicomadesis como una manifestación clínica tardía, al aparecer unos 14 días de haber iniciado el cuadro, y prolongándose por unos 20 días.

Se logró la tipificación en 22 de los casos positivos, identificando coxsackievirus A6 en 18 individuos (14 desde heces y 4 desde lesiones de piel), coxsackievirus B5 en 2 individuos, y coxsackievirus A4 y enterovirus C116 en un individuo, cada uno (Justino et al. 2020).

Por otro lado, en Argentina, fueron documentados dos brotes de casos atípicos de HFMD que ocurrieron en setiembre-octubre de 2015 en una localidad rural de la provincia de Chubut, y en noviembre del mismo año en una localidad de la provincia de San Luis.

El primer brote involucró 14 casos (edades en el rango de 2 a 28 años, promedio 10 años), con presentación de fiebre con 48 horas de evolución y la erupción erosiva vesículo-ampollosa característica, que en principio afectó palmas y plantas de pies. En menor medida, el rash afectó pliegues de grandes articulaciones, mejillas, y región perianal, y en algunas ocasiones el cuerpo entero. Varios pacientes presentaron onicomadesis. El segundo brote afectó a 12 individuos (edades en el rango de 1 a 58 años, promedio 12 años) los cuales presentaron síntomas también de casos atípicos de HFMD.

El estudio de 8 muestras de heces correspondientes al brote de Chubut, y 5 muestras de heces del brote de San Luis permitió identificar mediante RT-PCR, secuenciación y análisis filogenético de la región codificante de VP1, la presencia de coxsackievirus A6 en 5 y 4 muestras, respectivamente. A su vez, las cepas en cuestión fueron clasificadas como pertenecientes al linaje genético predominante a nivel mundial (Cisterna et al. 2019).

En 2018, se detectó un coxsackievirus A6 altamente relacionado con las cepas responsables de estos brotes, a partir del estudio de un caso atípico presentado por un niño de 4 años admitido en un Hospital de Niños de Buenos Aires (Sapia et al. 2020). Ello brindó indicios de una circulación sostenida en el tiempo, con detección en tres puntos geográficos distantes en el territorio argentino.

1.15.5. Antecedentes en Uruguay

En Uruguay, la primera observación de la enfermedad fue publicada en la revista Archivos de Pediatría del Uruguay en 1973 (Aguirrezabala et al. 1973), relatando el estudio de un caso pediátrico de la enfermedad, que afectó a un niño residente en Montevideo, de 3 años de edad.

El cuadro clínico se inició con fiebre, malestar general y anorexia, con aparición de un enanema eritematoso al cabo de tres días, que se tornó rápidamente vesicular, fundamentalmente en mucosa vestibular. Concomitantemente, apareció un exanema de iguales características en palmas de manos y plantas de pies. Existían unos pocos elementos dispersos en el dorso de la mano y antebrazo, tratándose de vesículas perladas de contenido opalescente, sin base indurada, rodeadas de halo rojizo. La evolución del cuadro se dio en unos 7 días, sin evidencia de anomalías sobreagregadas.

Se tomó material de las vesículas y se realizó un hisopado rectal, utilizados luego para el aislamiento viral en cultivo celular, infección de ratones lactantes, y ensayos de sero-neutralización. Si bien los autores del trabajo pudieron reconocer la presencia de un virus como causante del cuadro clínico, y lo asociaron a un coxsackievirus-A, no fue posible identificar el tipo de coxsackievirus-A en cuestión. Desde entonces, y hasta donde nuestro conocimiento nos permite afirmar, no han sido realizados estudios que intenten identificar el agente causante de los casos de HFMD que ocurren en Uruguay, a pesar que, en varias oportunidades, a través de la prensa local, o desde el Programa de Vigilancia Epidemiológica del Ministerio de Salud Pública se ha alertado a la población sobre la ocurrencia de brotes, principalmente en instituciones educativas o de cuidado de la primera infancia.^{20 21}

22 23

²⁰Portal 180 (año 2014): http://180.com.uy/articulo/50105_Mayor-numero-de-casos-del-virus-mano-pie-boca

²¹Diario Cambio (año 2014): <https://diariocambio.com.uy/2014/08/23/msp-alerta-por-brote-del-sindrome-mano-pie-boca-locales/>

²²Ministerio de Salud Pública (2018): <https://www.gub.uy/ministerio-salud-publica/comunicacion/comunicados/sindrome-mano-pie-boca>

²³El Telégrafo (año 2019): <https://www.eltelegrafo.com/2019/05/ninos-menores-de-5-anos-afectados-por-la-enfermedad-de-manos-pies-y-boca/>

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GENERAL

Conocer la diversidad de enterovirus en distintas ciudades de Uruguay y Argentina mediante el estudio de muestras de agua residual y muestras clínicas provenientes de brotes de HFMD.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Describir la diversidad de enterovirus humanos que circularon en las aguas residuales de distintas ciudades de Uruguay y Argentina mediante la secuenciación de un segmento codificante de la proteína VP1 utilizando *next-generation sequencing*.
- Identificar la circulación de poliovirus en Uruguay mediante el estudio de muestras de agua residual colectadas durante la utilización de OPV.
- Evaluar la viabilidad de enterovirus presentes en muestras seleccionadas de agua residual mediante su inoculación en cultivo de líneas celulares.
- Caracterizar filogenéticamente las cepas de interés detectadas en el marco de esta tesis, en un contexto de circulación regional.
- Describir las características de los brotes de HFMD ocurridos en Uruguay, y caracterizar los enterovirus responsables de los mismos.
- Conocer la relación genética existente entre las cepas de enterovirus detectados a partir del estudio de muestras clínicas y aquellas que han circulado previamente en el agua residual.
- Generar la capacidad y herramientas que potencien el diseño e implementación de un programa de vigilancia ambiental de enterovirus en Uruguay.

3. COLABORACIONES ACADÉMICAS QUE POTENCIARON ESTA TESIS

Esta tesis fue realizada desde el Laboratorio de Virología Molecular del Centro Universitario Regional Litoral Norte de la Universidad de la República, en el marco de una colaboración académica junto a otras Instituciones de la región sur de Sudamérica, con el principal objetivo de lograr una descripción de la diversidad de enterovirus que circulan o han circulado en la región, a partir del estudio de colecciones de muestras de agua residual que distintos laboratorios poseían, así como también a partir de nuevas colectas que realizamos en distintas ciudades de Uruguay.

Desde la Cátedra de Virología de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad de Buenos Aires y el Laboratorio de Gastroenteritis Virales y Sarampión del Instituto de Virología Dr. J.M. Vanella, de la Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad Nacional de Córdoba, aportaron muestras de agua residual que formaban parte de sus colecciones, participando además en las distintas etapas de análisis de resultados y discusión durante la elaboración de los manuscritos que fueron enviados para su publicación.

Una vez que se obtuvieron los resultados de la secuenciación con Illumina, se trabajó en colaboración con la Unidad de Genómica y Bioinformática del CENUR Litoral Norte, y junto a dicho grupo se definió el *pipeline* para el procesamiento bioinformático y análisis de los datos obtenidos.

Estas colaboraciones académicas, posibilitaron que esta tesis pudiera enfocarse en una descripción de los enterovirus que circulan más allá de las fronteras de Uruguay, especialmente en dos importantes ciudades de gran influencia para la región como lo son Córdoba y Buenos Aires.

Parte de los resultados obtenidos en esta tesis fue posible gracias a la apertura que tuvo el Laboratorio de Enterovirus del Instituto Oswaldo Cruz de la Fundación Oswaldo Cruz de Río de Janeiro, en el cual fueron realizadas dos pasantías de dos meses de duración, que posibilitaron la obtención de importantes resultados en etapas iniciales de esta tesis. Dichas pasantías además constituyeron instancias de capacitación y entrenamiento para la detección y diferenciación intratípica de poliovirus utilizando el algoritmo propuesto por la OMS y empleado por toda la GPLN.

Si bien el proyecto original de esta tesis abarcaba exclusivamente el estudio de enterovirus a partir de muestras de agua residual, durante la realización del mismo, ocurrieron brotes de HFMD en algunas de las ciudades uruguayas desde las cuales habíamos colectado agua residual, y mediante la coordinación y colaboración con el Departamento de Vigilancia Epidemiológica del Ministerio de Salud Pública y sus referentes departamentales, y tras el aval de un Comité de Ética (ANEXO 1), accedimos al estudio de estos brotes, detectando y caracterizando la presencia de enterovirus como los virus causantes de los casos clínicos. Ello nos permitió obtener información relevante acerca de algunos de los enterovirus, más allá de lo observado a partir del estudio de agua residual, así como caracterizarlos en un contexto de circulación regional.

4. RELEVANCIA

Los enterovirus han significado siempre una complicación para la salud humana al estar asociados a múltiples y diversas enfermedades. Únicamente existen vacunas para poliovirus, y más recientemente para enterovirus A71, sin embargo, múltiples enterovirus pueden generar los cuadros clínicos que éstos dos virus generan, sin que existan vacunas para prevenirlos.

En esta tesis, demostramos que existe una gran diversidad y una amplia circulación a nivel de Sudamérica de al menos 47 enterovirus distintos, algunos aparentemente endémicos y otros de introducción reciente en nuestra región, sin evidencia de dispersión regional, para los cuales sabemos que han ocasionado importantes problemas para la salud pública desde su emergencia en otras partes del planeta.

El abordaje de wastewater-based epidemiology mediante next-generation sequencing que desarrollamos durante esta tesis, podrá ser empleado en otros países de la región con el objetivo de conocer cuáles enterovirus están afectando a sus poblaciones. No sólo se generó información a nivel de Uruguay y de Argentina durante el desarrollo de este proyecto, sino que también se establecieron colaboraciones académicas que además de fortalecer el trabajo de los distintos grupos de investigación, también potenciaron perspectivas de trabajo en conjunto a nivel regional.

Con respecto a la HFMD, después de casi 50 años de que se realizara la primera descripción de la misma en Uruguay, esta tesis constituye la primera identificación de los enterovirus asociados a brotes que ocurrieron en el país. La HFMD es un problema importante en otras regiones del planeta, y comienza a serlo también en nuestra región, donde al parecer está siendo emergente, con presentación de casos principalmente asociados a coxsackievirus A6.

Relacionado a ello, la tesis es un ejemplo de cómo se puede integrar la información obtenida desde la vigilancia clínica, con aquella obtenida desde la vigilancia ambiental, para poder conocer en profundidad de qué manera circulan los enterovirus en una población, y potenciar el estudio de las diversas variantes desde aspectos moleculares, o evolutivos, con mayores insumos que los disponibles cuando únicamente un tipo de vigilancia (clínica o ambiental) es realizada.

5. RESULTADOS

Los resultados de esta tesis se mostrarán en su mayoría en formato de artículo científico al haberse logrado durante el transcurso de la misma un total de 6 publicaciones en revistas científicas internacionales arbitradas entre pares e indexadas en distintas bases de datos. Adicionalmente, se presentan algunos resultados que no han sido publicados, como complemento de algunos de los artículos, o al finalizar esta sección, como insumos para un séptimo artículo en construcción.

5.1. Artículos científicos generados durante esta tesis que fueron publicados en revistas científicas internacionales arbitradas entre pares e indexadas

5.1.1.

Artículo 1 “An environmental surveillance in Uruguay reveals the presence of highly divergent types of human enterovirus species C and a high frequency of species A and B types”.

Año: 2018

Revista: Food and Environmental Virology

El primer artículo publicado en el marco de esta tesis presenta los resultados de una exploración inicial que se realizó para evaluar la factibilidad de detectar enterovirus en muestras de agua residual que habían sido colectadas durante el periodo 2011-2013 en las ciudades uruguayas de Bella Unión, Salto, Paysandú, Fray Bentos, Melo y Treinta y Tres, y que permanecían conservadas a -20°C al momento de realizar el estudio.

Se emplearon distintos volúmenes de agua residual (o de efluente de una laguna de estabilización en el caso de Bella Unión), realizando el proceso de concentración viral mediante el método de adsorción-elución a una membrana cargada negativamente para obtener un concentrado de 4 ml para cada muestra.

Para las ciudades de Bella Unión, Salto, Paysandú y Fray Bentos (región oeste de Uruguay) se trabajó con 12 muestras por cada ciudad, compuesta cada una por dos alícuotas representativas de distintos momentos de un mismo mes, y cuyas colectas se realizaron quincenalmente entre marzo de 2011 y febrero de 2012. Para las ciudades de Melo y Treinta y Tres (región este de Uruguay), se trabajó con 10 muestras por cada ciudad, colectadas aproximadamente cada dos meses entre setiembre de 2011 y abril de 2013. Se analizaron 68 muestras en total.

Todas las muestras fueron procesadas para la cuantificación de enterovirus humanos mediante la utilización de una RT-qPCR dirigida a la región 5'UTR y utilizando como molde el ARN extraído desde el concentrado viral.

A su vez, todas las muestras fueron procesadas para la detección de un fragmento codificante de la proteína VP1 mediante una RT-*nested*-PCR y en aquellas muestras que resultaron positivas, se secuenció mediante el método de Sanger, el fragmento en cuestión, para su posterior análisis filogenético.

La concentración de enterovirus estuvo en el rango entre 4,9 y 6,6 Log10 copias genómicas por litro. Considerando ambos métodos (RT-qPCR y RT-*nested*-PCR), se detectó la presencia de enterovirus en el 61,8% (42/68) de las muestras, pudiendo amplificar el fragmento codificante de VP1 en el 90,5% (38/42).

La secuenciación permitió realizar la tipificación de 10 enterovirus presentes en el 81,6% (31/38) de las muestras, evidenciando la presencia de echovirus 6 (8 muestras), coxsackievirus A16 (8 muestras), coxsackievirus A2 (3 muestras), coxsackievirus B5 (3 muestras), coxsackievirus A22 (dos muestras), coxsackievirus B1 (2 muestras), echovirus 5 (dos muestras) y de echovirus 9, coxsackievirus A13 y enterovirus C99 en una muestra cada uno.

El grado de similitud de las cepas detectadas y caracterizadas en nuestro estudio con respecto a cepas descriptas en otras partes del mundo tomó valores dentro de lo esperado, aunque para algunos tipos de la especie C, se observó que las cepas uruguayas diferían bastante a nivel nucleotídico con respecto a lo que se había reportado globalmente con anterioridad (rango de 20,4 a 22,5%, o de 16,6 a 20% para coxsackievirus A13, y enterovirus C99, respectivamente).

También se observó que, si bien la mayoría de los enterovirus fueron detectados de manera esporádica, coxsackievirus A16 y echovirus 6 fueron detectados consecutivamente entre mayo-octubre y noviembre-marzo, respectivamente, al considerar la región oeste del país.

Una vez que se detectó la presencia de enterovirus en 42 muestras, se realizó una pasantía en el Laboratorio de Enterovirus del Instituto Oswaldo Cruz de la Fundación Oswaldo Cruz de Río de Janeiro, Brasil, durante la cual se evaluó la viabilidad de los enterovirus contenidos en las muestras mediante su inoculación en el sistema de células RD y L20B, sistema ampliamente utilizado para la vigilancia clínica y ambiental de poliovirus. El propósito además de esta pasantía era la utilización del algoritmo propuesto por la OMS para la detección de polio a partir de muestras ambientales, ya que estas correspondían mayormente a un periodo en que en Uruguay se utilizaba la vacuna atenuada OPV, y nos interesaba la detección y caracterización de cepas que circulaban en el ambiente.

Del total de muestras inoculadas en células RD, únicamente 4 (10%) desarrollaron efecto citopático, y al realizarse pasaje a células L20B los aislados no desarrollaron efecto citopático en estas células. La amplificación, secuenciación y análisis filogenético del fragmento codificante de VP1 de estos aislados, permitió constatar que se trataba de tres cepas de echovirus 6 (estrechamente relacionadas a los echovirus 6 detectados directamente desde el agua residual) y de una cepa de coxsackievirus B3. La ausencia de detección de poliovirus a partir de muestras de agua residual colectadas durante los periodos de vacunación con OPV se discute en el artículo, entendiéndose que son varios los factores involucrados, especialmente aquellos que inciden en la baja sensibilidad de la vigilancia ambiental tal como fue planteada.



An Environmental Surveillance in Uruguay Reveals the Presence of Highly Divergent Types of Human Enterovirus Species C and a High Frequency of Species A and B Types

Andrés Lizasoain¹ · Fernanda M. Burlandy² · Matías Victoria¹ · Luis F. López Tort¹ · Edson E. da Silva² · Rodney Colina¹

Received: 27 March 2018 / Accepted: 12 June 2018
© Springer Science+Business Media, LLC, part of Springer Nature 2018

Abstract

Information about Human Enterovirus circulation in Uruguay is scarce. The aim of this study was to generate the first description about their circulation in the country through the study of sewage samples collected before and after the switch from Oral Poliovirus Vaccine to Inactivated Poliovirus Vaccine. Viruses were concentrated by an adsorption–elution to a negatively charged membrane, and real-time quantitative PCR and qualitative PCR methods were used to detect, quantify, and characterize enteroviruses. Positive samples were inoculated in RD cells and two passages were performed. Additionally, RD+ samples were subsequently passed onto L20B cells. Human Enteroviruses were detected in 67.6% of the samples, with concentrations between 4.9 and 6.6 Log₁₀ genomic copies per liter. 10% of positive samples replicated in RD cells, of which none in L20B cells. Molecular characterization of Human Enterovirus strains directly detected from sewage sample concentrates allowed the identification of highly divergent members of species C such as Enterovirus C99 and Coxsackievirus A13, as well as the frequent detection of species A and B members (particularly Coxsackievirus A16 and Echovirus 6, respectively). Other detected types were Coxsackievirus A2, A22, B1, B5, Echovirus 5, and 9. The characterization of viruses isolated in cell culture revealed the presence of Echovirus 6 and Coxsackievirus B3. Despite the absence of poliovirus, a wide circulation of different enterovirus types was evidenced in Uruguayan sewage samples, highlighting that the local populations are exposed to different kinds of diseases originated by several human enterovirus.

Keywords Enterovirus · Coxsackievirus · Echovirus · Uruguay · Sewage

Introduction

Human Enteroviruses (HEVs) are classified into four viral species (HEV-A to HEV-D) inside the genus *Enterovirus*, *Picornaviridae* family (Knowles et al. 2011). The virions are non-enveloped, with an icosahedral symmetry of approximately 30 nm of diameter, containing a single-stranded positive-sense RNA genome about 7.5 kb in length with 5' and 3' Non-Coding Regions (NCRs) flanking a unique Open

Reading Frame (ORF). A single polyprotein is translated from the ORF, followed by proteolytic cleavages generating capsid (VP1–VP4) and non-structural (2A–2C, and 3A–3D) proteins such as protease and RNA-dependent RNA polymerase (Pallansch et al. 2013).

While HEVs usually cause silent or subclinical infections (Witsø et al. 2007), they are associated with a wide spectrum of clinical manifestations. HEVs could be responsible from a common cold or minor febrile illness to severe diseases as hand foot and mouth (HFMD) disease, acute hemorrhagic conjunctivitis, acute myocarditis, aseptic meningitis, encephalitis, cardiac disease, severe neonatal sepsis-like disease, or acute flaccid paralysis (AFP) (Blondel et al. 2005; Muehlenbachs et al. 2015). The ratio of number of diseases cases to number of infections depends on the HEV serotype (Nathanson and Kew 2010) and reported cases of infection represent a small proportion of infected people in a community (Hovi et al. 1986).

✉ Rodney Colina
rodneycolina1@gmail.com

¹ Laboratorio de Virología Molecular, CENUR Litoral Norte, Sede Salto, Universidad de la República, Gral. Rivera 1350, 50000 Salto, Uruguay

² Laboratório de Enterovírus, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Avda. Brasil 4365, Rio de Janeiro 21040-360, Brazil

HEV classification was initially based on antigenicity, biological activity, and disease, grouping them into Coxsackievirus A (CVA), Coxsackievirus B (CVB), Poliovirus (PV), and Echovirus (E). Nevertheless this scheme collapsed when new emerging viruses with different serological characteristics to those already described were discovered, and as a consequence they were numbered starting from EV68 (Pallansch et al. 2013).

Afterwards, the molecular typing overcame the difficulties of the EV typing old scheme and helped to establish a new classification system. In fact, nucleotide sequence of VP1 coding segment correlates well with enterovirus serotype and members of the same serotype usually share more than 75% identity at nucleotide level (85% at amino acid level) in this region of the genome (Oberste et al. 1999; Oberste and Pallansch 2005). Up to date it has been identified 3 PV, 21 CVA, 6 CVB, 28 E, and 48 numbered EV types (The Pirbright Institute 2018).

Since HEVs replicate in the gastrointestinal tract and are shed in huge concentrations in feces from both asymptomatic and symptomatic individuals, the fecal–oral route is the main route of transmission (Hovi et al. 2012). This leads to human feces from sewage being the major source of HEVs in the environment, spreading to other environmental water matrixes like lakes, rivers, or seas (Connell et al. 2012; Allmann et al. 2013; Prevost et al. 2015).

Nevertheless, structural stability of HEVs in the environment allows the study of sewage samples with the aim to describe the epidemiology of them in the human population, which excretes feces to sanitary sewer network (Global Polio Eradication Initiative 2015).

Environmental surveillance is an effective approach investigating circulation of HEVs in several communities (Wieczorek et al. 2011; Battistone et al. 2014; Tao et al. 2016; Farías et al. 2018) and provides supplementary information when clinical cases reports are absent or are carried out under poor-quality standards. Several countries, both for early detection of wild PV (WPV) introduction and transmission as well as for detection of vaccine-derived neurovirulent polioviruses (VDPVs) that emerge following the use of Oral Poliovirus Vaccine (OPVs), implemented this approach.

In Uruguay, the available information about the circulation of HEVs in the population is scarce and proceed from the study of meningitis and encephalitis of viral origin as well as the AFP, which constitute notifiable diseases to the public health authorities (Uruguayan Government 2012). Uruguay reported the last case with isolation of WPV in 1978 and certified the elimination of paralysis cases due the virus in 1994, jointly with the Americas (de Quadros et al. 1997). Since then, Uruguay never registered cases of paralysis by VDPVs, despite the utilization of the trivalent OPV up to May 2012, when the attenuated vaccine was completely

replaced by the Inactivated Poliovirus Vaccine (IPV) in the National Calendar of Vaccination.

Beyond meningitis, encephalitis, and acute flaccid paralysis, and up to our best knowledge, Uruguay lacks a HEV surveillance system and the etiological agent of most aforementioned diseases remains unknown.

This work attempts to generate a base line of information about the HEV circulation in Uruguay, conducting a retrospective study of sewage samples collected in different cities, mainly during the OPV vaccination period.

Methods

Environmental Samples

This is a retrospective study of two sets of environmental samples (42 ml each) collected in Uruguay between 2011 and 2013. Set One was composed of 96 sewage grab samples obtained bi-weekly between March 2011 and February 2012 from four cities located at the western region of the country (Bella Unión [BU], Salto [SA], Paysandú [PY], and Fray Bentos [FB] cities). In Bella Unión, samples were collected downstream of a stabilization pond, while in the other cities untreated sewage was collected. Set Two was composed of 20 composite sewage samples (24 h) collected bi-monthly between September 2011 and April 2013 from the influent of two sewage treatment plants located in two cities from the eastern region of the country: Melo (ME) and Treinta y Tres (TT). For Set One, samples from each month and each city were pooled reducing the 96 initial samples to 48 samples of 84 ml each. Samples were stored at -20°C from the collection data until the virological analysis.

Internal Process Control

Before viral concentration, 4.80×10^9 genomic copies of a PP7 bacteriophage were inoculated in each sample as an Internal Process Control (IPC) (Rajal et al. 2007).

Viral Concentration

Viral particles were concentrated using a protocol of adsorption/elution to a negatively charged membrane described by Katayama et al. (2002) with modifications (Haramoto et al. 2009). Briefly, MgCl_2 was added to the sample to a final concentration of 25 mM before filtering through a type HA negatively charged membrane with a diameter of 47 mm and a pore size $0.45\text{ }\mu\text{m}$. The membrane was rinsed with 200 ml of 0.5 mM H_2SO_4 (pH 3.0) and placed into a petri dish where the elution of viruses was performed by stirring with 4 ml of 1 mM NaOH (pH 10.8) for 10 min. To neutralize

the solution, 40 µl of 50 mM H₂SO₄ and 40 µl of 100X TE Buffer (pH 8.00) were added.

The concentrated sample was centrifuged for 20 min at 4000×g to clarify, and the supernatant was stored at −20 °C for further analysis.

RNA Extraction and cDNA Synthesis

The RNA extraction was performed from 200 µl of viral concentrate using the QIAamp cadzor Pathogen Mini Kit (Qiagen) according to the manufacturer's instructions to obtain 60 µl of RNA extracted solution. cDNA synthesis with random hexamers (Thermo Fisher Scientific) and gene-specific primers were carried out, depending on the PCR protocols requirements, from 10 µl of extracted RNA using the ReverTaid Reverse Transcriptase (Thermo Fisher Scientific).

For gene-specific cDNA synthesis, primers AN32, AN33, AN34, and AN35 (Nix et al. 2006) were used at a final concentration of 0.4 µM each and dNTPs were used in a concentration of 1000 µM each. Random hexamers at a final concentration of 2.0 ng/µl were used for random cDNA synthesis.

Real-Time PCR for the IPC and for Human Enteroviruses

Real-time PCRs were carried out with TaqMan technology and reactions were performed in duplicated with 2X Sensi Fast Probe No Rox Kit (Bioline Reagents) in a Rotor-Gene Q instrument (Qiagen) following manufacturer's instructions.

The PP7 genomic detection was performed with 247F and 320R primers towards the helicase coding segment (Rajal et al. 2007).

Quantification of HEVs was achieved using rRT-R and rRT-F primers (Oberste et al. 2010) towards the 5' NCR region of the enterovirus genome with a standard curve performed with serial dilutions (10⁶–10⁰) of a plasmid containing the fragment of the expected size as an insert.

Each reaction of PP7 detection and HEV quantification was performed from five microliters of random cDNA.

Human Enterovirus Molecular Characterization

The HEV molecular characterization was carried out by a qualitative PCR towards the VP1 capsid protein coding segment with the pair of primers 222/224 and AN88/AN89 described by Nix et al. (2006) in the first- and second-round PCRs, respectively. First-round PCR reaction was performed from 5.0 µl of gene-specific cDNA, and second-round PCR reaction was performed from 2.0 µl of first-round PCR product, with 2X Mango Mix (Bioline Reagents) following the manufacturer's instructions.

Second-round PCR products were resolved in a 2% agarose gel electrophoresis and the expected size amplicons (~350 bp) were excised from the gel and purified with the Quick Gel Extraction and PCR Purification Combo Kit (Invitrogen™). Macrogen Inc. (Korea) performed DNA sequencing with primers AN88 and AN89. Sequences were curated with BioEdit Sequence Alignment Editor (Hall 1999) and aligned with Clustal W tool with reference sequences and sequences reported elsewhere retrieved from the GenBank database in Mega 6.0 software (Tamura et al. 2013).

Phylogenetic analyses were performed with Mega 6.0 software using the Neighbor-Joining method and Kimura two-parameter model (Tamura et al. 2013). As a measure of robustness of each node, the bootstrap method with 1,000 pseudo replicates was used. The sequences obtained in this study were submitted to the GenBank database with the accession numbers MF093652–MF093682 and MF537000–MF537003.

Human Enterovirus Isolation by Cell Culture

In order to know the viability of the detected viral particles, viral concentrates corresponding to positive samples were assayed in cell culture, performing the infection of RD (human rhabdomyosarcoma) cells. Each inoculum was vortexed with chloroform (1:1 v/v) by 2 min followed by a centrifugation step at 4000×g for 10 min. 0.3 ml of the upper phase was inoculated onto 25 cm² flask with 80% confluent RD cell monolayer. After 5 days of incubation (36 °C, 5% CO₂) and daily observation, second passages were performed. Those HEVs which replicate in RD cells were subsequently passed (two passages) onto L20B cells (mouse fibroblast cells that express the human poliovirus receptor) in order to allow the isolation of possible PV present in the sample.

RD (NIBSC Accession Number 081003) and L20B (NIBSC Accession Number 081102) cell lines were provided by the WHO Global Polio Laboratory Network (GPLN). Cell culture procedures were performed according to WHO guidelines (World Health Organization 2004).

Molecular Characterization of Human Enterovirus Isolates

One hundred and forty microliters of supernatant (after three cycles of freezing/thawing) of samples showing cytopathic effect were subject to RNA extraction with QiAmp Viral RNA Kit (Qiagen). The molecular characterization of isolates was performed following the protocol designed by Nix et al. (2006) as described above.

Results

Human Enterovirus Detection and Quantification

The IPC was detected in all samples through a TaqMan real-time PCR assay.

HEVs were detected in 42 samples (61.8%), of which four samples (9.52%) were determined as positive by qPCR towards 5' NCR segment, 11 samples (26.2%) by qualitative PCR towards VP1 coding segment, and 27 (64.3%) were determined as positive by both methods.

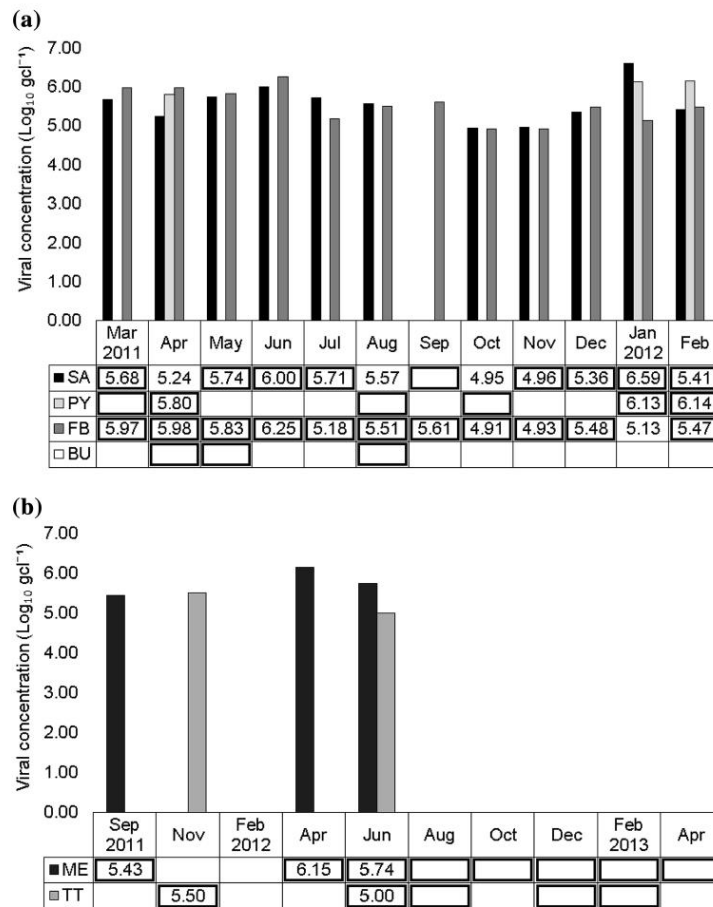
Viral concentration ranged between 4.9 and 6.6 Log₁₀ genomic copies per liter (Log₁₀ gcl⁻¹) presenting average

values of 5.3 in Treinta y Tres, 5.5 in Fray Bentos, 5.6 in Salto, 5.8 in Melo, and 6.0 in Paysandú. In Bella Unión, three samples were positive by qualitative PCR, although none of them was positive by qPCR (Fig. 1).

Human Enterovirus Isolation in Cell Culture

All the positive samples ($n=42$) were assayed in cell culture. HEVs were isolated in RD cells in four (~10%) samples from Salto (March 2011), Treinta y Tres (November 2011), Paysandú (February 2012), and Melo (April 2012). None of these four samples presented characteristic cytopathic effect of poliovirus in L20B cells.

Fig. 1 Presence and concentration of Human Enteroviruses in sewage samples collected in cities from the western (a) and eastern (b) regions of Uruguay between March 2011 and April 2013. *BU* Bella Unión, *SA* Salto, *PY* Paysandú, *FB* Fray Bentos, *ME* Melo, and *TT* Treinta y Tres. Thick squares in the grid indicate samples in which Human Enteroviruses were detected by qualitative PCR towards VP1 segment (Nix et al. 2006). Values of concentration are expressed as Log₁₀ of genomic copies per liter and are result of a qPCR towards the 5' NCR in the enterovirus genome (Oberste et al. 2010)



Sequencing and Phylogenetic Analysis

Sequences were obtained from 31 strains out of 42 qualitative PCR-positive samples and from the four strains isolated in RD cells, and were used in phylogenetic reconstructions.

As Fig. 2 shows, 11 strains were identified as belonging to HEV-A, 20 strains to HEV-B, and 4 strains to HEV-C, while HEV species D was not detected.

Regarding HEV-A (Fig. 2a), CVA2 and CVA16 were detected in three and eight samples, respectively. CVA16 Uruguayan strains clustered all together with a bootstrap support of 92% and a high degree of similarity among them (Table 1). On the other hand, CVA2 Uruguayan strains clustered into two distinct groups (~70% bootstrap support) with up to 15% of divergence at nucleotide level among them and

with strains reported elsewhere (Table 1). The 20 strains of HEV-B (Fig. 2b) correspond to CVB1 (two strains), CVB3 (one strain), CVB5 (three strains), E6 (11 strains), E5 (two strains), and E9 (one strain) types. CVB5 and E6 Uruguayan strains were the most divergent HEV-B types and strains of each type clustered in two distinct groups. An Uruguayan CVB5 strain (MF093668) clustered outside of the other Uruguayan CVB5 strains (100% bootstrap support) presenting up to 8.6 and 3.9% of nucleotide and amino acid diversity with them (Table 1). The divergence among the Uruguayan E6 strains reached values up to 4.8 and 2.9% at nucleotide and amino acid level, respectively, and clustered into two distinct groups (100% bootstrap support). The most numerous group also contain E6 strains reported in 2009–2011 in Finland, Denmark, and Netherlands.

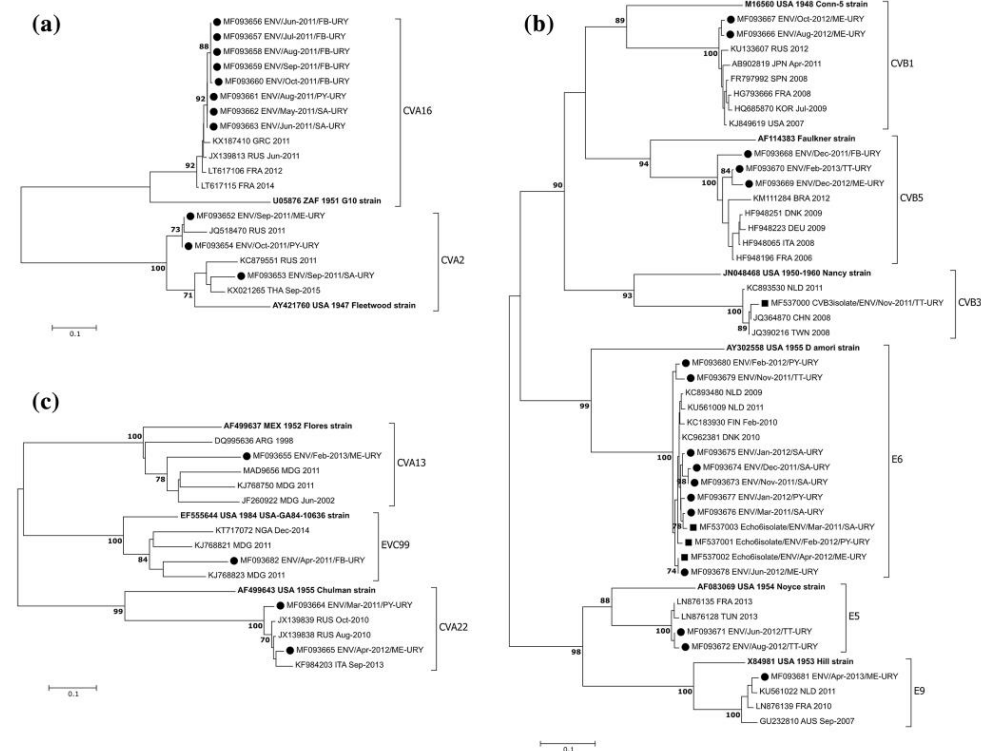


Fig. 2 Phylogenetic analysis of Human Enterovirus strains detected in Uruguayan sewage samples based on partial sequences of the VP1 coding segment. Phylogenetic trees for Human Enterovirus species A, B, and C are shown in a–c, respectively. Black circles or squares represent Uruguayan strains when characterized directly from sewage

or from an isolate, respectively. The GenBank accession number followed by the three-letter country code (ISO 3166-1 standard) and the year of detection is used to indicate strains reported elsewhere. Reference strains are in bold. Only bootstrap values higher than 70% are shown. The bars at the bottom denote genetic distance

Table 1 Uruguayan strains of Human Enteroviruses and percentages of divergence at nucleotide and amino acid levels among them, with reference strains and with strains reported elsewhere

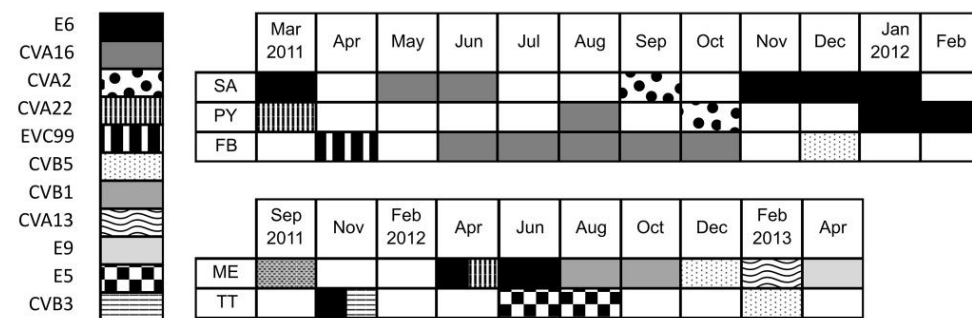
	Divergence among Uruguayan strains		Divergence with strains reported elsewhere ^a		Divergence with a reference strain ^b	
	<i>nt</i>	<i>aa</i>	<i>nt</i>	<i>aa</i>	<i>nt</i>	<i>aa</i>
CVA2	0.8–15.0	0–1.1	4.7–15.4	0–3.3	18.9–20.7	3.3–4.4
CVA16	0–1.1	0	1.5–3.6	0–1.1	25.8–26.1	5.4
CVB1	1.0	1.0	1.7–2.6	0–1.0	23.8–24.7	10.8–11.8
CVB3	–	–	1.3–2.6	0	22.8	5.0
CVB5	2.3–8.6	1.0–3.9	5.1–8.0	0–3.9	21.7–23.3	2.9–6.8
E5	0.7	1.0	1.6–2.2	0–1.0	19.4–20.0	1.9–2.9
E6	0.4–4.8	0–2.9	1–3.8	0–2.0	25.6–26.5	7.7–9.6
E9	–	–	1.9–5.1	1.0	17.2	18.9
CVA13	–	–	20.4–22.5	11.1–12.0	25.6	12.0
EVC99	–	–	16.6–20.0	1.0–4.7	21.5	1.9
CVA22	4.7	1.0	1.9–6.2	0–2.9	30.1–31.9	19.7–20.6

^aThose strains reported elsewhere and included in the phylogenetic analysis of this work^bThose reference strains included in the phylogenetic analysis of this work

The strains characterized as HEV-C were CVA22 (two strains), CVA13 and EVC99 (one strain each) (Fig. 2c). The Uruguayan CVA22 strains were up to 6.2 and 2.9% divergent at nucleotide and amino acid level, respectively, with CVA22 strains reported elsewhere (Table 1). On the other hand, the Uruguayan CVA13 strain was up to 22.5 and 12% divergent at nucleotide and amino acid levels, respectively, with strains reported in Argentina and Madagascar (Fig. 1c; Table 1). Although the Uruguayan EVC99 strain was also divergent around 20% at nucleotide level with strains reported elsewhere, it presented a lower degree of divergence at amino acid level with these strains compared with CVA13 (Table 1).

Temporal and Geographical Distribution of HEV Types

While types as CVB1, CVB3, CVA13, E5, and E9 were detected only in the eastern region of the country (Melo and Treinta y Tres), CVA16 or EVC99 were detected exclusively in the western region (Salto, Paysandú, and Fray Bentos). On the other hand, some types (E6, CVA2, CVA22, and CVB5) were detected in both regions of the country. Regarding the temporal fluctuation of the HEV types, although most of them were detected sporadically, CVA16 and E6 were consecutively detected in the periods of May–October and November–March, respectively, in the western region of the country (Fig. 3).

**Fig. 3** Temporal and geographical distribution of Human Enterovirus types detected in sewage samples from Uruguay between March 2011 and April 2013. The upper scheme represents cities of the western

region of Uruguay (SA Salto, PY Paysandú, FB Fray Bentos) and the lower one, cities of the eastern region (ME Melo and TT Treinta y Tres)

Discussion

We have described herein the occurrence of several HEV types in the environment from Uruguay, which constitutes, up to our knowledge, the first report from this country concerning the environmental molecular diversity of HEVs.

Two methods designed originally for detection and molecular characterization of HEVs from clinical specimens (Nix et al. 2006; Oberste et al. 2010) were applied here in parallel, for HEV screening in sewage sample concentrates. A higher frequency of detection for HEVs was obtained by the use of these two methods in parallel, than using one of them only, as suggested by Oberste et al. (2010).

As the IPC was detected by real-time PCR in all samples, we discarded that negative results in qPCR for HEVs have been due to the presence of inhibitors. Several positive samples by qualitative PCR for HEVs were negative when the qPCR was applied, which could be attributed to viral concentrations under the limit of detection for qPCR. This probably happened for BU samples, since they were collected after a treatment in a stabilization pond.

In general, the information about HEV circulation in the environment is a sub-product of the PV environmental surveillance (Battistone et al. 2014; Ndiaye et al. 2014; Wahjuhono et al. 2014; Wang et al. 2014; Tao et al. 2016). This is carried out by inoculation of sewage specimens in PV-specific cell lines—which do not allow the isolation of all HEV types (World Health Organization 2004), generating an incomplete description of the real HEV diversity. The HEV detection directly from sewage concentrates using molecular methods could help to obtain a more realistic view of the HEV diversity, avoiding a bias by isolation in cell lines specific for PV. In this work, the direct sequencing of PCR amplicons allowed the identification of 10 different types of three HEV species in 31 samples. The primers proposed by Nix et al. (2006) were designed for broad target specificity and could amplify all recognized and proposed HEV serotypes when they tested originally with RNA of clinical specimens. Moreover, this method has already been used to characterize HEVs isolated from sewage (Shukla et al. 2013; Battistone et al. 2014; Nakamura et al. 2015), and to amplify and typing HEVs directly from sewage sample concentrates (Ibrahim et al. 2014). Contrarily to Ibrahim et al. (2014) who characterized a low percentage (~12%) of HEVs from positive sewage samples using the PCR designed by Nix et al. (2006), we have characterized 67% of the positive sewage samples using this method. Moreover, we were able to identify variants seldom isolated in cell culture, as CVA22 (Brown et al. 2003). These results highlight the importance in selecting appropriate methods for the study of enterovirus in environmental samples.

It is worth mentioning the detection of HEV-C types. Although sporadically detected, EVC99 and CVA13 were highly divergent regarding the worldwide circulating strains. Previous studies reveal that strains of CVA13 and neuro-virulent VDPVs that circulated contemporary in a same geographic area were highly related in the non-structural region (Rakoto-Andrianarivelo et al. 2007; Delpeyroux et al. 2013). Besides, recombination between OPV strains and other HEV-C contributes as a favorable factor in the emergence of pathogenic VDPVs (Jegouic et al. 2009; Bessaud et al. 2016).

In our study, there was no isolation of OPV strains, regardless of a vaccination scheme with OPV or with IPV. Previous studies conducted in other countries reported PV and/or OPV strain detection in sewage (Mueller et al. 2009; Tao et al. 2012b; Alam et al. 2014; de Oliveira Pereira et al. 2016), indeed after the switch to IPV (Battistone et al. 2014; Wahjuhono et al. 2014). The absence of PV isolation from samples collected during routinely OPV vaccination and the low percentage of Non-Polio Enterovirus (NPEV) isolation in this study could be associated to different factors such as population size, sanitation level, and population density, as well as to geographic or climatic factors (Global Polio Eradication Initiative 2015). Other important aspect to highlight is that samples remained frozen at -20°C from the sampling up to early 2016 when this study began, and viruses could lose viability during this period.

Despite the absence of PV detection in this study, the circulation of HEV-C strains should be carefully monitored in a country with IPV vaccination scheme such as Uruguay. The low intestinal immunity generated by the inactivated vaccine (Salas-Peraza et al. 2010) could allow the importation and circulation of OPV strains in a silent manner (Manor et al. 2014), with opportunity to recombine with some of the HEV-C present in the country and to circulate among population without being detected. Uruguay employs the IPV vaccine since 2012 and has not yet been generated data concerning the epidemiology of HEV-C.

The most frequent types detected during this study correspond to species A (CVA16) and species B (E6).

The CVA16 was detected in the western region of the country between May and October 2011, being all the strains highly related among them. This type has been well associated to HFM disease (Iwai et al. 2009; Xu et al. 2015) and although there is a lack of information about the incidence of CVA16 in Uruguayan children, the Public Health authorities have warned about the occurrence of HFM disease in the country (Public Health Ministry of Uruguay 2014).

Although the HFM disease occurs worldwide, information concerning the epidemiology of CVA16 in the Americas is scarce (Carrion et al. 2016). Major studies have been conducted in the Asiatic region, where this type

is endemic and several sub-types have been characterized (Zhang et al. 2010; Yu et al. 2016; Zhao et al. 2016).

Our results would indicate a primary role of this viral pathogen in the account of HFM disease cases in Uruguay, since neither CVA10 nor CVA71 (the others main HEV types related to the disease) were detected in sewage samples in this study. The high similarity among the CVA16 Uruguayan strains and the sustained circulation at the western region of the country (mainly in Fray Bentos where CVA16 was detected for five consecutive months) suggest a recent introduction of this variant in the country. Unfortunately, the molecular epidemiology of the HEVs involved in the HFM disease in Uruguay remains unknown for more than 40 years after the first national clinical report (Aguirrezabal et al. 1973).

E6 was the other frequently detected type in this study and was present in both regions of the country. This type is mainly associated with outbreaks and sporadic cases of aseptic meningitis (Mao et al. 2010; Kim et al. 2012; Benschop et al. 2016) and several reports documented its presence in sewage samples in different countries (Sedmak et al. 2003; Tao et al. 2016; Wiczorek et al. 2017).

Despite E6 detection both in cold and warm months, which is in agreement with previous studies (Tao et al. 2012a, 2016), this type was exclusively detected in those warmest months of the year in the western region of Uruguay. Since infantile meningitis and encephalitis cases due to E6 in Uruguay have occurred in summer (Hernández 2014), it is worrying that viable E6 were detected in sewage samples collected in summer months in places without sewage treatment plants like Salto and Paysandú. In these cities, the Uruguay River (the main recreational course of water for their populations) daily receives thousands of liters of sewage without treatment, which means a possible risk of infection for susceptible people exposed to this environmental matrix, when our results are considered.

The pattern of occurrence of different HEV types, exclusively circulating at each region of the country, is similar to the previously reported distribution of Norovirus and Rotavirus types in both eastern and western regions of Uruguay (Tort et al. 2015; Victoria et al. 2016). This scenario could be attributed to the influence of the epidemiology of Brazil and Argentina on the Uruguayan eastern and western regions, respectively, and to the low population flux between both regions. Nevertheless, more epidemiological information is needed in order to confirm this hypothesis.

This study conducted an environmental approach to describe the circulation of HEVs in Uruguay, encompassing the period of OPV–IPV switch. Although OPV was not detected, the occurrence of several types belonging to HEV species A, B, and C, was reported, contributing to unveil the molecular epidemiology of those variants which could

affect the population and for which no information had been generated in the country.

Funding Funding was provided provided by Universidad de la República Uruguay (Grant No. PDU Virología), Comisión Sectorial de Investigación Científica (Grant Nos. CSIC I+D 2010, Scholarship, Beca doctorado-Comisión Académica de Postgrado) and Programa de desarrollo de las Ciencias Básicas PEDECIBA (Grant No. Beca de movilidad).

Compliance with Ethical Standards

Conflict of interest The authors declare that they have no conflict of interest.

References

- Aguirrezabal, M. P., Somma, M. P., Russi, J., Campione, J., Hortal, M., & Tosi, H. C. (1973). Maculopapular vesicular disease of hand, foot and mouth. First national observation. *Archivos de Pediatría del Uruguay*, 44, 111–113 (Spanish).
- Alam, M. M., Shaikat, S., Sharif, S., Angez, M., Khurshid, A., Malik, F., et al. (2014). Detection of multiple cocirculating wild poliovirus type 1 lineages through environmental surveillance: Impact and progress during 2011–2013 in Pakistan. *The Journal of Infectious Diseases*, 210(1), 324–332.
- Allmann, E., Pan, L., Li, L., Li, D., Wang, S., & Lu, Y. (2013). Presence of enteroviruses in recreational water in Wuhan, China. *Journal of Virological Methods*, 193, 327–331.
- Battistone, A., Buttinelli, G., Fiore, S., Amato, C., Bonomo, P., Patti, A. M., et al. (2014). Sporadic isolation of sabin-like polioviruses and high-level detection of non-polio enteroviruses during sewage surveillance in seven Italian cities, after several years of inactivated poliovirus vaccination. *Applied and Environmental Microbiology*, 80, 4491–4501.
- Benschop, K. S., Geeraedts, F., Beuvink, B., Spit, S. A., Fanoy, E. B., Claas, E. C., et al. (2016). Increase in ECHOvirus 6 infections associated with neurological symptoms in the Netherlands, June to August 2016. *Euro Surveillance: European Communicable Disease Bulletin*. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2016.21.39.30351>.
- Bessaud, M., Joffret, M. L., Blondel, B., & Delpeyroux, F. (2016). Exchanges of genomic domains between poliovirus and other cocirculating species C enteroviruses reveal a high degree of plasticity. *Scientific Reports*. <https://doi.org/10.1038/srep38831>.
- Blondel, B., Colbère-Garapin, F., Coudere, T., Wirotius, A., & Guivel-Benhassine, F. (2005). Poliovirus, pathogenesis of poliomyelitis, and apoptosis. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 289, 25–56.
- 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. *Journal of Virology*, 77, 8973–8984.
- Carrión, G., Huaman, J. L., Silva, M., Ampuero, J. S., Paz, I., Ocaña, V. R., et al. (2016). Molecular epidemiology of coxsackievirus A16 strains from four sentinel surveillance sites in Peru. *International Journal of Infectious Diseases*, 52, 83–85.
- Connell, C., Tong, H. L., Wang, Z., Allmann, E., & Lu, Y. (2012). New approaches for enhanced detection of enteroviruses from Hawaiian environmental waters. *PLoS ONE*. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0032442>.

- de Oliveira Pereira, J. S., da Silva, L. R., de Meireles Nunes, A., de Souza Oliveira, S., da Costa, E. V., & da Silva, E. E. (2016). Environmental Surveillance of Polioviruses in Rio de Janeiro, Brazil, in support to the activities of Global Polio Eradication Initiative. *Food and Environmental Virology*, 8(1), 27–33.
- de Quadros, C. A., Hersh, B. S., Olivé, J. M., Andrus, J. K., da Silveira, C. M., & Carrasco, P. A. (1997). Eradication of wild poliovirus from the Americas: Acute flaccid paralysis surveillance, 1988–1995. *The Journal of the Infectious Diseases*, 175(1), 37–42.
- Delpyroux, F., Colbère-Garapin, F., Razafindratsimandresy, R., Sad-euh-Mba, S., Joffret, M. L., Rousset, D., et al. (2013). Eradication of poliomyelitis and emergence of pathogenic vaccine-derived polioviruses: From Madagascar to Cameroon. *Médecine Sciences*, <https://doi.org/10.1051/medsci/20132911021>. (French).
- Fariás, A. A., Mojsiejczuk, L. N., Pisano, M. B., Flores, F. S., Aguilar, J. J., Jean, A. N., et al. (2018). Environmental Surveillance of enteroviruses in Central Argentina: First detection and evolutionary analyses of E14. *Food and Environmental Virology*, 10(1), 121–126.
- Global Polio Eradication Initiative. (2015). Guidelines on environmental surveillance for detection of polioviruses. Working draft—March 2015. Retrieved February 21, 2018 from http://polioeradication.org/wp-content/uploads/2016/07/GPLN_Guidelines_ES_April2015.pdf.
- Hall, T. A. (1999). BioEdit: A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, 41, 95–98.
- Haramoto, E., Katayama, H., Utagawa, E., & Ohgaki, S. (2009). Recovery of human norovirus from water by virus concentration methods. *Journal of Virological Methods*, 160(1–2), 206–209.
- Hernández, E. (2014). Typing of community non-polio enteroviruses responsible of neurovirosis in Uruguayan children. Biochemistry Bachelor's Thesis. Faculty of Sciences, University of the Republic, Uruguay. Spanish. Retrieved July 24, 2017 from <http://www.bib.fcien.edu.uy/files/etd/pasan/uy24-12725.pdf>.
- Hovi, T., Cantell, K., Huovilainen, A., Kinnunen, E., Kuronen, T., Lapinleimu, K., et al. (1986). Outbreak of paralytic poliomyelitis in Finland: Widespread circulation of antigenically altered poliovirus type 3 in a vaccinated population. *Lancet*, 1, 1427–1432.
- Hovi, T., Shulman, L. M., van der Avoort, H., Deshpande, J., Roinainen, M., & De Gourville, E. M. (2012). Role of environmental poliovirus surveillance in global polio eradication and beyond. *Epidemiology and Infection*, 140(1), 1–13.
- Ibrahim, W., Ouerdani, I., Pillet, S., Aouni, M., Pozzetto, B., & Harath, R. (2014). Direct typing of human enteroviruses from wastewater samples. *Journal of Virological Methods*, 207, 215–219.
- Iwai, M., Masaki, A., Hasegawa, S., Obara, M., Horimoto, E., Nakamura, K., et al. (2009). Genetic changes of coxsackievirus A16 and enterovirus 71 isolated from hand, foot, and mouth disease patients in Toyama, Japan between 1981 and 2007. *Japanese Journal of Infection Diseases*, 62, 254–259.
- Jegouic, S., Joffret, M. L., Blanchard, C., Riquet, F. B., Perret, C., Pelletier, I., et al. (2009). Recombination between polioviruses and co-circulating Coxsackie A viruses: Role in the emergence of pathogenic vaccine-derived polioviruses. *PLoS Pathogens*. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000412>.
- Katayama, H., Shimasaki, A., & Ohgaki, S. (2002). Development of a virus concentration method and its application to detection of enterovirus and norwalk virus from coastal seawater. *Applied and Environmental Microbiology*, 68, 1033–1039.
- Kim, H. J., Kang, B., Hwang, S., Hong, J., Kim, K., & Cheon, D. S. (2012). Epidemics of viral meningitis caused by echovirus 6 and 30 in Korea in 2008. *Virology Journal*. <https://doi.org/10.1186/1743-422X-9-38>.
- Knowles, N. J., Hovi, T., Hyypää, T., King, A. M. Q., Lindberg, A. M., Pallansch, M. A., et al. (2011). Picornaviridae. In A. M. Q. King, M. J. Adams, E. B. Carstens & E. J. Lefkowitz (Eds.), *Virus taxonomy: Classification and nomenclature of viruses. Ninth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses* (pp. 855–880). San Diego, CA: Elsevier.
- Manor, Y., Shulman, L. M., Kaliner, E., Hindiyeh, M., Ram, D., Sofer, D., et al. (2014). Intensified environmental surveillance supporting the response to wild-type poliovirus type 1 silent circulation in Israel, 2013. *Euro Surveillance: European Communicable Disease Bulletin*, 19(7), 20708.
- Mao, N., Zhao, L., Zhu, Z., Chen, X., Zhou, S., Zhang, Y., et al. (2010). An aseptic meningitis outbreak caused by echovirus 6 in Anhui province, China. *Journal of Medical Virology*, 82, 441–445.
- Muehlenbachs, A., Bhatnagar, J., & Zaki, S. R. (2015). Tissue tropism, pathology and pathogenesis of enterovirus infection. *The Journal of Pathology*, 235, 217–228.
- Mueller, J. E., Bessaud, M., Huang, Q. S., Martinez, L. C., Barril, P. A., Morel, V., et al. (2009). Environmental poliovirus surveillance during oral poliovirus vaccine and inactivated poliovirus vaccine use in Córdoba Province, Argentina. *Applied and Environmental Microbiology*, 75, 1395–1401.
- Nakamura, T., Hamasaki, M., Yoshitomi, H., Ishibashi, T., Yoshiyama, C., Maeda, E., et al. (2015). Environmental surveillance of poliovirus in sewage water around the introduction period for inactivated polio vaccine in Japan. *Applied and Environmental Microbiology*, 81, 1859–1864.
- Nathanson, N., & Kew, O. M. (2010). From emergence to eradication: The epidemiology of poliomyelitis deconstructed. *American Journal of Epidemiology*, 172, 1213–1229.
- Ndiaye, A. K., Diop, P. A., & Diop, O. M. (2014). Environmental surveillance of poliovirus and non-polio enterovirus in urban sewage in Dakar, Senegal (2007–2013). *Pan African Medical Journal*. <https://doi.org/10.11604/pamj.2014.19.243.3538>.
- Nix, W. A., Oberste, M. S., & Pallansch, M. A. (2006). Sensitive, semi-nested PCR amplification of VP1 sequences for direct identification of all enterovirus serotypes from original clinical specimens. *Journal of Clinical Microbiology*, 44, 2698–2704.
- Oberste, M. S., Maher, K., Kilpatrick, D. R., & Pallansch, M. A. (1999). Molecular evolution of the human enteroviruses: Correlation of serotype with VP1 sequence and application to picornavirus classification. *Journal of Virology*, 73, 1941–1948.
- Oberste, M. S., & Pallansch, M. A. (2005). Enterovirus: Molecular detection and typing. *Reviews in Medical Microbiology*, 16(4), 163–171.
- Oberste, M. S., Peñaranda, S., Rogers, S. L., Henderson, E., & Nix, W. A. (2010). Comparative evaluation of Taqman real-time PCR and semi-nested VP1 PCR for detection of enteroviruses in clinical specimens. *Journal of Clinical Virology*, 49(1), 73–74.
- Pallansch, M. A., Oberste, M. S., & Whitton, J. L. (2013). Enteroviruses: Polioviruses, coxsackieviruses, echoviruses, and newer enteroviruses. In B. N. Fields, D. M. Knipe & P. M. Howley (Eds.), *Fields virology* (6th ed., pp. 490–530). Philadelphia: Wolters Kluwer/Lippincott Williams & Wilkins Health.
- Prevost, B., Lucas, F. S., Goncalves, A., Richard, F., Moulin, L., & Wurtzer, S. (2015). Large scale survey of enteric viruses in river and waste water underlines the health status of the local population. *Environment International*, 79, 42–50.
- Public Health Ministry of Uruguay. (2014). Communication: Hand-foot-mouth syndrome. 22nd, August 2014. Spanish. Retrieved June 21, 2017 from <http://www.msp.gub.uy/comunicado/comunicado-s%C3%ADndrome-mano-pie-boca>.
- Rajal, V. B., McSwain, B. S., Thompson, D. E., Leutenegger, C. M., Kildare, B. J., & Wurtz, S. (2007). Validation of hollow fiber ultrafiltration and real-time PCR using bacteriophage PP7 as surrogate for the quantification of viruses from water samples. *Water Research*, 41, 1411–1422.

- Rakoto-Andrianarivelo, M., Guillot, S., Iber, J., Balanant, J., Blondel, B., Riquet, F., et al. (2007). Co-circulation and evolution of polioviruses and species C enteroviruses in a district of Madagascar. *PLoS Pathogens*. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.0030191>.
- Salas-Peraza, D., Avila-Agüero, M. L., & Morice-Trejos, A. (2010). Switching from OPV to IPV: Are we behind the schedule in Latin America? *Expert Review of Vaccines*, 9, 475–483.
- 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. *Applied and Environmental Microbiology*, 69, 7181–7187.
- Shukla, D., Kumar, A., Srivastava, S., Idris, M. Z., & Dhole, T. N. (2013). Environmental surveillance of enterovirus in Northern India using an integrated shell vial culture with a semi-nested RT-PCR and partial sequencing of the VP1 gene. *Journal of Medical Virology*, 85, 505–511.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A., & Kumar, S. (2013). MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, 30, 2725–2729.
- Tao, Z., Song, Y., Wang, H., Zhang, Y., Yoshida, H., Ji, S., et al. (2012a). Intercity spread of echovirus 6 in Shandong Province, China: Application of environmental surveillance in tracing circulating enteroviruses. *Applied and Environmental Microbiology*, 78, 6946–6953.
- Tao, Z., Wang, Z., Lin, X., Wang, S., Wang, H., Yoshida, H., et al. (2016). One-year Survey of human enteroviruses from sewage and the factors affecting virus adsorption to the suspended solids. *Scientific Reports*. <https://doi.org/10.1038/srep31474>.
- Tao, Z., Zhang, Y., Liu, Y., Xu, A., Lin, X., Yoshida, H., et al. (2012b). Isolation and characterization of a type 2 vaccine-derived poliovirus from environmental surveillance in China, 2012. *PLoS ONE*. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0083975>.
- The Pirbright Institute. (2018). Enterovirus. Retrieved March 23, 2018 from <http://www.picornaviridae.com/enterovirus/enterovirus.htm>.
- Tort, L. F., Victoria, M., Lizasoain, A., García, M., Berois, M., Cristina, J., et al. (2015). Detection of common, emerging and uncommon VP4, and VP7 human Group A rotavirus genotypes from urban sewage samples in Uruguay. *Food and Environmental Virology*, 7, 342–353.
- Uruguayan Government. (2012). Decree-Law Number 41/012 (2012, Feb 28). National Code of Sanitary Events and Diseases of Mandatory Notification. An update of the Decree 64/004. Spanish. Retrieved February 21, 2018 from <https://www.impo.com.uy/bases/decretos/41-2012>.
- Victoria, M., Tort, L. F., Lizasoain, A., García, M., Castells, M., Berois, M., et al. (2016). Norovirus molecular detection in Uruguayan sewage samples reveals a high genetic diversity and GII.4 variant replacement along time. *Journal of Applied Microbiology*, 120, 1427–1435.
- Wahjuning, G., Revolusiana, Widiastuti, D., Sundoro, J., Mardani, T., Ratih, W. U., et al. (2014). Switch from oral to inactivated poliovirus vaccine in Yogyakarta Province, Indonesia: Summary of coverage, immunity, and environmental surveillance. *The Journal of Infectious Diseases*, 210(1), 347–352.
- Wang, H., Tao, Z., Li, Y., Lin, X., Yoshida, H., Song, L., et al. (2014). Environmental surveillance of human enteroviruses in Shandong Province, China, 2008 to 2012: Serotypes, temporal fluctuation, and molecular epidemiology. *Applied and Environmental Microbiology*, 80, 4683–4691.
- Wieczorek, M., Ciągła, A., Witek, A., Kuryk, Ł., & Żuk-Wasek, A. (2011). Environmental Surveillance of Non-polio Enteroviruses in Poland, 2011. *Food and Environmental Virology*, 7, 224–231.
- Wieczorek, M., Krzysztozek, A., Ciągła, A., & Figas, A. (2017). Molecular characterization of environmental and clinical echovirus 6 isolates from Poland, 2006–2014. *Journal of Medical Virology*, 89, 936–940.
- Witø, E., Palacios, G., Rønningen, K. S., Cinek, O., Janowitz, D., Rewers, M., et al. (2007). Asymptomatic circulation of HEV71 in Norway. *Virus Research*, 123(1), 19–29.
- World Health Organization. (2004). Polio Laboratory Manual. Fourth edition. Geneva, Switzerland. Retrieved February 21, 2018 from http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/68762/1/WHO_IVB_04.10.pdf.
- Xu, M., Su, L., Cao, L., Zhong, H., Dong, N., Dong, Z., et al. (2015). Genotypes of the enterovirus causing hand foot and mouth disease in Shanghai, China, 2012–2013. *PLoS ONE*. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0138514>.
- Yu, W., Xu, H., & Yin, C. (2016). Molecular epidemiology of human coxsackievirus A16 strains. *Biomedical Reports*, 4, 761–764.
- Zhang, Y., Wang, D., Yan, D., Zhu, S., Liu, J., Wang, H., et al. (2010). Molecular evidence of persistent epidemic and evolution of sub-genotype B1 coxsackievirus A16-associated hand, foot, and mouth disease in China. *Journal of Clinical Microbiology*, 48, 619–622.
- Zhao, G., Zhang, X., Wang, C., Wang, G., & Li, F. (2016). Characterization of VP1 sequence of Coxsackievirus A16 isolates by Bayesian evolutionary method. *Virology Journal*. <https://doi.org/10.1186/s12985-016-0578-3>.

5.1.2.

Artículo 2: “Environmental Surveillance through Next-Generation Sequencing to Unveil the Diversity of Human Enteroviruses beyond the Reported Clinical Cases”.

Año: 2021

Revista: Viruses

En este artículo se estudiaron muestras de agua residual colectadas mensualmente en la ciudad de Córdoba (Provincia de Córdoba, Argentina) en los periodos comprendidos entre enero de 2011 y diciembre de 2012 y entre marzo de 2017 y febrero de 2018.

En cada instancia de muestreo se colectaron 1,5 litros de agua residual para luego ser concentrados a 15 ml mediante un método de precipitación con polietilenglicol 6000.

Se realizó una RT-*nested*-PCR dirigida a un fragmento codificante de la proteína VP1, con cebadores internos ligados a adaptadores universales de Illumina, utilizando el ARN extraído de cada concentrado viral como molde.

Los productos de PCR fueron sometidos a electroforesis en gel de agarosa, y las bandas visualizadas fueron purificadas del gel, y a partir de los mismos se construyeron librerías para secuenciar mediante MiSeq, obteniendo *reads* pareados de 300 nucleótidos.

Una vez obtenidos los resultados de secuenciación, el procesamiento de los mismos fue realizado en colaboración con la Unidad de Genómica y Bioinformática del CENUR Litoral Norte de la Universidad de la República, para lo cual se utilizó el software V-Search.

A su vez, se construyó una base de secuencias de referencia de enterovirus para poder efectuar el mapeo de *reads* en la tipificación de los mismos durante el procesamiento bioinformático de los datos. La base de datos se denominó CHED (por Customized Human Enterovirus Database).

El ANEXO 2 esquematiza el abordaje metodológico mediante el cual se logró caracterizar distintos enterovirus a partir de muestras de agua residual utilizando *next-generation sequencing* de amplicón. Tanto las muestras de agua residual colectadas en Córdoba, como las colectadas en Buenos Aires (sección 5.1.3) y en Uruguay (sección 5.1.4) fueron evaluadas mediante un abordaje similar.

Mediante este abordaje, para las muestras de Córdoba, fue posible la detección en promedio de 7 (entre 1 y 11) y 11 (entre 5 y 16) enterovirus distintos por muestra para 2011-2012 y 2017-2018, respectivamente.

La especie B fue la más frecuentemente detectada (así como también la de mayor abundancia), seguida por la especie C (la cual fue detectada en todas las muestras de 2017-2018 con valores superiores de abundancia en comparación con 2011-2012). La especie A se detectó de manera menos frecuente, con valores inferiores de abundancia en comparación con las otras especies, aunque se registró un incremento en su abundancia en muestras del periodo marzo-junio de 2011.

En total se detectaron 41 enterovirus distintos (10 enterovirus A, 20 enterovirus B y 11 enterovirus C), incluyendo los tres serotipos de poliovirus. En 2011-2012, los tipos predominantes fueron CVA2, CVA16, CVB4, CVB5, E6, E11, E14, E16, E17,

E30, CVA22 y EV-C99, mientras que en 2017-2018 predominaron EV-A71, CVA4, CVA6, CVA12, CVB2, CVB4, E11, E14, E18, E30, CVA1, CVA19, CVA24 y EV-C99. Veinticuatro de los 41 enterovirus reportados en nuestro estudio, fueron detectados durante ambos periodos de muestreo.

Este estudio representó el primer reporte en Argentina para 15 de los 38 enterovirus no polio que se detectaron, entre los cuales mayoritariamente encontramos tipos de las especies A y C. Por otro lado, si bien 17 de los 20 enterovirus de la especie B detectados, ya habían sido reportados en Argentina, la mitad de estos reportes había sido por lo menos 15 años atrás.

A su vez, se compararon las cepas de echovirus 30 detectadas en ambos muestreos, con cepas del mismo serotipo de aislados clínicos obtenidos a partir de casos de meningitis aséptica ocurridos en Argentina entre 1998 y 2012, cuyas secuencias nucleotídicas estaban disponibles en la base de datos de GenBank.

Se observó que las cepas de echovirus 30 detectadas en muestras de agua residual de 2011-2012 estaban estrechamente relacionadas con aislados clínicos reportados durante brotes de meningitis ocurridos en distintas locaciones de Argentina (incluyendo Córdoba) en el mismo periodo (identidad entre 95,9% a 100% entre cepas detectadas en pacientes y en el agua residual).

Article

Environmental Surveillance through Next-Generation Sequencing to Unveil the Diversity of Human Enteroviruses beyond the Reported Clinical Cases

Andrés Lizasoain ¹ , Daiana Mir ², Gisella Masachessi ³, Adrián Farías ³, Nélida Rodríguez-Osorio ², Matías Victoria ¹, Silvia Nates ³ and Rodney Colina ^{1,*}

¹ Laboratorio de Virología Molecular, Departamento de Ciencias Biológicas, Centro Universitario Regional del Litoral Norte, Universidad de la República, Salto 50000, Uruguay; andres.lizasoain.cuelho@gmail.com (A.L.); matvicmon@yahoo.com (M.V.)

² Unidad de Genómica y Bioinformática, Departamento de Ciencias Biológicas, Centro Universitario Regional del Litoral Norte, Universidad de la República, Salto 50000, Uruguay; dmir@unorte.edu.uy (D.M.); nelida.rodriguez@unorte.edu.uy (N.R.-O.)

³ Laboratorio de Gastroenteritis Virales y Sarampión, Instituto de Virología Dr. J. M. Vanella, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Córdoba, Córdoba 5000, Argentina; gmasachessi@fcm.unc.edu.ar (G.M.); adrianalefarias@hotmail.com (A.F.); snates@fcm.unc.edu.ar (S.N.)

* Correspondence: rodneycolina1@gmail.com; Tel.: +598-473-42925



Citation: Lizasoain, A.; Mir, D.; Masachessi, G.; Farías, A.; Rodríguez-Osorio, N.; Victoria, M.; Nates, S.; Colina, R. Environmental Surveillance through Next-Generation Sequencing to Unveil the Diversity of Human Enteroviruses beyond the Reported Clinical Cases. *Viruses* **2021**, *13*, 120. <https://doi.org/10.3390/v13010120>

Academic Editors: Javier Martin and Erwin Duizer

Received: 19 December 2020

Accepted: 15 January 2021

Published: 17 January 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: The knowledge about circulation of Human Enteroviruses (EVs) obtained through medical diagnosis in Argentina is scarce. Wastewater samples monthly collected in Córdoba, Argentina during 2011–2012, and then in 2017–2018 were retrospectively studied to assess the diversity of EVs in the community. Partial VP1 gene was amplified by PCR from wastewater concentrates, and amplicons were subject of next-generation sequencing and genetic analyses. There were 41 EVs detected, from which ~50% had not been previously reported in Argentina. Most of the characterized EVs (60%) were detected at both sampling periods, with similar values of intratype nucleotide diversity. Exceptions were enterovirus A71, coxsackievirus B4, echovirus 14, and echovirus 30, which diversified in 2017–2018. There was a predominance of types from EV-C in 2017–2018, evidencing a common circulation of these types throughout the year in the community. Interestingly, high genetic similarity was evidenced among environmental strains of echovirus 30 circulating in 2011–2012 and co-temporal isolates obtained from patients suffering aseptic meningitis in different locations of Argentina. This study provides an updated insight about EVs circulating in an important region of South America, and suggests a valuable role of wastewater-based epidemiology in predicting outbreaks before the onset of cases in the community.

Keywords: enterovirus; poliovirus; echovirus; coxsackievirus; surveillance; wastewater-based epidemiology; aseptic meningitis; outbreak; phylogenetic analysis; next-generation sequencing

1. Introduction

Human Enteroviruses (EVs) comprise several viral types belonging to classical groups: coxsackievirus (CV) A and B, echovirus (E), numbered enterovirus (EV) and poliovirus (PV). Additionally, EVs are classified into four viral species (EV-A-EV-D) inside the genus *Enterovirus* of the family *Picornaviridae* [1].

Frequently, infections are mild or asymptomatic [2], but a small fraction of them lead to diseases such as aseptic meningitis (AM), encephalitis, acute hemorrhagic conjunctivitis (AHC), hand-foot-and-mouth disease (HFMD), or acute flaccid paralysis (AFP), among others [3,4]. The primary mode of EVs transmission remains the fecal-oral route. However, respiratory aerosols, contact with objects or surfaces contaminated with virions, as well as consumption of contaminated water also raise the risk of infection [5,6]. Infections by EVs are ubiquitous among populations; and since the primary replication site for these viruses

is the digestive tract, large amounts of viral particles are excreted in feces during either symptomatic or asymptomatic infections [7]. Consequently, when suitable methods are employed, the study of wastewater samples allows unveiling of the diversity of EVs in the population that surrounds the sampling points [8,9].

South America has been identified as being among the regions of the world with less available information about the genetic diversity of its circulating EVs strains [10]. In particular, Argentina has extensively studied the molecular epidemiology of echovirus 30, a member of EV-B related with AM [11–13]. Additionally, there are some reports regarding outbreaks of different diseases caused by EVs [14–17]. Previous wastewater-based epidemiology studies have provided valuable information about EVs types circulating in Argentina [18–21], thus complementing clinical analysis of samples from patients with diseases associated with EVs reported in the 1990s and early 2000s [22,23]. Most of these environmental studies were carried out in the Province of Córdoba, but they were biased towards poliovirus isolation and viral strains characterization [19] or were based on Sanger sequencing of a PCR product obtained directly from the wastewater specimens [20,21]. Considering that wastewater is a complex sample in which there normally occurs a mixture of several EVs types as a result of multiple excretion events in the population [24,25], and due to the inherent diversity of types when EVs are assessed, these approaches had limitations for providing a wide understanding on the diversity of circulating EVs. Beyond all efforts for characterizing EVs' presence in Argentina, the knowledge about the circulation of more than 100 types of these viruses in the country is scarce.

In recent years, different studies have employed next-generation sequencing techniques to describe diversity, seasonality, and/or to find particular emerging types of EVs in environmental samples, achieving an in-depth view of the real diversity enclosed by each sample [25–28].

The present wastewater-based epidemiology study constitutes a great contribution to the knowledge about the circulation of EVs in Argentina and provides evidence about the usefulness of the applied methodological approach for anticipating possible outbreaks.

2. Materials and Methods

2.1. Samples

Viral concentrates (15 mL)—which were obtained as previously described [29] by a precipitation method with polyethylene glycol (PEG) from wastewater samples (1500 mL each)—were retrospectively studied. Samples were monthly collected from the inlet of Bajo Grande wastewater treatment plant (WTP) from Córdoba City in two periods; the first period took place from January 2011 until December 2012, and the second period took place from March 2017 until February 2018. Córdoba city is the capital of the province of Córdoba, located in the central region of Argentina, and is the second most populated city of the country with approximately 1,329,604 inhabitants and a population density of 5,978 people per square mile [30]. The Bajo Grande WTP represents the sewage discharges from about 61% of the population and this facility does not treat industrial wastewater.

2.2. Human Enteroviruses Detection and Sequencing

Viral genomes were extracted from 140 µL of viral concentrate using the QIAamp® Viral RNA Mini Kit (Qiagen™, Hilden, Germany) according to manufacturer's instructions. A RT-nested PCR method [31] was used to amplify a partial segment of VP1-coding segment (2602–2977 positions in the genome of PV1 Mahoney strain. GenBank accession number J02281), with primers AN32-AN35 in the reverse transcription (Revert Aid RT Thermo Scientific™, Carlsbad, CA, USA) and primers 222/224 (with Ranger DNA Polymerase Master Mix, Meridian Bioscience™, Cincinnati, OH, USA) and AN88/AN89 (with Platinum™ SuperFi™ Taq DNA Polymerase, Invitrogen™, Carlsbad, CA, USA), in first and second PCR rounds, respectively. At the second round, AN88 and AN89 primers [31] were modified by addition of Illumina Universal Adapter sequences at the 5' ends, according to the protocol of library preparation for metagenomic sequencing in Illumina MiSeq platform

(Illumina Inc., San Diego, CA, USA) [32]. Macrogen Inc. Next Generation Sequencing Service (Seoul, Republic of Korea) prepared sequencing libraries. Samples were sequenced on Illumina MiSeq 2 × 300 bp, producing paired end reads. Libraries from 2011–2012 and 2017–2018 were sequenced in two independent runs.

2.3. Bioinformatics Pipeline

Raw Illumina reads were paired using *merge pairs* algorithm with a minimum overlap length of 50 bp in VSEARCH v2.11 [33]. The resulting contigs were filtered out if their lengths were <100 bp, and if they contained homopolymer tracks >8 bp in length. Quality trimming of reads was performed by using *-fastq_filter* command and contigs with more than 1.0 total expected errors (*-fastq_maxee* 1.0) were discarded. In order to save time in further analyses, a dereplication step was performed using VSEARCH *-derep_fulllength* algorithm on the processed contigs to find unique sequences by clustering at 100% sequence identity. Singletons (sequences that appear only once in the sample) and chimeras (*abskew* = 2) were removed.

Clusters of contigs were generated with VSEARCH using identity criterion of 97%, adopting a representative sequence (centroid sequence) of each cluster for further analyses. Finally, centroid sequences were mapped by VSEARCH's *-usearch_global* at 80% sequence identity against a Customized Human Enteroviruses Database (CHED), composed of 30,850 sequences of the viral capsid VP1 protein-coding region downloaded from NCBI nucleotide database (CHED available upon requested).

2.4. Phylogenetic Analyses and Genetic Diversity

A subset from CHED was generated by removing closely related sequences within each EV type. To do this, sequences were grouped by similarity (97%) with the CD-HIT-EST tool [34] and only one sequence per cluster was selected.

An alignment for each EV species was constructed including the CHED representative sequences and centroid sequences from this study. A maximum likelihood (ML) phylogenetic tree was inferred for the completed data set of each EV species by using FastTree v2.1 software [35] with the GTR nucleotide substitution model. Lengths were rescaled to optimize the Gamma20 likelihood after using the CAT approximation to optimize the trees. The reliability of the phylogenies was estimated with the approximate likelihood-ratio test (aLRT) based on a Shimodaira–Hasegawa-like procedure [36,37]. Phylogenetic trees were visualized with FigTree v1.4.3.

Additionally, nucleotide identities values were calculated in BioEdit software v7.2.5 [38] for each pair of centroid sequences exclusively for each one of the types detected in both periods (2011–2012 and 2017–2018).

2.5. Backgrounds of Human Enteroviruses Detection in Argentina. Link between Environmental and Clinical Isolates

A bibliographic and nucleotide database search was conducted in order to know the most recent report in Argentina—either for environmental or clinical isolates—of each EV detected in this study.

Additionally, nucleotide sequences of clinical isolates—which were obtained from AM cases reported in different locations of Argentina between 1998 and 2012 [13]—were retrieved from GenBank nucleotide database for a genetic comparison with strains detected in wastewater by this study. Comparisons were performed through a matrix of nucleotide identity constructed in BioEdit software v7.2.5 [38]. GenBank accession numbers and information regarding location and year of detection for clinical isolates used in this analysis are available in Table S1.

3. Results

3.1. Taxonomic Allocation and Distribution of Human Enteroviruses Species' Frequency and Abundance

Number of merged reads (contigs) per sample ranged between 63,293 and 118,027 (average $106,328 \pm 11,680$) for 2011–2012 and between 132,716 and 300,971 (average $179,030 \pm 46,968$) for 2017–2018. The average loss of contigs after the two-filter process for 2011–2012 and 2017–2018 was $14\% \pm 4.1\%$ and $15\% \pm 5.3\%$, respectively.

When considering all samples, it was observed that more than 97% of the total filtered contigs mapped to EVs sequences. At the 2011–2012 and the 2017–2018 sampling periods, on average 7 and 11 different EVs types per sample were detected, respectively (Table 1).

Throughout both sampling periods, EV-B was the most frequent and abundant detected species, while EV-C was detected in all the samples (like EV-B) during 2017–2018, with increased abundance compared to 2011–2012. EV-A was detected in a low abundance throughout the entire sampling period; with the exception of March through June 2011, when EV-A abundance was relatively higher compared to the one from the remaining months of the sampling (Figure 1).

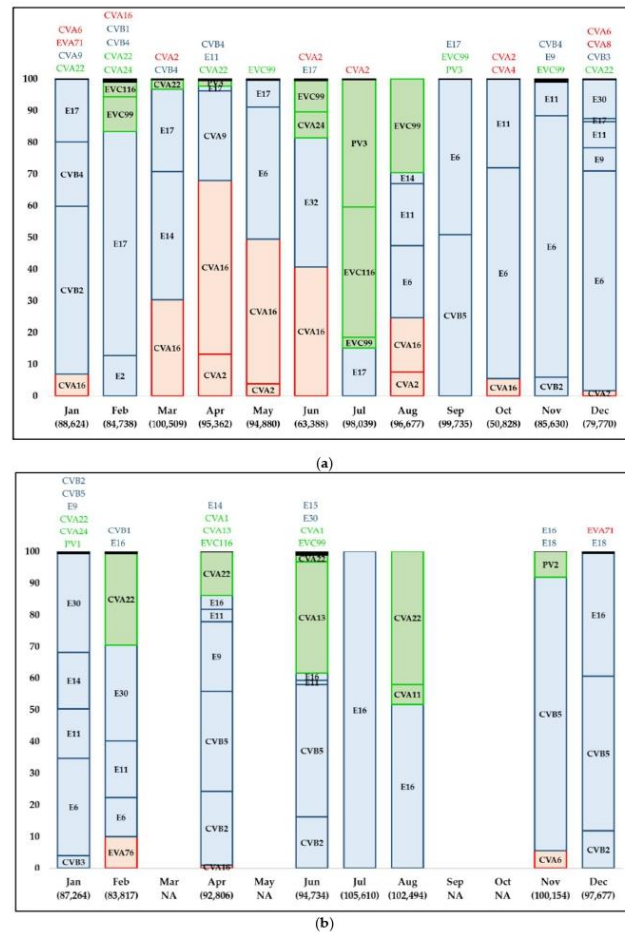


Table 1. Cont.

Sample	No. Contigs *	No. Contigs Represented by Centroids (<i>n</i>) after Clusterization, and Quality Filtering	No. Contigs and Centroids (<i>n</i>) Mapping to CHED §	% of Mapped Contigs	No. Types Detected	Normalization (No. Types Detected/100,000 Contigs)
Nov-11	110,198	85,630 (11)	85,630 (11)	100	6	7
Dec-11	101,611	79,770 (14)	79,770 (14)	100	10	13
Jan-12	103,427	87,296 (18)	87,264 (17)	99.963	11	13
Feb-12	100,802	83,832 (13)	83,817 (11)	99.982	7	8
Apr-12	107,125	92,808 (17)	92,806 (16)	99.998	11	12
Jun-12	110,616	94,899 (22)	94,734 (18)	99.826	10	11
Jul-12	114,277	105,637 (7)	105,610 (1)	99.974	1	1
Aug-12	111,862	102,504 (6)	102,494 (3)	99.990	3	3
Nov-12	116,199	100,154 (11)	100,154 (11)	100	5	5
Dec-12	118,027	97,677 (12)	97,677 (12)	100	5	5
2011–2012	106,328 (±11,680)	91,693 (12) loss of 14% ± 4.1%	90,137 (10)	98.346	7	8
Mar-17	204,856	179,282 (37)	179,137 (35)	99.919	13	7
Apr-17	205,429	187,007 (29)	143,597 (21)	76.787	5	3
May-17	160,517	119,872 (79)	119,824 (76)	99.960	16	13
Jun-17	175,947	150,860 (33)	148,737 (25)	98.593	10	7
Jul-17	155,278	128,309 (44)	128,184 (42)	99.903	11	9
Aug-17	133,853	118,825 (25)	118,811 (22)	99.988	11	9
Sep-17	179,041	165,549 (19)	162,832 (11)	98.359	8	5
Oct-17	205,001	179,162 (27)	179,156 (26)	99.997	14	8
Nov-17	300,971	259,183 (54)	258,949 (49)	99.910	14	5
Dec-17	132,716	111,404 (24)	110,687 (20)	99.356	10	9
Jan-18	158,591	130,304 (33)	130,300 (31)	99.997	7	5
Feb-18	136,157	105,016 (28)	105,012 (27)	99.996	10	10
2017–2018	179,030 (± 46,968)	152,898 (36) loss of 15% ± 5.3%	148,769 (32)	97.730	11	8

* Resulting from raw paired reads merging. § CHED: Customized Human Enteroviruses Database (centroids were mapped against it for typing). Average values for 2011–2012 and 2017–2018 are in boldface.

3.2. Human Enteroviruses Characterization

In total, 41 different EVs types were detected: 10 types belonging to EV-A, 20 types to EV-B and 11 types to EV-C. Twenty-four out of 41 types were detected in both sampling periods (Figure 1; Figure S1).

According to the period of detection (2011–2012 and 2017–2018), several phylogenetic clusters were characterized for most of the different types (Figure S1). The majority of the phylogenetic clusters were detected exclusively during one of the sampling periods, but a lower number of them were composed by highly related centroid sequences detected at both periods (black squares of Figure S1).

The dynamics of EVs types within the three detected species was quite heterogeneous throughout the sampling period (Figure 1). In 2011–2012 period (Figure 1a,b), the predominant types were CVA2, CVA16 (EV-A), CVB4, CVB5, E6, E11, E14, E16, E17, E30 (EV-B), CVA22, EVC99 (EV-C). In the period considered between 2017 and 2018 (Figure 1c) the

prominent ones were EVA71, CVA4, CVA6, CVA12 (EV-A), CVB2, CVB4, E11, E14, E18, E30 (EV-B), CVA1, CVA19, CVA24, EVC99 (EV-C).

3.3. Nucleotide Identity

Values of nucleotide identity among all pairs of centroid sequences for EVs types detected at both sampling periods (2011–2012 and 2017–2018) were in the range of 74.1–100%, when all types were considered (Figure 2). The range of genetic identity values was similar for both periods, with few exceptions: wider ranges in 2017–2018 than in 2011–2012 were observed for EVA71, CVB4, E14, and E30; meanwhile the range of identity for CVB5 decreased in 2017–2018 compared with 2011–2012.

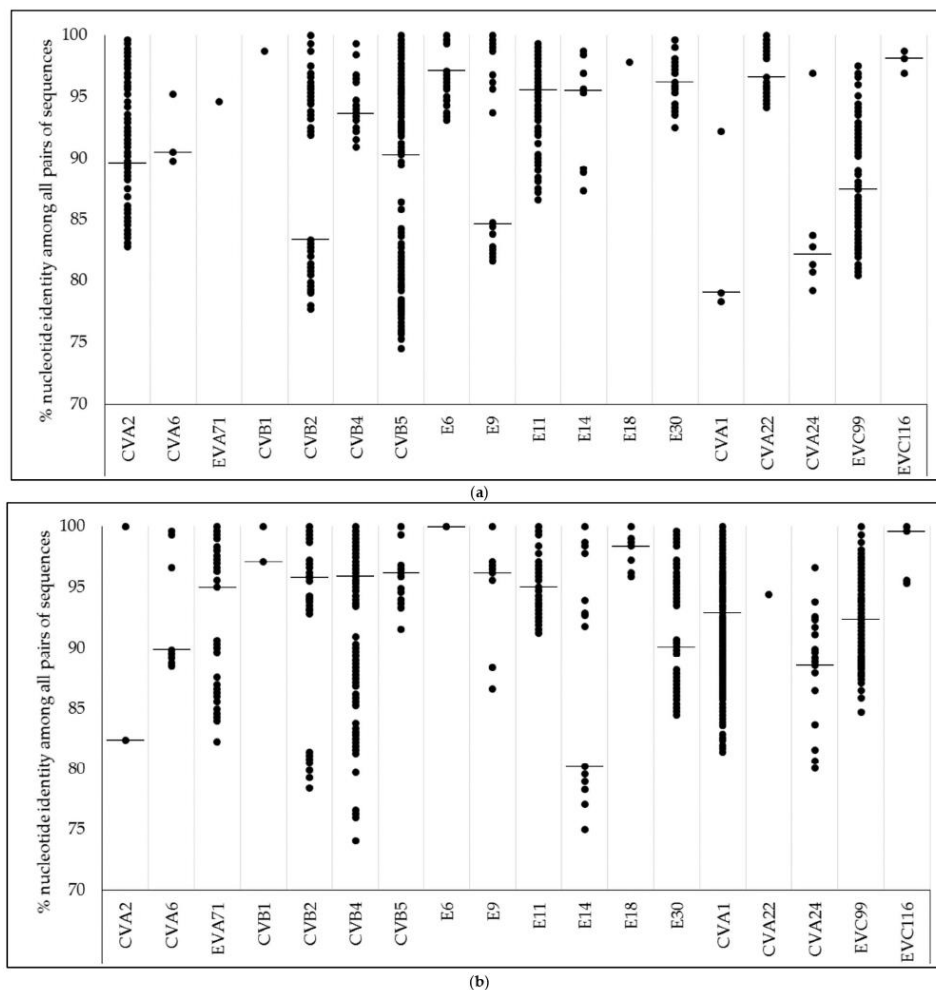


Figure 2. Nucleotide identity values over all the centroid sequences pairs for each Human Enterovirus type detected in wastewater samples from Córdoba City, Argentina in both periods (a) 2011–2012 and (b) 2017–2018. Horizontal bars indicate the median of nucleotide identity when more than a pair of centroid sequences was detected.

3.4. Backgrounds of Human Enteroviruses Detection in Argentina

After the bibliographic and nucleotide database search, we noted that this study constitutes the first detection in Argentina for 40% (15/38) of the non-polio EVs types detected here, mostly EV-A and EV-C types. Additionally, 17% (4/23) of non-polio EV types (CVA2, EVA71, CVB1, and E11) with previous evidence of circulation in the country are types whose detection is barely mentioned in previous studies and are without a register in GenBank. The majority of EV-B types were previously detected in Argentina (17/19), although last reports were from 15 years ago (or more) for ~50% of them (Table 2).

Table 2. Backgrounds of circulation in Argentina for Human Enteroviruses types detected in this study.

Type	More Recent Reported Isolates	Year/Period	Location	Source	Accession Number	Reference
CVA2	Just mentioned ^a	1991–1998	Unknown	AM	Unavailable	[23]
CVA4	Unknown	—	—	—	—	—
CVA6	CVA6/BSAS/Arg001/2018	2018	Buenos Aires	HFMD	MK867799	[39]
CVA8	Unknown	—	—	—	—	—
CVA10	Unknown	—	—	—	—	—
CVA12	Unknown	—	—	—	—	—
CVA16	707F99	Unknown	Unknown	Unknown	AF290092	[11]
EVA71	Just mentioned ^a	1991–1998	Unknown	AM & AFP	Unavailable	[23]
EVA76	Unknown	—	—	—	—	—
EVA90	Unknown	—	—	—	—	—
CVA9	Cba_Mar_2014_2	2014	Córdoba	Wastewater	MK435332	[21]
CVB1	Just mentioned ^a	1991–1998	Unknown	AFP	Unavailable	[23]
CVB2	AR1530-3-03	2003	Buenos Aires	Neurological disease	DQ282630	[22]
CVB3	AR1450-49-02	2002	Buenos Aires	Neurological disease	DQ246722	[22]
CVB4	Cba_Mar_2010	2010	Córdoba	Wastewater	MK435329	[21]
CVB5	AR875-48-01	2001	Buenos Aires	Neurological disease	DQ246729	[22]
E2	AR1095-20-02	2002	Buenos Aires	Neurological disease	DQ282634	[22]
E3	Unknown	—	—	—	—	—
E5	AR1617-8-03	2003	Buenos Aires	Neurological disease	DQ282627	[22]
E6	Cba_Feb_2014_1	2014	Córdoba	Wastewater	MK435318	[21]
E9	AR1669_12_03	2003	Buenos Aires	Neurological disease	DQ246752	[22]
E11	Just mentioned ^a	2005–2006	Buenos Aires	Surface water	Unavailable	[18]
E13	Cba_May_2013_1	2013	Córdoba	Wastewater	MK435334	[21]
E14	Cba_Set_2014	2014	Córdoba	Wastewater	MK435346	[21]
E15	Unknown	—	—	—	—	—
E16	Cba_Jun_2013	2013	Córdoba	Wastewater	MK435326	[21]
E17	875NE99	Unknown	Unknown	Unknown	AF290905	[11]

Table 2. Cont.

Type	More Recent Reported Isolates	Year/Period	Location	Source	Accession Number	Reference
E18	AR2109-44-03	2003	Buenos Aires	Neurological disease	DQ246765	[22]
E30	CHA468-ARG12	2012	Chaco	AM	MK410196	[13]
E32	Unknown	—	—	—	—	—
CVA1	Unknown	—	—	—	—	—
CVA11	Unknown	—	—	—	—	—
CVA13	ARG98-10613/ARG98-10614	1998	Unknown	Unknown	DQ995636	[40]
CVA19	Unknown	—	—	—	—	—
CVA22	Unknown	—	—	—	—	—
CVA24	Cba_Aug_2013/Cba_Aug_2014	2013/2014	Córdoba	Wastewater	MK435313	[21]
EVC99	Unknown	—	—	—	—	—
EVC116	Unknown	—	—	—	—	—

^a Human Enteroviruses (EVs) types mentioned as circulating in Argentina in an article, but without registry of nucleotide sequence in GenBank database. AM: Aseptic meningitis, AFP: acute flaccid paralysis, HFMD: Hand-foot-and-mouth disease.

3.5. Link between Human Enteroviruses Detected in Wastewater and Clinical Isolates

Nucleotide identity percentages of centroid sequences of echovirus 30 from this study and those available in GenBank obtained during the study of sporadic cases and outbreaks of AM accounted during 1998–2012 in different locations of Argentina [13] were compared (Table 3).

Table 3. Nucleotide identities among echovirus 30 strains detected in wastewater from Córdoba (in 2011, 2012, and 2017) and clinical isolates obtained from outbreaks and sporadic cases of aseptic meningitis accounted in Argentina between 1998 and 2012 reported by Lema et al., 2019 [13].

	Aseptic Meningitis Outbreak Buenos Aires ^a (Oct 2011–Mar 2012)	Two Aseptic Meningitis Sporadic Cases Córdoba (Mar 2012)	Aseptic Meningitis Outbreak Chaco ^a (Feb 2012–Apr 2012)	Other Echovirus 30 Strains Detected in 1998–2008 in Argentina
E30/COR/ARG/Dec_2011	95.9–99.3%	99%	97.8–99.3%	87.9–92.2%
E30/COR/ARG/Jan_2012	97.2–98.1%	97.80%	97.2–98.1%	87.6–91.9%
E30/COR/ARG/Feb_2012	97.5–98.4%	98.10%	97.5–98.4%	87.3–92.2%
E30/COR/ARG/Feb_2012	95.6–98.1%	97.80%	97.2–98.4%	87.3–91.9%
E30/COR/ARG/Jun_2012	96.2–99.6%	100%	98.1–99.6%	87.9–92.2%
E30/COR/ARG/Mar_2017	86.4–87.3%	87.30%	86.1–87.3%	87.9–92.2%
E30/COR/ARG/Mar_2017	83.3–84.5%	84.50%	83.3–84.5%	85.1–91.0%
E30/COR/ARG/Mar_2017	84.2–85.8%	85.10%	84.5–85.8%	87.6–91.9%
E30/COR/ARG/Mar_2017	85.8–87.3%	86.70%	86.7–87.6%	86.4–95.6%
E30/COR/ARG/Mar_2017	84.5–86.7%	86.10%	85.4–86.7%	86.1–92.5%
E30/COR/ARG/Mar_2017	85.4–86.4%	86.40%	85.1–86.4%	87.0–93.5%
E30/COR/ARG/Apr_2017	85.4–87.0%	86.40%	86.4–87.3%	87.3–95.3%
E30/COR/ARG/May_2017	86.1–87.6%	87.00%	87.0–87.9%	86.7–95.3%
E30/COR/ARG/Jun_2017	85.8–87.3%	86.70%	86.7–87.6%	87.0–95.6%
E30/COR/ARG/Jul_2017	86.4–87.9%	87.30%	87.3–88.2%	87.6–95.3%

^a Buenos Aires and Chaco Provinces are located 435 and 534 miles, respectively, from Province of Córdoba. Percentages in boldface show a close genetic relationship among environmental and clinical isolates circulating in Argentina in 2011–2012.

Echovirus 30 strains detected in wastewater in 2011 and 2012 were closely related with clinical isolates reported during outbreaks of AM accounted in Buenos Aires Province and Chaco Province in 2011 and 2012 (95.9–99.6%), and with isolates reported from the study of two sporadic cases reported in 2012 in Córdoba (97.8–100%). Instead, strains detected in wastewater in 2017 were more related with strains of clinical isolates from the period from 1998 to 2008 (85.1–95.6%) than with those strains more recently detected from medical diagnosis of AM (83.3–88.2%) in Argentina.

4. Discussion

We have studied the genetic diversity of EVs presented in wastewater from Córdoba, Argentina along two different sampling periods separated by a span of 5 years. Our analysis supports the circulation of 41 different EVs types during both periods, of which 38 of them are non-polio EVs.

The average numbers of types detected per 100,000 contigs were identical in the periods of 2011–2012 and 2017–2018 (Table 1), suggesting that differences initially observed in the detected number of types among periods were caused by sequencing depth, instead of an increased circulation of EV types during 2017–2018. To the best of our knowledge, this study represents the first detection in Argentina of 15 of these 38 EV types, being in the majority first detections of EV-A (6/15) and EV-C (6/15) types in the country. Despite the fact that most of the EV-B types detected in this study had been previously reported in Argentina, half of them, the last record in the country was at least 15 years ago (Table 2). Therefore, the results of our work contribute to a better understanding and updating of the epidemiology and circulation dynamics of EV in this South American country.

This study documented for Córdoba, Argentina, the recent circulation of several well-known EVs types, to be linked to different diseases such as HFMD (coxsackievirus A6, A10, A16), AM (echovirus 6, 30, coxsackievirus A9, B4), AHC (coxsackievirus A24), AFP (echovirus 14 and enterovirus A71), among others [4]. Such diversity of EVs linked to different diseases deserves attention from the public health point of view since when it is interpreted together with the scarce data obtained from medical diagnoses, this suggests, in the worst possible scenario, an under-reporting of several diseases with important implications for the population's health. Additionally, environmental samples frequently contain viable EVs [29,41–43] which means that several of the detected EVs types represented certain risk of infection to those who were exposed to wastewater or to other polluted environmental matrices.

Different EVs types present different circulation and/or predominance patterns along time [44]. The five years gap between both assayed periods limited our study in addressing the epidemiologic patterns followed by each EV type since there was a loss of information during this impasse. Nonetheless, some results about EVs types' diversity along the sampling of this study deserve highlighting. First, 60% (24/41) of the types detected in our study circulated both during 2011–2012 and during 2017–2018 (Figure S1), which could be either due to a prolonged circulation given by an endemic behavior, or resulted from recurrent entries into Córdoba that coincided with our sampling periods. Second, EVs types circulated under similar values of genetic diversity at each period (Figure 2). Nevertheless, there was a considerable expansion of the range of nucleotide identity towards lower values for EVA71 (EV-A), CVB4, E14, and E30 (EV-B) sequences in 2017–2018, which probably was a consequence of the introduction of phylogenetically distant strains at intra-type level after 2011–2012 (Figure S1). This highlights the dynamic circulation and indicates the need for future detailed inspection of clinical cases, potentially linked with these EV types in the community. Third, for some consecutive months (i.e., June–July 2012, November–December 2017) the diversity of EVs types abruptly changed (Figure 1). Other studies conducted in different parts of the world have also documented this complete (or almost complete) exchange of types from one month to another [27,45]. Diverse factors such as the differential seasonal fluctuations of types, immunity generation into population, occurrence of large outbreaks of different diseases, or the introduction of new viral variants,

among many others, could act as driving forces of this pattern. Unfortunately, most of the environmental studies of EVs which used next-generation sequencing have been conducted during short sampling campaigns as in our case [26–28,45–47]. Long-term environmental surveillance projects could be useful to elucidate epidemiological patterns for EVs beyond the bounded subset of EVs commonly detected when clinical specimens obtained from AM or AFP cases are studied.

Another interesting aspect of our study that deserves attention is the variation in diversity of EV species along the sampling period (Figure 1). The most evident change happened in the abundance of EV-C types during 2017–2018 in comparison with 2011–2012. This change was mainly driven by the ignition of CVA1 during 2017–2018, although other types such as CVA11 or CVA19 also contributed to it. In line with the herein achieved results, recent studies have documented high percentages of detection of EV-C types in environmental samples from distant points of the world [26,48,49]. Besides many coxsackievirus-A types and some numbered enteroviruses, this species includes three poliovirus types [50]. During many years, global efforts against EVs transmission were focused on the eradication of wild polioviruses through vaccination [51]. Previous studies have speculated about a “vacated niche” once poliovirus is eradicated, and based on the close genetic relation with poliovirus and the plasticity of their genomes, coxsackieviruses-A types from EV-C have been proposed as a potential successor of poliovirus in a poliovirus-free world [52]. Nevertheless, a recent study [53] did not find an increased circulation of EV-C types in a period characterized by less poliovirus circulation in a community, although this absence of detection of EV-C types could be the result of a bias introduced by the employed methods [54]. Therefore, the emergence of EV-C types as endemic viruses due to less poliovirus circulating in humans remains speculative. Nonetheless, the relevance of their silent spreading into a community should be the subject of future studies oriented towards a better understanding of the behavior of these rarely reported viruses from diagnoses [45,48,55].

Despite Argentina immunizing children with the live-attenuated Oral Poliovirus Vaccine (OPV) during the sampling periods of our study, we detected PV in 19% (6/32) of the collected samples. This low frequency of detection could probably be due to an amount of OPV excretors lower than the amount of other non-polio enteroviruses excretors in the population, with the consequence of PV strains’ dilution in the mixture of diverse EV types when wastewater samples are assayed with primers designed for broad target specificity. Nevertheless, other issues such as low catchment of immunized children shedding PV into the wastewater system, or different recovery efficiencies for different enteroviruses during the wastewater concentration procedure could be some of the factors affecting the PV detection rate in our study.

Unfortunately, there are few studies reporting EVs from medical diagnosis in Argentina [12,13,17,22,23] and data encompassing our sampling are not enough to make a detailed comparison among clinical and environmental strains for the 41 types herein detected. Nevertheless, echovirus 30 has probably been the most extensively studied EV type in Argentina [11–13], and there are several nucleotide sequences publicly available. This allowed us to conduct a retrospective comparison of echovirus 30 strains detected in this study with isolates obtained during outbreaks and sporadic cases of AM accounted in Córdoba and in other provinces of Argentina [13]. This comparison evidenced a close phylogenetic relation among environmental strains detected in Córdoba in samples taken from 2011–2012, and clinical isolates both from Córdoba and other locations from Argentina reported during those same years. Interestingly, our results show that when sporadic cases of AM linked with echovirus 30 were reported in Córdoba (March 2012) the virus had been circulating in the wastewater of the city for at least three months prior (Table 3). Similarly, a previous study [56] reported the silent circulation of echovirus 30 in the environment before the onset of a large outbreak of AM accounted in 2009 in Finland. However, a study conducted in Russia [57], failed in associating clinical and environmental isolates of echovirus 30 in the same temporal and geographical scenario, reporting echovirus 30

almost exclusively from medical diagnosis of AM. This emphasizes the use of highly sensitive and effective methods to unveil the complex diversity of EVs in environmental samples when wastewater-based epidemiology approaches are conducted. The lack of reports of AM linked to echovirus 30 in Argentina since 2012 made it impossible for us to compare the characterized environmental strains with contemporaneous clinical isolates. A link between environmental and clinical isolates of different EVs obtained in the same temporal and geographical range has been extensively documented [57–59]. Nevertheless, our study suggests that echovirus 30 strains detected in the environment of a specific location could predict future epidemics beyond local boundaries. This has a valuable application in a potential national environmental surveillance system based on sentinel points for anticipating the occurrence of outbreaks.

Despite the fact that our approach is an improvement compared to the classic diagnostic methods routinely used across laboratories [60], and the fact that it allowed the detection of up to 16 different EVs per sample; other similar approaches have shown a higher sensitivity [26,45]. Different issues such as the wastewater concentration method, the amount of template used in RNA extraction, RT-PCR methods, or some details regarding the sampling strategy or, indeed, epidemiological aspects could be affecting the number of types detected per sample among different studies. Future comparative studies are needed in order to know the advantages and disadvantages of each approach to evaluate their applicability in accomplishing different specific goals.

In summary, we implemented a wastewater-based epidemiology approach with next-generation sequencing of a viral gene amplified by PCR in order to depict the diversity of EVs circulating in Córdoba, Argentina. This leads to a better characterization of the presence of these viruses in the country, showing how useful this kind of approach is—when continuously conducted from the wastewater of a community—to know in advance the circulation of EVs potentially hazardous for the public health.

Supplementary Materials: The following are available online at <https://www.mdpi.com/1999-4915/13/1/120/s1>, Figure S1A–C: Maximum likelihood phylogenetic trees of Human Enterovirus species A (A), B (B), and C (C). Each tree was constructed with centroid sequences detected in wastewater samples from Córdoba City (Argentina) during this study and representative sequences of different Human Enteroviruses types reported elsewhere. Dotted lines projecting outward from branches represent centroid sequences. Colored circles and squares indicate the period(s) in which different phylogenetic clusters of this study were detected. aLRT-SH values at type-definition node levels were >0.7 for all types. The bar at the center of each phylogenetic tree denotes genetic distance. CVA: coxsackievirus type A; CVB: coxsackievirus type B; E: echovirus; EVA: enterovirus type A; EVB: enterovirus type B; EVC: enterovirus type C; PV: poliovirus. Table S1: Information about clinical isolates of echovirus 30 obtained from aseptic meningitis cases accounted in Argentina in 1998–2012 (reported by Lema et al. 2019 [13]), used in a comparison with echovirus 30 strains detected in wastewater by this study.

Author Contributions: Conceptualization, A.L. and R.C.; data curation, A.L. and D.M.; formal analysis, A.L. and D.M.; funding acquisition, S.N. and R.C.; investigation, A.L., D.M., G.M., and A.F.; methodology, A.L., D.M., M.V., and R.C.; project administration, R.C.; resources, N.R.-O., S.N., and R.C.; software, D.M.; supervision, R.C.; validation, A.L. and R.C.; visualization, A.L. and D.M.; writing—original draft, A.L.; writing—review and editing, A.L., D.M., G.M., A.F., N.R.-O., M.V., S.N., and R.C. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by Programa Polos de Desarrollo Universitario from Comisión Coordinadora del Interior of the Universidad de la República, Uruguay, grant PDU2010, and by National Agency for Scientific and Technological Promotion, Argentina, ANPCyT-FONCyT-PICT 2016 grant 2165. Authors receive financial support from Sistema Nacional de Investigadores (SNI) of Agencia Nacional de Investigación e Innovación (ANII), Uruguay, and from Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Argentina. A.L. received a PhD scholarship in 2016–2019 from Comisión Académica de Posgrado (CAP) and Programa de Desarrollo de las Ciencias Básicas (PEDECIBA) of Universidad de la República, Uruguay.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: Sequencing data is openly available in Sequence Read Archive (SRA) repository under BioProject number PRJNA689577.

Acknowledgments: Authors thank Asociación de Universidades Grupo Montevideo (AUGM) for promoting scientific collaboration between their research groups.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript; or in the decision to publish the results.

References

- Zell, R.; Delwart, E.; Gorbalenya, A.E.; Hovi, T.; King, A.M.Q.; Knowles, N.J.; Lindberg, A.M.; Pallansch, M.A.; Palmenberg, A.C.; Reuter, G.; et al. ICTV Virus Taxonomy Profile: *Picornaviridae*. *J. Gen. Virol.* **2017**, *98*, 2421–2422. [CrossRef]
- Muehlenbachs, A.; Bhatnagar, J.; Zaki, S.R. Tissue tropism, pathology and pathogenesis of enterovirus infection. *J. Pathol.* **2014**, *235*, 217–228. [CrossRef] [PubMed]
- Stalkup, J.R.; Chilukuri, S. Enterovirus infections: A review of clinical presentation, diagnosis, and treatment. *Dermatol. Clin.* **2002**, *20*, 217–223. [CrossRef]
- Tapparel, C.; Siegrist, F.; Petty, T.J.; Kaiser, L. Picornavirus and enterovirus diversity with associated human diseases. *Infect. Genet. Evol.* **2013**, *14*, 282–293. [CrossRef] [PubMed]
- De Crom, S.C.M.; Rossen, J.W.A.; Van Furth, A.M.; Obihara, C.C. Enterovirus and parechovirus infection in children: A brief overview. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* **2016**, *175*, 1023–1029. [CrossRef]
- Centers for Disease Control and Prevention. National Center for Immunization and Respiratory Diseases (NCIRD), Division of Viral Diseases Non-Polio Enterovirus. Transmission. Available online: <https://www.cdc.gov/non-polio-enterovirus/about/transmission.html> (accessed on 30 March 2020).
- Melnick, J.L.; Rennick, V. Infectivity titers of enterovirus as found in human stools. *J. Med. Virol.* **1980**, *5*, 205–220. [CrossRef]
- Tao, Z.; Wang, Z.; Lin, X.; Wang, S.; Wang, H.; Yoshida, H.; Xu, A.; Song, Y. One-year Survey of human enteroviruses from sewage and the factors affecting virus adsorption to the suspended solids. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 31474. [CrossRef]
- Benschop, K.S.M.; Van Der Avoort, H.G.; Jusic, E.; Vennema, H.; Van Binnendijk, R.; Duizer, E. Polio and Measles Down the Drain: Environmental Enterovirus Surveillance in the Netherlands, 2005 to 2015. *Appl. Environ. Microbiol.* **2017**, *83*, e00558–17. [CrossRef]
- Lukashev, A.N.; Vakulenko, Y.A.; Turbabin, N.A.; Deviatkin, A.A.; Drexler, J.F. Molecular epidemiology and phylogenetics of human enteroviruses: Is there a forest behind the trees? *Rev. Med. Virol.* **2018**, *28*, e2002. [CrossRef]
- Palacios, G.; Casas, I.; Cisterna, D.; Trallero, G.; Tenorio, A.; Freire, C. Molecular Epidemiology of Echovirus 30: Temporal Circulation and Prevalence of Single Lineages. *J. Virol.* **2002**, *76*, 4940–4949. [CrossRef]
- Fariás, A.; Cabrerizo, M.; Ré, V.; Glatstein, N.; Pisano, B.; Spinsanti, L.; Contigiani, M.S. Molecular identification of human enteroviruses in children with neurological infections from the central region of Argentina. *Arch. Virol.* **2010**, *156*, 129–133. [CrossRef] [PubMed]
- Lema, C.; Torres, C.; Van Der Sanden, S.; Cisterna, D.M.; Freire, M.C.; Gomez, R.M. Global phylogenetics of Echovirus 30 revealed differential behavior among viral lineages. *Virology* **2019**, *531*, 79–92. [CrossRef] [PubMed]
- Freire, M.C.; Cisterna, D.M.; Rivero, K.; Palacios, G.; Casas, I.; Tenorio, A.; Gomez, J.A. Análisis de un brote de meningitis viral en la provincia de Tucumán, Argentina. *Rev. Panam. Salud. Pública.* **2003**, *13*, 246–251. [CrossRef] [PubMed]
- Grenón, S.L.; Robledo, M.L.; von Specht, M.H.; Cisterna, D.M.; Lema, C.L.; Freire, M.C. Brote epidémico de meningitis viral causado por echovirus tipo 4 en la provincia de Misiones. *Rev. Argent. Microbiol.* **2008**, *40*, 41–46.
- Ruggieri, V.; Paz, M.I.; Peretti, M.G.; Rugilo, C.; Bologna, R.; Freire, C.; Vergel, S.; Savransky, A. Enterovirus D68 infection in a cluster of children with acute flaccid myelitis, Buenos Aires, Argentina, 2016. *Eur. J. Paediatr. Neurol.* **2017**, *21*, 884–890. [CrossRef]
- Cisterna, D.M.; Lema, C.L.; Martinez, L.M.; Verón, E.; Contarino, L.P.; Acosta, D.; Freire, M.C. Atypical hand, foot, and mouth disease caused by Coxsackievirus A6 in Argentina in 2015. *Rev. Argent. Microbiol.* **2019**, *51*, 140–143. [CrossRef]
- Cisterna, D.; Lema, C.; Riviello López, G.; Freyre, L.; Martínez, L.; Torres, C.; Mbayed, V.; Freire, M.C. Detección y Caracterización de Enterovirus y Hepatitis A en el Riachuelo y Río de la Plata. In *Libro de Resúmenes del IX Congreso Argentino de Virología 2008*. Buenos Aires, Argentina, 2008; Revista Argentina de Microbiología: Buenos Aires, Argentina, 2008; abstract number 69-22999; pp. 49–50.
- Mueller, J.E.; Bessaud, M.; Huang, S.; Martinez, L.C.; Barril, P.A.; Morel, V.; Balanant, J.; Bocacao, J.; Hewitt, J.; Gessner, B.D.; et al. Environmental Poliovirus Surveillance during Oral Poliovirus Vaccine and Inactivated Poliovirus Vaccine Use in Córdoba Province, Argentina. *Appl. Environ. Microbiol.* **2009**, *75*, 1395–1401. [CrossRef]
- Fariás, A.A.; Mojsiejczuk, L.; Pisano, M.B.; Flores, F.S.; Aguilar, J.J.; Jean, A.N.; Yanes, L.A.; Masachessi, G.; Prez, V.E.; Isa, M.B.; et al. Environmental Surveillance of Enteroviruses in Central Argentina: First Detection and Evolutionary Analyses of E14. *Food Environ. Virol.* **2018**, *10*, 121–126. [CrossRef]

21. Fariás, A.A.; Mojsiejczuk, L.; Flores, F.S.; Aguilar, J.J.; Prez, V.E.; Masachessi, G.; Nates, S.V. Environmental Surveillance of Human Enteroviruses in Córdoba City, Argentina: Prevalence and Detection of Serotypes from 2009 to 2014. *Food Environ. Virol.* **2019**, *11*, 198–203. [CrossRef]
22. Mistchenko, A.S.; Viegas, M.; Latta, M.P.; Barrero, P.R. Molecular and epidemiologic analysis of enterovirus B neurological infection in Argentine children. *J. Clin. Virol.* **2006**, *37*, 293–299. [CrossRef]
23. Cisterna, D.M.; Palacios, G.; Rivero, K.; Girard, D.; Lema, C.; Freire, M.C. Epidemiology of enterovirus associated with neurologic diseases [in Spanish]. *Medicina (B Aires)* **2007**, *67*, 113–119. [PubMed]
24. Wang, H.; Tao, Z.; Li, Y.; Lin, X.; Yoshida, H.; Song, L.; Zhang, Y.; Wang, S.; Cui, N.; Xu, W.; et al. Environmental Surveillance of Human Enteroviruses in Shandong Province, China, 2008 to 2012: Serotypes, Temporal Fluctuation, and Molecular Epidemiology. *Appl. Environ. Microbiol.* **2014**, *80*, 4683–4691. [CrossRef] [PubMed]
25. Joffret, M.-L.; Polston, P.M.; Razafindratsimandresy, R.; Bessaud, M.; Heraud, J.-M.; Delpeyroux, F. Whole Genome Sequencing of Enteroviruses Species A to D by High-Throughput Sequencing: Application for Viral Mixtures. *Front. Microbiol.* **2018**, *9*, 2339. [CrossRef] [PubMed]
26. Majumdar, M.; Sharif, S.; Klapsa, D.; Wilton, T.; Alam, M.M.; Fernandez-Garcia, M.D.; Rehman, L.; Mujtaba, G.; McAllister, G.; Harvala, H.; et al. Environmental Surveillance Reveals Complex Enterovirus Circulation Patterns in Human Populations. *Open Forum Infect. Dis.* **2018**, *5*, ofy250. [CrossRef] [PubMed]
27. Bisseux, M.; Debroas, D.; Mirand, A.; Archimbaud, C.; Peigue-Lafeuille, H.; Bailly, J.-L.; Henquell, C.; Didier, D.; Audrey, M.; Christine, A.; et al. Monitoring of enterovirus diversity in wastewater by ultra-deep sequencing: An effective complementary tool for clinical enterovirus surveillance. *Water Res.* **2020**, *169*, 115246. [CrossRef] [PubMed]
28. Martínez-Puchol, S.; Rusiñol, M.; Fernández-Cassi, X.; Timoneda, N.; Itarte, M.; Andrés, C.; Antón, A.; Abril, J.F.; Girones, R.; Bofill-Mas, S. Characterisation of the sewage virome: Comparison of NGS tools and occurrence of significant pathogens. *Sci. Total. Environ.* **2020**, *713*, 136604. [CrossRef]
29. Masachessi, G.; Pisano, M.B.; Prez, V.E.; Martínez, L.C.; Michelena, J.F.; Martínez-Wassaf, M.; Giordano, M.O.; Isa, M.B.; Pavan, J.V.; Welter, A.; et al. Enteric Viruses in Surface Waters from Argentina: Molecular and Viable-Virus Detection. *Appl. Environ. Microbiol.* **2017**, *84*, e02327-17. [CrossRef]
30. Instituto Nacional de Estadística y Censos de la República Argentina. Censo Nacional de Población, Hogares y Viviendas. Available online: <https://www.indec.gov.ar/indec/web/Nivel4-Tema-2-41-135> (accessed on 13 January 2021).
31. Nix, W.A.; Oberste, M.S.; Pallansch, M.A. Sensitive, Seminested PCR Amplification of VP1 Sequences for Direct Identification of All Enterovirus Serotypes from Original Clinical Specimens. *J. Clin. Microbiol.* **2006**, *44*, 2698–2704. [CrossRef]
32. Illumina support web-site. Available online: https://support.illumina.com/documents/documentation/chemistry_documentation/16s/16s-metagenomic-library-prep-guide-15044223-b.pdf (accessed on 14 December 2020).
33. Rognes, T.; Flouri, T.; Nichols, B.; Quince, C.; Mahé, F. VSEARCH: A versatile open source tool for metagenomics. *PeerJ.* **2016**, *4*, e2584. [CrossRef]
34. Li, W.; Godzik, A. Cd-hit: A fast program for clustering and comparing large sets of protein or nucleotide sequences. *Bioinformatics* **2006**, *22*, 1658–1659. [CrossRef]
35. Price, M.N.; Dehal, P.S.; Arkin, A.P. FastTree 2—Approximately Maximum-Likelihood Trees for Large Alignments. *PLoS ONE* **2010**, *5*, e9490. [CrossRef] [PubMed]
36. Shimodaira, H.; Hasegawa, M. CONSEL: For assessing the confidence of phylogenetic tree selection. *Bioinformatics* **2001**, *17*, 1246–1247. [CrossRef] [PubMed]
37. Anisimova, M.; Gascuel, O. Approximate Likelihood-Ratio Test for Branches: A Fast, Accurate, and Powerful Alternative. *Syst. Biol.* **2006**, *55*, 539–552. [CrossRef]
38. Hall, T.A. BioEdit: A user-friendly biological sequences alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp. Ser.* **1999**, *41*, 95–98.
39. Sapia, E.Y.; Maroni, C.; Groisman, C.; Kromer, H.; Rojo, G.L.; Dastugue, M.; Valinotto, L. Genotipificación del virus de la enfermedad mano-pie-boca atípica en un hospital pediátrico de la Ciudad de Buenos Aires, Argentina. *Arch. Argent. Pediatr.* **2020**, *118*, e199–e203. [CrossRef] [PubMed]
40. Brown, B.A.; Maher, K.; Flemister, M.R.; Naraghi-Arani, P.; Uddin, M.; Oberste, M.S.; Pallansch, M.A. Resolving ambiguities in genetic typing of human enterovirus species C clinical isolates and identification of enterovirus 96, 99 and 102. *J. Gen. Virol.* **2009**, *90*, 1713–1723. [CrossRef]
41. Adeniji, J.A.; Faleye, T.O.C. Isolation and Identification of Enteroviruses from Sewage and Sewage-Contaminated Water in Lagos, Nigeria. *Food Environ. Virol.* **2014**, *6*, 75–86. [CrossRef]
42. Wiecezorek, M.; Ciacka, A.; Witek, A.; Kuryk, L.; Żuk-Wasek, A. Environmental Surveillance of Non-polio Enteroviruses in Poland, 2011. *Food Environ. Virol.* **2015**, *7*, 224–231. [CrossRef]
43. Prez, V.; Martínez, L.; Victoria, M.; Giordano, M.; Masachessi, G.; Ré, V.; Pavan, J.; Colina, R.; Barril, P.; Nates, S. Tracking enteric viruses in green vegetables from central Argentina: Potential association with viral contamination of irrigation waters. *Sci. Total. Environ.* **2018**, *665*–671. [CrossRef]
44. Pons-Salort, M.; Oberste, M.S.; Pallansch, M.A.; Abedi, G.R.; Takahashi, S.; Grenfell, B.T.; Grassly, N.C. The seasonality of nonpolio enteroviruses in the United States: Patterns and drivers. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2018**, *115*, 3078–3083. [CrossRef]

45. Brinkman, N.E.; Fout, G.S.; Keely, S.P. Retrospective Surveillance of Wastewater To Examine Seasonal Dynamics of Enterovirus Infections. *mSphere* **2017**, *2*, e00099-17. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
46. Baicus, A.; Joffret, M.-L.; Bessaud, M.; Delpeyroux, F.; Oprisan, G. Reinforced poliovirus and enterovirus surveillance in Romania, 2015–2016. *Arch. Virol.* **2020**, *165*, 1–6. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
47. Tao, Z.; Chen, P.; Cui, N.; Lin, X.; Ji, F.; Liu, Y.; Xiong, P.; Zhang, L.; Xu, Q.; Song, Y.; et al. Detection of enteroviruses in urban sewage by next generation sequencing and its application in environmental surveillance. *Sci. Total. Environ.* **2020**, *728*, 138818. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
48. Harvala, H.; Calvert, J.; Van Nguyen, D.; Clasper, L.; Gadsby, N.; Molyneaux, P.; Templeton, K.; Leitch, C.M.; Simmonds, P. Comparison of diagnostic clinical samples and environmental sampling for enterovirus and parechovirus surveillance in Scotland, 2010 to 2012. *Eurosurveillance* **2014**, *19*, 20772. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
49. Ndiaye, A.K.; Mbathio, P.A.; Diop, P.A.M. Environmental surveillance of poliovirus and non-polio enterovirus in urban sewage in Dakar, Senegal (2007–2013). *Pan Afr. Med. J.* **2014**, *19*, 243. [\[CrossRef\]](#)
50. Brown, B.; Oberste, M.S.; Maher, K.; Pallansch, M.A. Complete Genomic Sequencing Shows that Polioviruses and Members of Human Enterovirus Species C Are Closely Related in the Noncapsid Coding Region. *J. Virol.* **2003**, *77*, 8973–8984. [\[CrossRef\]](#)
51. Kew, O.; Pallansch, M. Breaking the Last Chains of Poliovirus Transmission: Progress and Challenges in Global Polio Eradication. *Annu. Rev. Virol.* **2018**, *5*, 427–451. [\[CrossRef\]](#)
52. Jiang, P.; Faase, J.A.J.; Toyoda, H.; Paul, A.; Wimmer, E.; Gorbalenya, A.E. Evidence for emergence of diverse polioviruses from C-cluster coxsackie A viruses and implications for global poliovirus eradication. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2007**, *104*, 9457–9462. [\[CrossRef\]](#)
53. Zhao, C.; Lin, X.; Ji, F.; Xiong, P.; Liu, Y.; Wang, S.; Chen, P.; Xu, Q.; Zhang, L.; Tao, Z.; et al. Prevalence and Bayesian Phylogenetics of Enteroviruses Derived From Environmental Surveillance Around Polio Vaccine Switch Period in Shandong Province, China. *Food Environ. Virol.* **2020**, *12*, 321–332. [\[CrossRef\]](#)
54. Faleye, T.O.C.; Adeniji, J.A. Enterovirus Species B Bias of RD Cell Line and Its Influence on Enterovirus Diversity Landscape. *Food Environ. Virol.* **2015**, *7*, 390–402. [\[CrossRef\]](#)
55. Bubba, L.; Broberg, E.K.; Jasir, A.; Simmonds, P.; Harvala, H.; Redlberger-Fritz, M.; Nikolaeva-Glomb, L.; Havlíčková, M.; Rainetova, P.; Fischer, T.K.; et al. Circulation of non-polio enteroviruses in 24 EU and EEA countries between 2015 and 2017: A retrospective surveillance study. *Lancet Infect. Dis.* **2020**, *20*, 350–361. [\[CrossRef\]](#)
56. Savolainen-Kopra, C.; Paananen, A.; Blomqvist, S.; Klemola, P.; Simonen, M.-L.; Lappalainen, M.; Vuorinen, T.; Kuusi, M.; Lemey, P.; Roivainen, M. A large Finnish echovirus 30 outbreak was preceded by silent circulation of the same genotype. *Virus Genes* **2010**, *42*, 28–36. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
57. Ivanova, O.E.; Yarmolskaya, M.S.; Ereemeeva, T.P.; Babkina, G.M.; Baikova, O.Y.; Akhmadishina, L.V.; Krasota, A.Y.; Kozlovskaya, L.I.; Lukashov, A.N. Environmental Surveillance for Poliovirus and Other Enteroviruses: Long-Term Experience in Moscow, Russian Federation, 2004–2017. *Viruses* **2019**, *11*, 424. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
58. Sedmak, G.; Bina, D.; Macdonald, J. 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.* **2003**, *69*, 7181–7187. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
59. Tao, Z.; Song, Y.; Wang, H.; Zhang, Y.; Yoshida, H.; Ji, S.; Xu, A.; Song, L.; Liu, Y.; Cui, N.; et al. Intercity Spread of Echovirus 6 in Shandong Province, China: Application of Environmental Surveillance in Tracing Circulating Enteroviruses. *Appl. Environ. Microbiol.* **2012**, *78*, 6946–6953. [\[CrossRef\]](#)
60. Harvala, H.; Broberg, E.; Benschop, K.; Berginc, N.; Ladhani, S.N.; Susi, P.; Christiansen, C.; McKenna, J.; Allen, D.; Makiello, P.; et al. Recommendations for enterovirus diagnostics and characterisation within and beyond Europe. *J. Clin. Virol.* **2018**, *101*, 11–17. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)

Si bien en el artículo no fue incluido, también se estudió la diversidad genética de cada secuencia única que clusterizaba en torno a cada uno de los seis centroides (OTUs) de poliovirus que se detectaron durante este trabajo.

Se detectaron OTUs de poliovirus 1 en enero de 2012 y marzo de 2017; de poliovirus 2 en noviembre de 2012; y de poliovirus 3 en abril, julio y setiembre de 2011. A continuación, se detalla el número de secuencias únicas contenidas en cada OTU, y las abundancias asociadas para dichas secuencias (número de *contigs*).

OTUs Poliovirus 1:

- a) Enero 2012: 2 secuencias únicas con abundancias de 2 y 21 *contigs*.
- b) Marzo 2017: 683 secuencias únicas con abundancias en el rango de 2 a 14.809 *contigs*.

OTU Poliovirus 2:

- c) Noviembre 2012: 448 secuencias únicas con abundancias en el rango de 2 a 5.392 *contigs*.

OTUs Poliovirus 3:

- d) Abril 2011: 121 secuencias únicas con abundancias en el rango de 2 a 1.119 *contigs*.
- e) Julio 2011: 1.073 secuencias únicas con abundancias en el rango de 2 a 25,005 *contigs*.
- f) Setiembre 2011: 1 secuencia única con abundancia de 2 *contigs*.

Se calculó el porcentaje de diferencias nucleotídicas entre cada una de las secuencias únicas que mapeó con poliovirus y la respectiva cepa Sabin. Dichos valores fueron graficados en función del número de *contigs* expresado en Log₁₀ (Abundancia) de cada secuencia única (Figura 14).

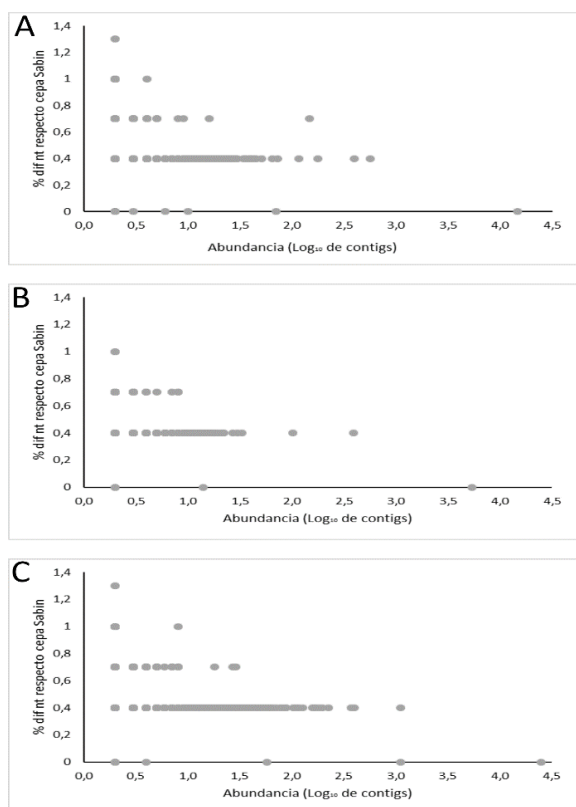


Figura 14. Divergencia entre secuencias de poliovirus obtenidas durante este estudio con respecto a las cepas de la vacuna Sabin, para serotipos poliovirus 1 (A), poliovirus 2 (B) y poliovirus 3(C), expresada en función de la abundancia de cada secuencia. La divergencia es estimada como porcentaje de diferencias nucleotídicas con respecto a las secuencias AY184219 (Sabin 1), AY184220 (Sabin 2) y AY184221 (Sabin 3). La abundancia para cada secuencia de este estudio, es expresada como Log₁₀ del número de *contigs* que mapeó contra poliovirus en cada muestra. Recuérdese que las secuencias de poliovirus obtenidas en este estudio, a partir de 6 muestras de agua residual colectada en Córdoba, corresponden a segmentos parciales del fragmento codificante de la proteína VP1.

Las secuencias de poliovirus 1 (Figura 14A) y poliovirus 3 (Figura 14C) detectadas en el agua residual de Córdoba fueron divergentes hasta un valor de 1,4% a nivel nucleotídico con respecto a las cepas Sabin, y las de poliovirus 2 hasta un 1% (Figura 14B). Obsérvese que, en todos los casos, aquellas secuencias más divergentes, se encuentran entre las que menor abundancia poseen.

El ANEXO 3 muestra los resultados de la *next-generation sequencing*, del filtrado de *reads* y del proceso de mapeo, para cada muestra de Córdoba.

5.1.3.

Artículo 3: “Human Enterovirus diversity by next-generation sequencing analysis in urban sewage samples from Buenos Aires metropolitan area, Argentina: a retrospective study”.

Año: 2021

Revista: Food and Environmental Virology

El artículo que a continuación se presenta, fue posible gracias a la colaboración con docentes investigadores de la Cátedra de Virología de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad de Buenos Aires, que poseían colecciones de concentrados virales obtenidos mediante ultracentrifugación de muestras de agua residual colectadas en el afluente de una planta de tratamiento en distintos momentos de 2011 y 2013 (44 ml cada muestra). Dichas muestras habían sido colectadas originalmente en el marco de un proyecto ejecutado entre la mencionada Cátedra y el Instituto Malbrán, por lo que los resultados mostrados en este artículo, son fruto de la colaboración de nuestro grupo con investigadores de ambas instituciones.

Los concentrados virales se estudiaron mediante la *next-generation sequencing* de un amplicón obtenido mediante una RT-nested PCR dirigida hacia la región codificante de VP1 (ANEXO 2), y se realizaron análisis filogenéticos de algunos enterovirus de interés, cuya presencia en Buenos Aires, había sido previamente reportada a partir del estudio de casos clínicos.

Se detectaron 17 enterovirus distintos (entre 1 y 7 serotipos distintos por muestra) pertenecientes a la especie A (CVA4, CVA5 y CVA16), a la especie B (CVA9, CVB4, E1, E6, E9, E13 y EV-B74), y a la especie C (CVA1, CVA13, CVA22, CVA24, EV-C99, EV-C105, y EV-C116).

El porcentaje de similitud nucleotídica entre las OTUs de un mismo serotipo tomó valores superiores al 80% en la mayoría de los casos, con la excepción de las OTUs de echovirus 1, las cuales fueron similares entre un 72% a 75%. Un análisis filogenético de echovirus 1, demostró que las cepas detectadas en este estudio pertenecen probablemente a dos linajes distantes definidos por la segregación de las cepas prototipo Bryson y Farouk.

De todos los serotipos detectados en las muestras que analizamos, únicamente había secuencias nucleotídicas obtenidas durante reportes previos de circulación en Buenos Aires para CVB4 y E9. Por esta razón, se realizó un análisis filogenético para ambos serotipos, incorporando las secuencias obtenidas de aislados clínicos en estudios realizados previamente en Buenos Aires, o en otras locaciones de Argentina, así como secuencias reportadas en el resto del mundo, incluyendo países de la región sudamericana.

Se evidenciaron distintos eventos de introducción de CVB4 y E9 en la Argentina, así como la dispersión a nivel nacional de algunas variantes. Adicionalmente, en el análisis filogenético se observaron grupos monofiléticos de variantes uruguayas, brasileras y argentinas, lo cual sugiere un patrón de circulación regional para las mismas.

El ANEXO 3 muestra los resultados de la *next-generation sequencing*, del filtrado de *reads* y del proceso de mapeo, para cada muestra de Buenos Aires.



Human Enterovirus Diversity by Next-Generation Sequencing Analysis in Urban Sewage Samples From Buenos Aires Metropolitan Area, Argentina: A Retrospective Study

A. Lizasoain¹ · D. Mir² · M. Victoria¹ · M. E. Barrios³ · M. D. Blanco-Fernández³ · N. Rodríguez-Osorio² · S. Nates⁴ · D. Cisterna⁵ · V. A. Mbayed³ · R. Colina¹

Received: 30 October 2020 / Accepted: 20 February 2021 / Published online: 6 March 2021
© The Author(s), under exclusive licence to Springer Science+Business Media, LLC part of Springer Nature 2021

Abstract

Human Enteroviruses (hEVs) are responsible for a wide variety of human diseases. During hEVs infection, virions are excreted in human feces and the fecal–oral route is the primary pathway for person-to-person transmission. Sewage surveillance could help in monitoring hEVs circulation and describing their diversity in a specific population. In this study, sewage samples collected in Buenos Aires Metropolitan Area (Argentina) were retrospectively studied through an amplicon-deep sequencing approach and phylogenetic analyses to characterize hEVs spread. We identified 17 different hEVs types belonging to A, B, and C species. To the best of our knowledge, this is the first report in Buenos Aires for 7 identified hEV-C types. Phylogenetic analyses suggest several introductions of coxsackievirus B4, echovirus 1, and echovirus 9 in the country, along with the national spread reached by some variants. Besides, well-supported monophyletic groups of Argentine, Uruguayan, and Brazilian strains unveiled regional circulation patterns for some variants. These results extend our knowledge about hEVs circulation in Buenos Aires and might exhort authorities to implement more active sewage surveillance in the region.

Keywords Enterovirus · Sewage · Environment · Health · Deep Sequencing

Introduction

Human Enteroviruses (hEVs) (Family *Picornaviridae*, Genus *Enterovirus*) comprise a diverse group of viruses (Zell et al. 2017) responsible for a wide variety of human diseases, including mild febrile illness, upper and lower respiratory diseases, hand-foot-and-mouth disease (HFMD), myocarditis, aseptic meningitis, encephalitis, myelitis, acute flaccid paralysis (AFP), among others (Tapparel et al. 2013). Small and non-enveloped icosahedral capsids containing single-stranded positive-sense RNA genomes of approximately 7.5 kb in length define the hEVs virion basic structure (Pallansch et al. 2013). Well-known hEVs types include over 100 serotypes of coxsackievirus A and B (CVA and CVB), echovirus (E), poliovirus (PV), and numbered enteroviruses (EV), all additionally classified into four viral species: hEV-A to hEV-D (Hyypiä et al. 1997; Oberste et al. 1999; Zell et al. 2017). The gastrointestinal and respiratory tracts can both be initial replication sites for hEVs (van der Linden et al. 2015); thus, infected individuals can excrete virions through respiratory droplets and feces (Mach et al. 2014) independently of the onset of symptoms. However,

✉ R. Colina
rodneycolina1@gmail.com

- ¹ Laboratorio de Virología Molecular, Departamento de Ciencias Biológicas, Centro Universitario Regional del Litoral Norte, Universidad de La República, 1350 Gral. Rivera St. Salto, 50000 Salto, Uruguay
- ² Unidad de Genómica y Bioinformática, Departamento de Ciencias Biológicas, Centro Universitario Regional del Litoral Norte, Universidad de La República, Salto, Uruguay
- ³ Cátedra de Virología, Instituto de Investigaciones en Bacteriología y Virología Molecular, Facultad de Farmacia Y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires, Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina
- ⁴ Laboratorio de Gastroenteritis Virales y Sarampión, Instituto de Virología Dr. J. M. Vanella, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Córdoba, Córdoba, Argentina
- ⁵ Servicio de Neurovirosis, Departamento de Virología, Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas, Administración Nacional de Laboratorios e Institutos de Salud Dr. Carlos G. Malbrán, Buenos Aires, Argentina

the fecal–oral route is still considered the major person-to-person transmission pathway for hEVs. Diverse studies have successfully taken advantage of hEVs fecal excretion during either symptomatic or asymptomatic infections and analyzed sewage samples to describe hEVs diversity (Benschop et al. 2017), seasonality (Battistone et al. 2014), or the silent spread of an emerging type (Majumdar & Martin, 2018). Sewage water surveillance, together with clinical information, is a useful strategy for the identification of circulating hEVs types among a population for a given period. The diversity of hEV types circulating in Buenos Aires has probably been largely underestimated since only a few studies (Supplementary Material 1) have been sporadically published and environmental surveillance studies are scarce (Cisterna et al. 2008, unpublished). This study contributes to the characterization of hEVs circulation in Buenos Aires during 2011 and 2013.

Materials and Methods

Sewage Samples

Ten sewage concentrates were obtained through an ultracentrifugation method (Pina et al. 1998) from 44 ml of sewage samples and were retrospectively assessed to unveil the environmental circulation of hEV in Buenos Aires Metropolitan Area, Argentina. Samples were collected from the inlet of a sewage treatment plant in 2011 ($n = 6$) and 2013 ($n = 4$).

hEVs Detection and Illumina MiSeq Sequencing

Viral RNA was extracted from 140 μ l of each sewage concentrate with the QIAamp Viral RNA Mini Kit (Qiagen). The reverse transcription reaction was carried out with primers AN32, AN33, AN34, and AN35 (Nix et al. 2006) directed towards the 3' end of VP1 in the hEVs genomes, using the RevertAid Reverse Transcriptase enzyme (Thermo Scientific) according to the manufacturer guidelines. hEVs detection was carried out through a nested PCR with primers 222 and 224, and primers AN88 and AN89 in the first and second rounds, respectively (Nix et al. 2006). The inner PCR amplification target was a ~350-nucleotide VP1 segment. The first and second amplification rounds were conducted with Ranger Mix (Bioline) and Platinum SuperFI DNA Polymerase (Invitrogen), respectively. Inner primers AN89 and AN88 were, respectively, tagged with forward P5 and reverse P7 overhang Illumina adapters. Negative (RNase-free water) and positive (Coxsackievirus B3 isolate) controls were used throughout RNA extraction up to PCR detection. PCR products were resolved in 2% agarose gel through electrophoresis; bands of the expected size were excised and purified from the gel with PureLink Quick Gel Extraction

and PCR Purification Combo Kit (Invitrogen). Libraries were prepared and barcoded from each amplified product with Nextera XT Index Kits (Illumina), to be normalized and pooled by Macrogen Next-Generation Sequencing Service (South Korea) according to the 16S Metagenomic Sequencing Library Preparation Guide before loading them into a MiSeq lane to sequence 300 bp paired-end reads.

Bioinformatics

Quality Trimming, OTUs Definition, and OTUs Mapping

Raw Illumina reads were paired using VSEARCH 2.11 (Rognes et al. 2016)—*merge pairs* algorithm with a minimum overlap length of 50 bp. Quality filtering was also performed with VSEARCH and contigs shorter than 100 bp, and/or with homo-polymer tracks longer than 8 bp, and/or with a total expected error value higher than one ($E > 1$) were discarded. To save time in further analyses, a dereplication step was performed using VSEARCH—*derep_fulllength* algorithm on the filtered contigs to find unique sequences by clustering at 100% sequence identity. Singletons (cutoff = 1, i.e., sequences that appear only once in the sample) and chimeras (abskew = 2) were removed. Operational taxonomic units (OTUs) were defined using an identity criterion of 0.97 among unique sequences. Finally, centroid sequences for each OTU were mapped against a Human Enteroviruses-VP1 nucleotide sequence database (available upon request) by VSEARCH's—*usearch_global*—at 80% sequence identity. Type assignment, performed during the mapping process, was checked by submitting each OTU to the Enterovirus Genotyping Tool (Kroneman et al. 2011).

Nucleotide Similarity and Phylogenetic Analyses

Percentages of nucleotide similarity among all pairs of OTUs for each hEV type were calculated with BioEdit software v.7.2.5 (Hall 1999). Phylogenetic reconstructions were performed for selected hEV types. To determine phylogenetic relationship among strains of these types in Argentina, sequences from the Province of Córdoba (~700 km North West of Buenos Aires) obtained for a different study but uncharacterized in depth until now (Lizasoain et al. 2021) were also included in the phylogenetic analyses. OTUs centroid sequences and sequences reported in Lizasoain et al. (2021) were subject to BLAST searches against the GenBank database. All the hits with E-values lower than 1.0×10^{-5} and coverage percentages higher than 95%, and with available information of country and collection date, were downloaded and aligned in Muscle program (Edgar 2004), with OTUs and sequences from Córdoba. Maximum-likelihood

Table 1 Assembling, quality filters, dereplication, clusterization, and mapping process for reads obtained in MiSeq 300 bp Illumina sequencing of Human Enterovirus VP1-amplicons generated from sewage samples collected in Buenos Aires Metropolitan Area (Argentina) in 2011 and 2013

	Assembling		Filtering and dereplicating ^b					Clusterization		Mapping	
	PAIRED-END RAW READS	CONTIGS ^a	Q-FILTER	H-FILTER	DEREPLICATION	S-FILTER	CH-FILTER	OTUs ^c	Abundance	% of mapping	hEV types detected
Mar 2011	172,812	141,190	140,773	140,773	13,436	2,907	2,906	7	130,242	7	130,242 100
May 2011	164,384	137,301	136,229	136,225	15,992	3,852	3,848	7	124,076	6	124,069 99.99
Jul 2011	164,290	134,181	133,362	133,361	15,976	3,281	3,270	7	120,573	6	120,559 99.99
Sep 2011	172,137	114,634	114,240	114,240	9,342	2,950	2,950	7	107,848	2	70,166 65.06
Oct 2011	185,046	314	310	310	74	9	9	2	345	1	81 23.48
Nov 2011	159,847	140,173	139,016	139,006	13,611	2,586	2,586	1	127,981	1	127,981 100
Apr 2013	173,846	150,460	149,590	149,589	16,177	3,775	3,763	6	137,116	6	137,116 100
Jul 2013	162,617	134,012	133,053	133,052	14,553	3,633	3,632	7	122,128	4	118,144 96.74
Aug 2013	157,524	133,324	132,683	132,682	13,522	2,481	2,481	4	121,841	2	121,790 99.96
Sep 2013	165,590	138,069	137,447	137,444	11,347	2,417	2,416	4	128,511	2	128,485 99.98
TOTAL	1,678,093	1,223,658	1,216,703	1,216,682	123,830	27,891	27,861	52	1,120,661	37	1,078,633 96.25

Each value represents the number of sequences that passed each filter or were the result of each process from the initial value of raw paired-end reads

^aResulting from the merging of raw paired-end reads

^bContigs were filtered out if their lengths were <100 bp, the expected error number (E) was > 1 (Q-Filter), or if they contained homo-polymer tracks > 8 bp in length (H-Filter). Additionally, dereplicated contigs were filtered out when they appeared only once time in the sample (S-Filter) and/or were detected as chimeras (Ch-Filter)

^cOTUs Operational Taxonomic Units

phylogenetic trees were constructed with the PhyML 3.0 program (Guindon et al. 2010) under the optimal model of nucleotide substitution determined for each data set by the in-built Smart Model Selection (SMS) option (Lefort et al. 2017). Branch supports were calculated with the approximate likelihood-ratio test based on a Shimodaira–Hasegawa-like procedure (SH-aLRT) (Anisimova & Gascuel 2006). Obtained phylogenetic trees were visualized and edited with FigTree v1.4.2 and Inkscape v0.92. Resulting OTUs centroid sequences have been deposited in GenBank under accession numbers MW117000 to MW117035.

Results

Sequencing, hEV Type Detection, and Nucleotide Similarity

Sequencing yielded 1,678,093 raw paired-end reads for the ten analyzed samples (between 157,524 and 185,046 raw paired-end reads per sample, mean = 167,909), from which 1,223,685 contigs were assembled. The 8.4% of assembled contigs were filtered out through different steps. Of the remaining acceptable contigs, 96.5% mapped against the hEV database. Seventeen hEV types were detected in total (between 1 and 7 types detected per sample, mean = 3). Members of hEV-A (coxsackievirus A4, A5, and A16), hEV-B (coxsackievirus A9, B4, echovirus 1, 6, 9, 13, and enterovirus B74), and hEV-C (coxsackievirus A1, A13, A22, A24, enterovirus C99, C105, and C116) were detected. However, none of the reads mapped to hEV-D types (Table 1). There were evident changes in hEVs diversity in samples from 2011 and 2013, except for coxsackievirus A22 and A24, which had a similar relative abundance for both years. Enterovirus C99 was also present in both years' samples, although its abundance decreased from 33% in 2011 to < 1% in 2013 (Fig. 1). Nucleotide similarity values among OTUs were above 80% for most of the types, except for echovirus 1, which presented similarity values ranging from 72 to 75% (Fig. 2).

Phylogenetic Analyses of Different hEV Types

Since coxsackievirus B4 and echovirus 9 have previously been detected in Buenos Aires, associated with various diseases (Mistchenko et al. 2006), OTU centroid sequences of these types and their best BLAST hits were subjected to

phylogenetic analyses. Considering the low nucleotide similarity (~ 70%) among some echovirus 1 OTUs, we performed a specific phylogenetic characterization for this type. Since there were only 7 BLAST hits for echovirus 1, we conducted a GenBank database text string search using “echovirus 1” as query term and thus retrieved all the sequence hits for this type, with available information about country and collection date. After discarding sequences that did not correspond to the VP1 fragment of interest, 93 sequences (including the BLAST hits mentioned above) together with five echovirus 1 OTUs from this study were maintained for alignment. The General Time Reversible (GTR) model was the best-fitted model of nucleotide substitution for all the conducted phylogenetic analyses.

Coxsackievirus B4

The phylogenetic analysis for coxsackievirus B4 (Fig. 3) contained 312 sequences of global circulation variants reported between 1959 and 2019. This dataset included 10 variants detected in sewage samples collected in Córdoba in 2011 and 2017 (Lizasoain et al. 2021), 3 sequences reported in Buenos Aires during the study of neurological infection in children in 2002 and 2003 (Mistchenko et al. 2006), and the OTU sequence obtained by us in March 2011. Coxsackievirus B4 variants from Argentina segregated into four different clusters (I–IV). Viruses with sequences from Cluster I (SH-aLRT = 0.91) circulated in Buenos Aires at the beginning of the XXI century, while Cluster II (SH-aLRT = 0.80) grouped variants from 2011, from both Córdoba and Buenos Aires together with French (AM711064 and AM711078) and Danish (JX009052) variants reported in 2006 and 2008, respectively. Cluster III (SH-aLRT = 0.89) circulated in Córdoba city in 2011 and 2017, and was highly related to Dutch (KU560994) and American (MN896921) variants reported in 2011 and 2019, respectively. Cluster IV (SH-aLRT = 0.74) exclusively circulated in Córdoba in 2017, and was closely related to the Brazilian strains (MN418895 and MN418896) reported the same year (SH-aLRT = 0.78).

Echovirus 9

The phylogenetic reconstruction for echovirus 9 (Fig. 4) was performed with 236 global circulation sequences reported between 1979 and 2018, including 19 variants from Argentina [10 reported by Mistchenko et al. (2006), 8 obtained

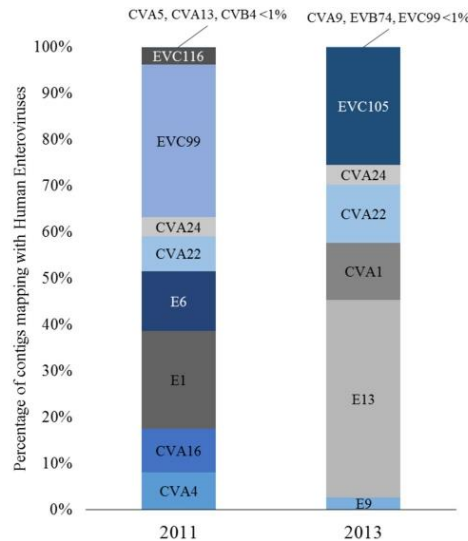


Fig. 1 Relative abundance of contigs mapped to different Human Enterovirus types in sewage samples collected in 2011 and 2013 in Buenos Aires Metropolitan Area (Argentina). Human Enterovirus types represented by less than 1% of contigs are shown at the top of each bar graph. CVA coxsackievirus type A, CVB coxsackievirus type B, E echovirus, EVB enterovirus B type, EVC enterovirus C type

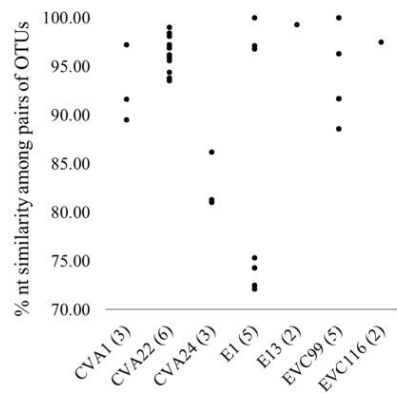


Fig. 2 Percentages of nucleotide similarity among pair of Operational Taxonomic Units (OTUs) for Human Enterovirus types detected in sewage samples from Buenos Aires Metropolitan Area (Argentina). Numbers in parentheses in the x-axis indicate the amount of OTUs for each type. Only types represented by at least two OTUs were taken into account. CVA coxsackievirus type A, E echovirus, EVC enterovirus type C

from Córdoba city sewage samples in 2011, 2012 and 2017 (Lizasoain et al. 2021), and our April 2013 OTU sequence]. The phylogenetic inference suggests at least three introductions of echovirus 9 with local dispersion in Argentina (clusters I, II, and III). Cluster I (SH-aLRT=0.90) grouped variants that circulated in Córdoba in 2011–2012, while cluster II (SH-aLRT=0.97) grouped variants from 2002 and 2003 reported in Buenos Aires (Mistchenko et al. 2006). Cluster III (SH-aLRT=0.79) included 2 variants from samples taken in 2011 and 2012 in Córdoba, and our OTU sequence (2013 April, Buenos Aires), together with a variant from Uruguay reported in 2013 (MF093681). The results suggest different introductions of echovirus 9 without evidence of local dispersion: two variants from Buenos Aires detected in 2002 (DQ246756 and DQ246757) and two variants from 2017 reported in Córdoba. Interestingly, cluster I and II, and the introductions of 2017 share a node (SH-aLRT=0.99) with variants reported in Brazil in 2003 (KF182324–KF182327).

Echovirus 1

In total, 98 sequences of globally disseminated variants, belonging to echovirus 1 (Fig. 5) that circulated between 1951 and 2016 (including five OTUs from this study, detected in March and June 2011), segregated along two major branches (SH-aLRT=1.0). Echovirus 1 variants obtained in this study segregated into two highly supported (SH-aLRT=1.0) monophyletic sub-groups (cluster I and II) along each branch.

Discussion

A previous environmental study conducted in Buenos Aires reported the circulation of echovirus 6, 7, 11, 19, Coxsackievirus B1, B3, B5, and poliovirus Sabin 2 and 3 in sewage samples collected in 2005 and 2006 (Cisterna et al. 2008, unpublished). Our retrospective environmental study confirms the presence of echovirus 6 in sewage samples and incorporates knowledge about the circulation of 16 additional hEV types, among which only coxsackievirus B4, echovirus 9, and echovirus 13 had been previously reported from different clinical cases in Buenos Aires (Cisterna et al. 2007; Mistchenko et al. 2006). Both studies complement the knowledge about hEV diversity generated from medical diagnosis of diseases affecting central nervous system (Supplementary Material 1).

These results reveal a highly dynamic circulation of hEV in Buenos Aires with the emergence and decline of different hEV types in samples collected only two years apart. Nucleotide sequences were available in GenBank only for coxsackievirus B4 and echovirus 9; therefore, phylogenetic analyses could only be made for these 2 out of the 3 types



Fig. 3 Maximum-likelihood phylogenetic tree of coxsackievirus B4 strains. The tree was inferred with an alignment of 312 sequences of a partial VP1 coding segment (323 nucleotides in length). The OTU sequence of this study appears in blue, and sequences reported previously in Argentina appear in red. Red lines indicate clusters of variants from Argentina. GenBank accession number, country code (according to ISO-3166-1 alpha-2 standard), and year of detection identify strains reported elsewhere. SH-aLRT values are shown at branches of interest. The bar at the bottom-left side denotes genetic distance. The tree was midpoint rooting. Some branches were collapsed for a better visualization. Supplementary Material 2 shows a detailed view of this tree

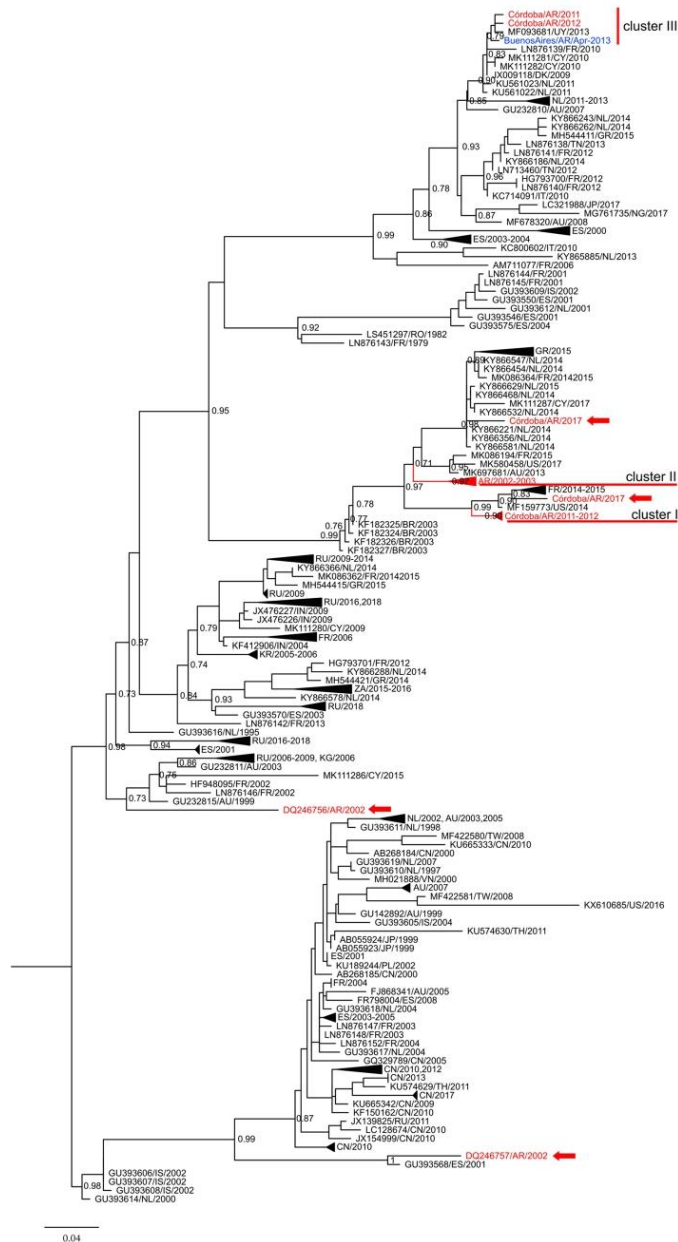
circulating in Buenos Aires. Our analyses evidenced several introductions of different variants of coxsackievirus B4 and echovirus 9 in Argentina during the last 20 years, some of them with wide dissemination being detected in distant Provinces (cluster II for coxsackievirus B4, and cluster III for echovirus 9). Interestingly, the conformation of clusters of highly related variants from Argentina and other South American countries (Brazil and Uruguay) for both echovirus 9 (cluster I, II, and III) and coxsackievirus B4 (cluster IV) suggests patterns of regional dissemination beyond local reports of variants.

We found a high rate of nucleotide differences (up to 30%) in some of the echovirus 1 OTU sequences. Echovirus 1 has been linked to AFP cases (Rao et al. 2012; Fernández-García et al. 2017), diarrhea, meningitis, and pleurodynia (dos Santos et al. 2006; Leendertse et al. 2013; Rao et al. 2013). However, there are few reports of echovirus 1 circulation in South America. One study reported echovirus 1 in samples taken from healthy children in the Amazonian region of Brazil (Coutinho et al. 2020), and a second report linked the virus with a case of meningitis in Rio de Janeiro in 2002 (dos Santos et al. 2006). The echovirus 1 circulating strains in our study correspond to at least two separate introductions from distant lineages that correlate with the segregation of Farouk and Bryson prototype strains (Fig. 5), initially considered different serotypes (Ohman et al. 2001).

Interestingly, our study accomplished (up to the best of our knowledge) the first detection of some non-polio hEV-C types in Buenos Aires (coxsackievirus A1, A13, A22, A24, enterovirus C99, C105, C116). The relevance of hEV-C types detected in environmental samples is hard to interpret since previous studies had not found a correlation between their presence in the environment and the epidemiology of diseases in populations near the sampling point (Brinkman et al. 2017; Harvala et al. 2014). Nevertheless, these types have also been signaled as the cause of AFP and other severe diseases (Adeniji et al. 2017; Chaves et al. 2001; Horner et al. 2015; Tapparel et al. 2013; Zou et al. 2017). Furthermore, some hEV-C types represent public health threats due to their potential recombination with poliovirus Sabin strains (live attenuated vaccine) favoring the emergence of Vaccine-Derived Poliovirus (VDPV) with potential implication in AFP outbreaks (Jegouic et al. 2009; Sadeuh-Mba et al. 2019).

It has been suggested that once poliovirus has been eradicated and the population lacks poliovirus neutralizing antibodies, contemporary coxsackieviruses of hEV-C species (highly related to poliovirus types) could be implicated in the emergence (by mutation) of novel poliovirus-like agents (Jiang et al. 2007). Overall, it is well known that a single virus type causing mild symptoms or with low prevalence in the past can emerge associated with severe diseases, and spread causing large epidemics (Bessaud & Delpeyroux, 2020). Therefore, robust surveillance systems are needed for monitoring the role of these genetically poliovirus-related types in AFP cases, mainly because they seem to commonly circulate among the population. Surveillance and the study of all hEVs types among communities should be a priority to anticipate and trace the behavior of such public health threats. Our results extend the knowledge about hEVs in Buenos Aires, and exhort public health bodies to perform more active surveillance to characterize the presence of this complex and numerous group of viruses.

Fig. 4 Maximum-likelihood phylogenetic tree of echovirus 9 strains. The tree was inferred with an alignment of 236 sequences of a partial VP1 coding segment (323 nucleotides in length). The OTU sequence of this study appears in blue, and sequences reported previously in Argentina appear in red. Red lines indicate clusters of variants from Argentina and red arrows indicate introductions in Argentina without local dispersion. GenBank accession number, country code (according to ISO-3166-1 alpha-2 standard), and year of detection identify strains reported elsewhere. SH-aLRT values are shown at branches of interest. The bar at the bottom-left side denotes genetic distance. The tree was midpoint rooting. Some branches were collapsed for a better visualization. Supplementary Material 3 shows a detailed view of these three



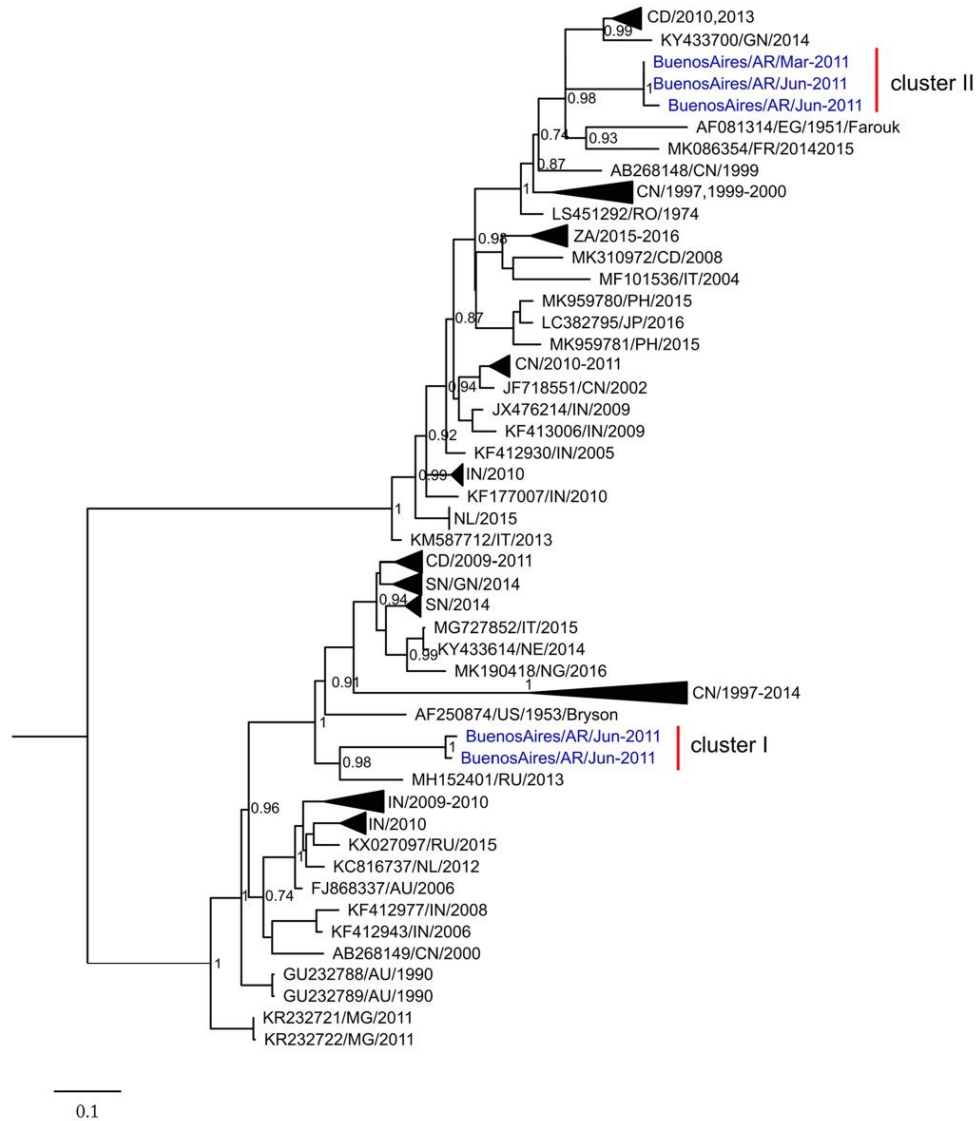


Fig. 5 Maximum-likelihood phylogenetic tree of echovirus 1 strains. The tree was constructed with 98 sequences of a partial VP1 coding segment (320 nucleotides in length). OTU sequences of this study appear in blue. Red lines indicate clusters of variants from Argentina. GenBank accession number, country code (according to ISO-3166-1

alpha-2 standard), and year of detection identify strains reported elsewhere. SH-aLRT values are shown at branches of interest. The bar at the bottom-left side denotes genetic distance. The tree was midpoint rooting. Some branches were collapsed for a better visualization. Supplementary Material 4 shows a detailed view of this three

Supplementary Information The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1007/s12560-021-09468-y>.

Funding This study was supported by Programa Polos de Desarrollo Universitario, from the Comisión Coordinadora del Interior, Universidad de la República, Uruguay. Andrés Lizasoain received a PhD scholarship from the Comisión Académica de Posgrados, Universidad de la República, Uruguay.

Data Availability Not applicable.

Code Availability Not applicable.

Declarations

Conflict of interest Nothing to disclose.

Ethical Approval Not applicable.

Consent to Participate Not applicable.

Consent for Publication Not applicable.

References

- Adeniji, J. A., Oragwa, A. O., George, U. E., Ibok, U. I., Faleye, T., & Adewumi, M. O. (2017). Preponderance of enterovirus C in RD-L20B-cell-culture-negative stool samples from children diagnosed with acute flaccid paralysis in Nigeria. *Archives of virology*. <https://doi.org/10.1007/s00705-017-3466-2>
- Anisimova, M., & Gascuel, O. (2006). Approximate likelihood-ratio test for branches: A fast, accurate, and powerful alternative. *Systematic biology*. <https://doi.org/10.1080/10635150600755453>
- Battistone, A., Buttinelli, G., Fiore, S., Amato, C., Bonomo, P., Patti, A. M., Vulcano, A., Barbi, M., Binda, S., Pellegrinelli, L., Tanzi, M. L., Affanni, P., Castiglia, P., Germinario, C., Mercurio, P., Cicala, A., Triassi, M., Pennino, F., & Fiore, L. (2014). Sporadic isolation of sabin-like polioviruses and high-level detection of non-polio enteroviruses during sewage surveillance in seven Italian cities, after several years of inactivated poliovirus vaccination. *Applied and environmental microbiology*. <https://doi.org/10.1128/AEM.00108-14>
- Benschop, K., van der Avoort, H. G., Jusic, E., Vennema, H., van Binnendijk, R., & Duizer, E. (2017). Polio and Measles Down the Drain: Environmental Enterovirus Surveillance in the Netherlands, 2005 to 2015. *Applied and environmental microbiology*. <https://doi.org/10.1128/AEM.00558-17>
- Bessaud, M., & Delpeyroux, F. (2020). Enteroviruses-the famous unknowns. *The Lancet. Infectious diseases*. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(19\)30636-X](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(19)30636-X)
- Brinkman, N. E., Fout, G. S., & Keely, S. P. (2017). Retrospective Surveillance of Wastewater To Examine Seasonal Dynamics of Enterovirus Infections. *mSphere*. <https://doi.org/10.1128/mSphere.00099-17>
- Carballo, C. M., Erro, M. G., Sordelli, N., Vazquez, G., Mistchenko, A. S., Cejas, C., Rodriguez, M., Cisterna, D. M., Freire, M. C., Contrini, M. M., & Lopez, E. L. (2019). Acute Flaccid Myelitis Associated with Enterovirus D68 in Children, Argentina, 2016. *Emerging infectious diseases*. <https://doi.org/10.3201/eid2503.170897>
- Chaves, S. S., Lobo, S., Kennett, M., & Black, J. (2001). Coxsackie virus A24 infection presenting as acute flaccid paralysis. *Lancet (London, England)*. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(00\)04066-6](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(00)04066-6)
- Cisterna, D., Lema, C., Riviello Lopez, G., Freyre, L., Martinez, L., Torres, C., Mbayed, V., & Freire, M. C. (2008). Detección y caracterización de Enterovirus y Hepatitis A en el Riachuelo y Río de la Plata. IX Congreso Argentino de Virología. *Revista Argentina de Microbiología*, Supl. 1. (Unpublished).
- Cisterna, D. M., Palacios, G., Rivero, K., Girard, D., Lema, C., & Freire, M. C. (2007). Epidemiología de los enterovirus asociados a enfermedades neurológicas [Epidemiology of enterovirus associated with neurologic diseases]. *Medicina*, 67(2), 113–119.
- Coutinho, C., Siqueira, J., Machado, R. S., Bandeira, R., Ferreira, J. L., Alves, J., Gabbay, Y. B., & Tavares, F. N. (2020). Enterovirus detection and serotyping of fecal material collected from three children living on the outskirts of Belém city, Amazon region, Brazil, during the first 3 years of life (1983–1986). *Journal of medical virology*. <https://doi.org/10.1002/jmv.25656>
- Dos Santos, G. P., Skrab, 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. *Journal of medical virology*. <https://doi.org/10.1002/jmv.20509>
- Edgar, R. C. (2004). MUSCLE: a multiple sequence alignment method with reduced time and space complexity. *BMC Bioinformatics*. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-5-113>
- Fernandez-Garcia, M. D., Kebe, O., Fall, A. D., & Ndiaye, K. (2017). Identification and molecular characterization of non-polio enteroviruses from children with acute flaccid paralysis in West Africa, 2013–2014. *Scientific reports*. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-03835-1>
- Guindon, S., Dufayard, J. F., Lefort, V., Anisimova, M., Hordijk, W., & Gascuel, O. (2010). New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: assessing the performance of PhyML 3.0. *Systematic biology*. <https://doi.org/10.1093/sysbio/syq010>
- Hall, T. A. (1999). BioEdit: A User-Friendly Biological Sequence Alignment Editor and Analysis Program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, 41, 95–98.
- Harvala, H., Calvert, J., Van Nguyen, D., Clasper, L., Gadsby, N., Molyneux, P., Templeton, K., McWilliams Leitch, C., & Simmonds, P. (2014). Comparison of diagnostic clinical samples and environmental sampling for enterovirus and parechovirus surveillance in Scotland, 2010 to 2012. *Euro surveillance: bulletin European sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin*. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.es2014.19.15.20772>
- Horner, L. M., Poulter, M. D., Brenton, J. N., & Turner, R. B. (2015). Acute Flaccid Paralysis Associated with Novel Enterovirus C105. *Emerging infectious diseases*. <https://doi.org/10.3201/eid2110.150759>
- Hyypä, T., Hovi, T., Knowles, N. J., & Stanway, G. (1997). Classification of enteroviruses based on molecular and biological properties. *The Journal of general virology*. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-78-1-1>
- Jegouic, S., Joffret, M. L., Blanchard, C., Riquet, F. B., Perret, C., Pelletier, I., Colbere-Garapin, F., Rakoto-Andrianarivelo, M., & Delpeyroux, F. (2009). Recombination between polioviruses and co-circulating Coxsackie A viruses: role in the emergence of pathogenic vaccine-derived polioviruses. *PLoS Pathogens*. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000412>
- Jiang, P., Faase, J. A., Toyoda, H., Paul, A., Wimmer, E., & Gorbelenya, A. E. (2007). Evidence for emergence of diverse polioviruses from C-cluster coxsackie A viruses and implications for

- global poliovirus eradication. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. <https://doi.org/10.1073/pnas.0700451104>
- Kroneman, A., Vennema, H., Deforche, K., & v d Avoort, H., Peñaranda, S., Oberste, M. S., Vinjé, J., & Koopmans, M. (2011). An automated genotyping tool for enteroviruses and noroviruses. *Journal of clinical virology: the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology*. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2011.03.006>
- Leendertse, M., van Vugt, M., Benschop, K. S., van Dijk, K., Minnaar, R. P., van Eijk, H. W., Hodiamont, C. J., & Wolthers, K. C. (2013). Pleurodynia caused by an echovirus 1 brought back from the tropics. *Journal of clinical virology: the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology*. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2013.06.039>
- Lefort, V., Longueville, J. E., & Gascuel, O. (2017). SMS: Smart Model Selection in PhyML. *Molecular biology and evolution*. <https://doi.org/10.1093/molbev/msx149>
- Lema, C., Torres, C., Van der Sanden, S., Cisterna, D., Freire, M. C., & Gómez, R. M. (2019). Global phylogenetics of Echovirus 30 revealed differential behavior among viral lineages. *Virology*. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2019.02.012>
- Lizasoain, A., Mir, D., Masachessi, G., Fariás, A., Rodríguez-Osorio, N., Victoria, M., Nates, S., & Colina, R. (2021). Environmental Surveillance through Next-Generation Sequencing to Unveil the Diversity of Human Enteroviruses beyond the Reported Clinical Cases. *Viruses*. <https://doi.org/10.3390/v13010120>
- Mach, O., Verma, H., Khandait, D. W., Sutter, R. W., O'Connor, P. M., Pallansch, M. A., Cochi, S. L., Linkins, R. W., Chu, S. Y., Wolff, C., & Jafari, H. S. (2014). Prevalence of asymptomatic poliovirus infection in older children and adults in northern India: analysis of contact and enhanced community surveillance, 2009. *The Journal of infectious diseases*. <https://doi.org/10.1093/infdis/jit234>
- Majumdar, M., & Martin, J. (2018). Detection by Direct Next Generation Sequencing Analysis of Emerging Enterovirus D68 and C109 Strains in an Environmental Sample From Scotland. *Frontiers in microbiology*. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01956>
- Mistchenko, A. S., Viegas, M., Latta, M. P., & Barrero, P. R. (2006). Molecular and epidemiologic analysis of enterovirus B neurological infection in Argentine children. *Journal of clinical virology: the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology*. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2006.08.009>
- 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. *Journal of clinical microbiology*. <https://doi.org/10.1128/JCM.00542-06>
- Oberste, M. S., Maher, K., Kilpatrick, D. R., & Pallansch, M. A. (1999). Molecular evolution of the human enteroviruses: correlation of serotype with VP1 sequence and application to picornavirus classification. *Journal of virology*. <https://doi.org/10.1128/JVI.73.3.1941-1948.1999>
- Ohman, T., King, S. L., Krithivas, A., Cunningham, J., Dickeson, S. K., Santoro, S. A., & Bergelson, J. M. (2001). Echoviruses 1 and 8 are closely related genetically, and bind to similar determinants within the VLA-2 I domain. *Virus Research*. [https://doi.org/10.1016/S0168-1702\(01\)00226-X](https://doi.org/10.1016/S0168-1702(01)00226-X)
- 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. *Journal of virology*. <https://doi.org/10.1128/jvi.76.10.4940-4949.2002>
- Pallansch, M. A., Oberste, M. S., & Whitton, J. L., et al. (2013). Enteroviruses: Polioviruses, Coxsackieviruses, Echoviruses and Newer Enteroviruses. In D. M. Knipe & P. M. Howley (Eds.), *Fields virology* (pp. 490–530). Lippincott Williams & Wilkins.
- Pina, S., Jofre, J., Emerson, S. U., Purcell, R. H., & Girones, R. (1998). Characterization of a strain of infectious hepatitis E virus isolated from sewage in an area where hepatitis E is not endemic. *Applied and environmental microbiology*. <https://doi.org/10.1128/AEM.64.11.4485-4488.1998>
- Rao, C. D., Yergolkar, P., & Shankarappa, K. S. (2012). Antigenic diversity of enteroviruses associated with nonpolio acute flaccid paralysis, India, 2007–2009. *Emerging infectious diseases*. <https://doi.org/10.3201/eid1811.111457>
- Rao, D. C., Ananda Babu, M., Raghavendra, A., Dhananjaya, D., Kumar, S., & Maiya, P. P. (2013). Non-polio enteroviruses and their association with acute diarrhea in children in India. *Infection, genetics and evolution: journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases*. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2013.04.011>
- Rognes, T., Flouri, T., Nichols, B., Quince, C., & Mahé, F. (2016). VSEARCH: a versatile open source tool for metagenomics. *PeerJ*. <https://doi.org/10.7717/peerj.2584>
- Ruggieri, V., Paz, M. I., Peretti, M. G., 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. *European journal of paediatric neurology: EJPN: official journal of the European Paediatric Neurology Society*. <https://doi.org/10.1016/j.ejpn.2017.07.008>
- Sadeuh-Mba, S. A., Kavunga-Membo, H., Joffret, M. L., Yogoletto, R., Endegue-Zanga, M. C., Bessaud, M., Njouou, R., Muyembe-Tamfu, J. J., & Delpeyroux, F. (2019). Genetic landscape and macro-evolution of co-circulating Coxsackieviruses A and Vaccine-derived Polioviruses in the Democratic Republic of Congo, 2008–2013. *PLoS Neglected Tropical Diseases*. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007335>
- Sapia, E. Y., Maroni, C., Groisman, C., Kromer, H., Lihue Rojo, G., Dastugue, M., & Valinotto, L. (2020). Genotipificación del virus de la enfermedad mano-pie-boca atípica en un hospital pediátrico de la Ciudad de Buenos Aires, Argentina [Atypical hand-foot-mouth disease virus genotyping in a pediatric hospital in Buenos Aires city, Argentina]. *Archivos argentinos de pediatría*. <https://doi.org/10.5546/aap.2020.e199>
- Tapparel, C., Siegrist, F., Petty, T. J., & Kaiser, L. (2013). Picornavirus and enterovirus diversity with associated human diseases. *Infection, genetics and evolution: journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases*. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2012.10.016>
- van der Linden, L., Wolthers, K. C., & van Kuppeveld, F. J. (2015). Replication and Inhibitors of Enteroviruses and Parechoviruses. *Viruses*. <https://doi.org/10.3390/v7082832>
- Zell, R., Delwart, E., Gorbalenya, A. E., Hovi, T., King, A., Knowles, N. J., Lindberg, A. M., Pallansch, M. A., Palmenberg, A. C., Reuter, G., Simmonds, P., Skern, T., Stanway, G., Yamashita, T., & Ictv Report Consortium. (2017). ICTV Virus Taxonomy Profile: Picornaviridae. *The Journal of general virology*. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.000911>
- Zou, L., Yi, L., Song, Y., Zhang, X., Liang, L., Ni, H., Ke, C., Wu, J., & Lu, J. (2017). A cluster of coxsackievirus A21 associated acute respiratory illness: the evidence of efficient transmission of CVA21. *Archives of virology*. <https://doi.org/10.1007/s00705-016-3201-4>

Publisher's Note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

5.1.4.

Artículo 4: “First evidence of enterovirus A71 and echovirus 30 in Uruguay and genetic relationship with strains circulating in the South American region” **Año 2021**

Revista: Plos One

En este trabajo, se estudiaron muestras de agua residual colectadas en 4 ciudades del litoral noroeste de Uruguay (Bella Unión, Salto, Paysandú y Fray Bentos). Estas muestras fueron colectadas en dos periodos con un intervalo de 5 años: el primer muestreo se realizó entre marzo de 2011 y febrero de 2012 y el segundo muestreo se realizó entre marzo de 2017 y febrero de 2018. Cada mes está representado por una única muestra en cada ciudad. Sin embargo, en el periodo 2017-2018 no se realizó colecta en la ciudad de Paysandú. En total fueron estudiadas 84 muestras. Cada muestra (100 ml) fue concentrada hacia 1 ml mediante un método de adsorción-elución a una membrana cargada negativamente, y se procedió a la detección, secuenciación, y procesamiento bioinformático de *reads* tal como se describió en los dos artículos previos (ANEXO 2).

Se detectó la presencia de enterovirus en 50 de las 84 muestras, en las cuales fueron identificados 9 tipos de la especie A (CVA2-CVA6, CVA10, CVA16, EV-A71, EV-A90), 12 tipos de la especie B (CVA9, CVB1-CVB5, E1, E6, E11, E14, E21, E30) y 6 tipos de la especie C (CVA1, CVA13, CVA19, CVA22, CVA24, EV-C99).

Del total de tipos detectados, únicamente cinco de estos se detectaron en ambos periodos de muestreo: CVA9, CVA10, CVA24, E6, y EV-A71.

Se detectaron OTUs que mostraron elevados porcentajes (24,3% a 28%) de diferencias nucleotídicas con respecto a otras OTUs para los serotipos CVA13, CVA9, EV-C99, CVA10, CVA24 y CVB5 (en orden ascendente), lo cual implicaría en algunos casos la co-circulación temporal de linajes genéticamente distantes, ya que algunos de estos serotipos circularon exclusivamente en uno de los dos períodos de muestreo (CVA13, EV-C99 y CVB5).

Se procedió a caracterizar filogenéticamente las OTUs de EV-A71 y de E30 detectadas durante este estudio, junto a las variantes de estos serotipos que fueran detectadas por nosotros a partir del estudio de muestras de aguas residuales de Córdoba.

Los análisis filogenéticos constataron la circulación del subgenogrupo C2 de EV-A71 tanto en Uruguay como en Argentina, desde hace al menos 10 años, así como también la introducción reciente en Argentina de la variante emergente C1-*like*. A su vez, confirmamos la circulación de los genotipos E y F de E30 en Argentina, reportando únicamente la presencia del genotipo E en nuestro país.

Hasta donde nuestro conocimiento nos permite afirmar, estos resultados constituyen la primera evidencia de circulación de la variante emergente de EV-A71 C1-*like* en la región de Sudamérica.

El ANEXO 3 muestra los resultados de la *next-generation sequencing*, del filtrado de *reads* y del proceso de mapeo, para las muestras de Salto, Bella Unión, Paysandú y Fray Bentos.

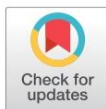
RESEARCH ARTICLE

First evidence of enterovirus A71 and echovirus 30 in Uruguay and genetic relationship with strains circulating in the South American region

Andrés Lizasoain^{1*}, Daiana Mir², Matías Salvo¹, Viviana Bortagaray¹, Gisela Masachessi³, Adrián Fariás³, Nélida Rodríguez-Osorio², Silvia Nates³, Matías Victoria¹, Rodney Colina^{1*}

1 Laboratorio de Virología Molecular, Departamento de Ciencias Biológicas, Centro Universitario Regional Litoral Norte, Universidad de la República, Salto, Uruguay, **2** Unidad de Genómica y Bioinformática, Departamento de Ciencias Biológicas, Centro Universitario Regional Litoral Norte, Universidad de la República, Salto, Uruguay, **3** Laboratorio de Gastroenteritis Virales y Sarampión, Instituto de Virología Dr. J. M. Vanella, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Córdoba, Córdoba, Argentina

* andres.lizasoain.cuelho@gmail.com (AL); rodneycolina1@gmail.com (RC)



OPEN ACCESS

Citation: Lizasoain A, Mir D, Salvo M, Bortagaray V, Masachessi G, Fariás A, et al. (2021) First evidence of enterovirus A71 and echovirus 30 in Uruguay and genetic relationship with strains circulating in the South American region. PLoS ONE 16(8): e0255846. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0255846>

Editor: Ahmed S. Abdel-Moneim, Taif University, SAUDI ARABIA

Received: April 12, 2021

Accepted: July 24, 2021

Published: August 12, 2021

Copyright: © 2021 Lizasoain et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: Raw FASTQ files are available from NCBI's Sequence Read Archive repository under BioProject number PRJNA689577. Supporting Files are available from <https://doi.org/10.6084/m9.figshare.14331215.v2>. The Customized Human Enterovirus Database (CHED v1.0) is available from: <https://doi.org/10.6084/m9.figshare.14854437.v1>. Nucleotide sequences of Enterovirus A71 and Echovirus 30 reported by us and employed in phylogenetic analyses in this study were deposited in GenBank

Abstract

Human enteroviruses (EVs) comprise more than 100 types of coxsackievirus, echovirus, poliovirus and numbered enteroviruses, which are mainly transmitted by the faecal-oral route leading to diverse diseases such as aseptic meningitis, encephalitis, and acute flaccid paralysis, among others. Since enteroviruses are excreted in faeces, wastewater-based epidemiology approaches are useful to describe EV diversity in a community. In Uruguay, knowledge about enteroviruses is extremely limited. This study assessed the diversity of enteroviruses through Illumina next-generation sequencing of VP1-amplicons obtained by RT-PCR directly applied to viral concentrates of 84 wastewater samples collected in Uruguay during 2011–2012 and 2017–2018. Fifty out of the 84 samples were positive for enteroviruses. There were detected 27 different types belonging to *Enterovirus A* species (CVA2-A6, A10, A16, EV-A71, A90), *Enterovirus B* species (CVA9, B1-B5, E1, E6, E11, E14, E21, E30) and *Enterovirus C* species (CVA1, A13, A19, A22, A24, EV-C99). Enterovirus A71 (EV-A71) and echovirus 30 (E30) strains were studied more in depth through phylogenetic analysis, together with some strains previously detected by us in Argentina. Results unveiled that EV-A71 sub-genogroup C2 circulates in both countries at least since 2011–2012, and that the C1-like emerging variant recently entered in Argentina. We also confirmed the circulation of echovirus 30 genotypes E and F in Argentina, and reported the detection of genotype E in Uruguay. To the best of our knowledge this is the first report of the EV-A71 C1-like emerging variant in South-America, and the first report of EV-A71 and E30 in Uruguay.

under the accession numbers: MW196697-MW196709, MW196713-MW196729 and MW196735-MW196737 (Argentine strains) and MW196710-MW196712, MW196730-MW196732 and MW196734 (Uruguayan strains).

Funding: This study was funded by Programa Polos de Desarrollo Universitario from Comisión Coordinadora del Interior of the Universidad de la República, Uruguay, grant PDU2010. Authors received financial support from Sistema Nacional de Investigadores (SNI) of Agencia Nacional de Investigación e Innovación (ANII), Uruguay, and from Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Argentina. A.L. received a PhD scholarship in 2016–2019 from Comisión Académica de Posgrado (CAP) and Programa de Desarrollo de las Ciencias Básicas (PEDECIBA) of Universidad de la República, Uruguay. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing interests: The authors have declared that no competing interests exist.

Introduction

Human enteroviruses (EVs) are ubiquitous viruses mainly transmitted among all age groups in a community by the faecal-oral route [1]. They are associated with a large number of clinical conditions, ranging from nonspecific symptoms as fever and malaise, mild conditions as herpangina, gastroenteritis or hand-foot-and-mouth disease (HFMD), up to severe diseases as aseptic meningitis (AM), encephalitis, pancreatitis, myocarditis, or acute flaccid paralysis (AFP), among others [2].

EVs include around 100 types of coxsackievirus, echovirus, poliovirus and numbered enteroviruses, which are genetically classified inside four viral species (*Enterovirus A* to *Enterovirus D*) in the genus *Enterovirus* from the family *Picornaviridae*. *Enterovirus A* species includes several coxsackievirus type A (CVA2-A8, A10, A12, A14-A16) and numbered enterovirus A71, A76, A89-A91, A114, A119-A121. *Enterovirus B* species includes all the coxsackievirus B types (B1-B6), all the echovirus types (E1-E7, E9, E11-E21, E24-E27, E29-E33), a coxsackievirus A9 type, and several numbered enteroviruses (EV-B69, EV-B73-B75, EV-B77-B88, EV-B93, EV-B97, EV-B98, EV-B100, EV-B101, EV-B106, EV-B107, and EV-B111). *Enterovirus C* species includes the three poliovirus types (PV1-PV3), several coxsackievirus A types (CVA1, A11, A13, A17, A19-A22, A24), and numbered enterovirus C95, C96, C99, C102, C104, C105, C109, C113, and C116-C118. *Enterovirus D* species includes a few numbered enteroviruses named D68, D70, D94, and D111 [3].

The epidemiology of EVs is a dynamic phenomenon that deserves continuous surveillance since novel EV types are frequently discovered, and types originally associated with a specific disease, could emerge associated with novel conditions [4–9]. During the last decades, poliovirus has been a priority for public health surveillance systems worldwide due to its high incidence in AFP cases [10]. In the poliovirus eradication era, other non-polio EVs are being studied for their role as emerging pathogens associated with AFP, or as causing agents of central nervous system (CNS) disease outbreaks [10–13]. Human enterovirus A71 (EV-A71) has been historically associated with HFMD, including severe forms of the disease, and also is strongly associated with severe and sometimes fatal CNS infections. Therefore, EV-A71 is currently considered as an emerging EV with serious consequences for human health. Several molecular epidemiology and vaccine development efforts are on the way for its containment and management. In fact, since 2015–2016 there are three inactivated, whole-virus EV-A71 vaccines licensed by China National Medical Products Administration (NMPA), which are currently commercially available. The vaccines were formulated with the most prevalent EV-A71 lineage in China as virus seed (C4 lineage), and elicited cross-protection against prominent epidemic lineages reported worldwide over the past decade [14–16].

On the other hand, echovirus 30 (E30), an *Enterovirus B* species member, is frequently associated with neurological symptoms, mainly AM [17, 18]. Its presence among a population seems to be cyclic, characterised by repeated epidemics -frequently over large geographic areas- every 3 to 5 years [19, 20].

Wastewater samples contain a high concentration of EVs particles as a result of their excretion in human faeces during the infection by distinct types. Wastewater Based Epidemiology (WBE) approaches are useful for describing the molecular diversity of EVs either as a complement of clinical surveillance, or as a tool to obtain information regarding enteroviruses when clinical surveillance is not done in a community. WBE has displayed a valuable role both in developed and developing areas of the world, increasing our knowledge about circulation of many enteroviruses, including emerging variants of public health concern [21–23].

Most infections by EVs are asymptomatic, which could lead to a silent circulation of many types in a community until the occurrence of outbreaks of diverse diseases [24–26]. Therefore,

the possibility of detecting emerging types in wastewater, before the appearance of clinical cases, makes WBE of EVs, a fundamental tool for epidemiological surveillance.

South America is often described as a region with scarce available genetic information regarding EVs [20, 27]. Particularly in Uruguay, knowledge about molecular diversity of circulating EVs is limited [28]. To assess the diversity of circulating EVs types in the Uruguayan population, we performed an amplicon-deep sequencing approach of Uruguayan wastewater samples collected in two different sampling periods in four cities (Bella Unión, Salto, Paysandú, and Fray Bentos). Additionally, as part of a project to characterize the diversity of EVs in the South American region, two EV types detected in this project (EV-A71 and E30) were subjected to phylogenetic analysis along with sequences of strains previously detected in wastewater from Córdoba, Argentina [29], to evaluate viral dynamics within a regional context and to identify viral introductions and country-specific transmission clusters.

Materials and methods

Wastewater specimens

This work was based on the study of two sets of wastewater specimens collected during different periods in cities from the North-western region of Uruguay (Fig 1). SET_1 comprises specimens (100 ml each) collected monthly between March 2011 and February 2012 in four Uruguayan cities: Bella Unión (30°15'59.55"S, 57°36'4.79"W), Salto (31°23'18.82"S, 57°58'35.09"W), Paysandú (32°19'38.38"S, 58°6'3.83"W) and Fray Bentos (33°7'8.95"S, 58°

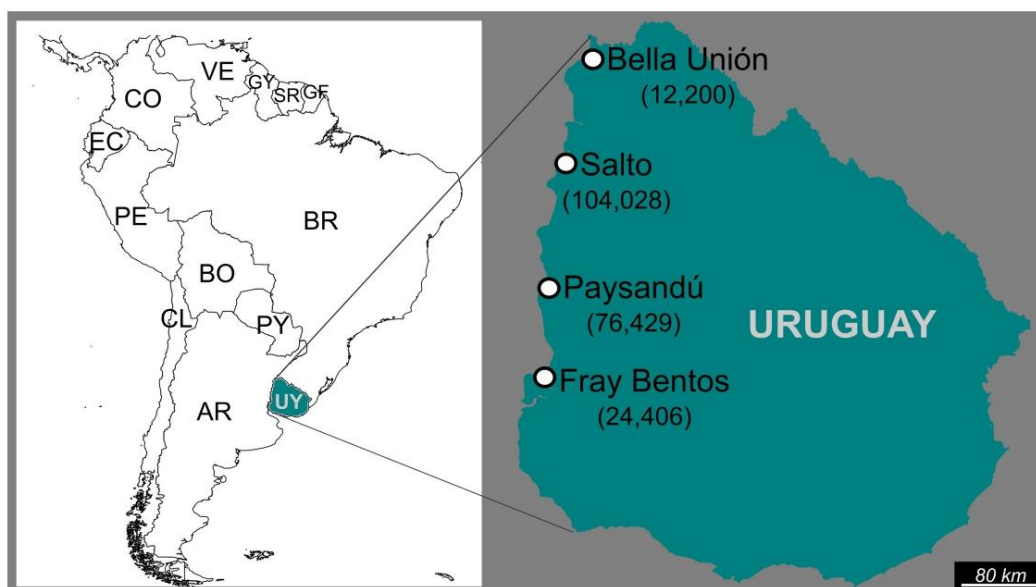


Fig 1. Geographic location of the four Uruguayan cities in which wastewater samples for this study were collected. In the left panel, a map of South America shows Uruguay in green. In the right panel, a zoom-view of the map of Uruguay shows Bella Unión, Salto, Paysandú, and Fray Bentos locations. Population size of each city is also indicated. South American countries are named according to the Alpha-2 code as described in the ISO 3166 international standard.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0255846.g001>

20°3.38'W). SET_2 comprises specimens (100 ml each) from three of the previous four cities (Bella Unión, Salto and Fray Bentos) also collected once a month between March 2017 and February 2018 at the same sampling points from 2011–2012. Specimens from Salto, Paysandú and Fray Bentos consist of domestic raw wastewater, collected from master-pipes before discharging onto the Uruguay river. Nevertheless, the specimens from Bella Unión were collected from a natural glen that receives the effluent from a wastewater stabilization-pond.

One sampling point was determined in each city and since all of them were of public access, none permits were required for collecting.

Samples (100 ml) were concentrated as previously described in Lizasoain et al. (2018) [28] using a method of adsorption-elution to a negatively charged membrane and concentrating virus in 1 ml of final eluate per sample (100-fold concentration).

Human enterovirus detection, next-generation sequencing and bioinformatics

Viral genomes were extracted from 140 µL of viral concentrate using the QIAamp® Viral RNA Mini Kit (Qiagen®, Hilden, Germany) according to manufacturer's instructions. A RT-nested PCR method proposed by Nix et al. [30] was used to amplify a partial segment of VP1-coding segment with primers AN32-AN35 in the reverse transcription, and primers 222/224 and AN88/AN89 in first and second PCR rounds, respectively. At the second round, AN88 and AN89 primers were modified by addition of Illumina Universal Adapter sequences at the 5' ends, according to the protocol of library preparation for metagenomic sequencing [31] in Illumina MiSeq platform (Illumina Inc., San Diego, CA, USA). PCR products were loaded into agarose gels and after the electrophoresis, bands of the expected size were excised and purified with the PureLink® Quick Gel Extraction and PCR Purification Combo Kit (Invitrogen-Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). MacroGen Inc. Next Generation Sequencing Service (Seoul, Republic of Korea), barcoded each sample and prepared the libraries with Nextera XT Index Kit (Illumina Inc., San Diego, CA, USA). Samples were sequenced on Illumina MiSeq 2 × 300 bp, producing paired end reads. Libraries from 2011–2012 and 2017–2018 were sequenced in two independent runs.

Raw Illumina reads were paired using merge pairs algorithm with a minimum overlap length of 50 bp in VSEARCH v2.11 [32]. The resulting contigs (merged paired reads) were filtered out if their lengths were <100 bp, and if they contained homopolymer tracks >8 bp in length. Quality trimming of contigs was performed by using—fastq_filter command and contigs with more than 1.0 total expected errors (—fastq_maxee 1.0) were discarded. In order to save time in further analyses, a dereplication step was performed using VSEARCH—derep_fulllength algorithm on the processed contigs to find unique sequences by clustering at 100% sequence identity. All unique sequences without duplicates (singletons) were removed since they were considered probable sequencing-error products. Probable chimeras (abskew = 2) were also removed from each sample.

Clusters of contigs were generated with VSEARCH using identity criterion of 97%, adopting a representative sequence (centroid sequence) of each cluster for further analyses. Finally, centroid sequences were mapped by VSEARCH's—usearch_global at 80% sequence identity against a Customized Human Enteroviruses Database (CHED v1.0), composed of 30,850 sequences of the viral capsid VP1 protein-coding region from 111 enterovirus types, which were downloaded from NCBI nucleotide database [33].

Phylogenetic characterisation of enterovirus A71 and echovirus 30

All EV-A71 and E30 VP1 gene sequences > 800 nt with known location and sampling date available in the GenBank by September 4th, 2020 were downloaded and combined with: 1)

strains reported in this study and their best BLAST hits; 2) partial VP1 sequences from Córdoba city (Argentina) previously described by our group (13 sequences of EV-A71 and 20 sequences of E30), and their best BLAST hits.

Some reference sequences for EV-A71 and E30 used by Bessaud et al. [34] and Lema et al. [35] respectively, were included in both datasets. This resulted in a final dataset composed by 7,658 sequences of EV-A71 and a dataset of 1,297 E30 sequences. Both datasets were aligned with the Muscle program [36]. Maximum likelihood (ML) phylogenetic trees were inferred with FastTree v2.1 software [37] under the GTR+Gamma20 model. The reliability of the phylogenies was estimated with the approximate likelihood-ratio test (aLRT) based on a Shimodaira–Hasegawa-like procedure [38, 39]. Phylogenetic trees were visualized and edited with FigTree v1.4.3.

Nucleotide sequences of EV-A71 and E30 from Uruguay reported in this study were deposited in GenBank and are available with the accession numbers MW196710–MW196712, MW196730–MW196732 and MW196734.

Results

Human enterovirus detection and characterization

Fifty out of a total of 84 Uruguayan wastewater samples collected along 2011–2012 and 2017–2018, were positive for EVs (Table 1).

All 50 positive samples yielded on average 117,996 paired merged reads (contigs), from which around 8.5% reads were discarded according to established quality parameters. Finally,

Table 1. Human enterovirus positivity by city and next-generation sequencing performance of VP1-amplicons from Uruguayan wastewater samples.

			Reads ^a					
	n ^c	pos ^d /n	Paired raw	Pair merged	After quality filters	Mapped	EV types	OTUs ^e
2011–2012								
BU ^b	12	2/12	123,658	71,433	66,894	81	2	2
			±30,442	±24,204	±24,620	±112		
SA ^b	12	9/12	141,316	108,839	102,456	51,495	9	20
			±11,113	±8,792	±8,258	±37,689		
PY ^b	12	6/12	142,165	109,995	100,220	69,225	10	18
			±13,639	±8,246	±8,215	±46,087		
FB ^b	12	12/12	138,068	107,926	98,048	55,438	9	49
			±10,917	±10,115	±10,101	±38,385		
2017–2018								
BU ^b	12	5/12	273,134	117,851	106,113	48,148	10	32
			±55,348	±30,599	±29,132	±68,222		
SA ^b	12	8/12	230,022	134,447	123,566	111,187	11	33
			±38,869	±26,489	±21,294	±48,422		
FB ^b	12	8/12	237,664	144,687	130,894	119,975	11	30
			±83,593	±64,441	±5,340	±69,933		
TOTAL	84	50/84	182,722	117,996	108,000	72,685	27	184
			±66,244	±33,488	±28,751	±56,864		

^aShaded values are averages for positive samples.

^bBU: Bella Unión, SA: Salto, PY: Paysandú, FB: Fray Bentos.

^cn: number of samples.

^dpos: positive samples.

^eOTUs: Operational Taxonomic Units (note that a single EV type could be represented by more than one OTU in a sample).

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0255846.t001>

Table 2. Distribution of percentage of sequence identity among OTUs and reference sequences with the which they mapped in the Customized Human Enterovirus Database (CHED v1.0).

		Nucleotide identity (%)	
		Min	Max
Enterovirus A	CVA2	88.2	92.3
	CVA10	88.5	97.6
	CVA3	88.8	88.8
	EV-A90	90.2	90.9
	CVA5	92.6	92.6
	EV-A71	96.0	98.6
	CVA4	96.6	96.9
	CVA6	96.9	97.3
Enterovirus B	CVA16	99.6	100
	CVB2	81.1	98.4
	E1	83.8	83.8
	E14	84.3	84.3
	CVA9	88.5	94.4
	CVB5	91.7	97.8
	E30	95.3	96.3
	CVB4	96.9	96.9
	E21	96.9	97.2
	E11	97.8	97.8
	CVB1	98.4	98.7
	E6	98.4	100
Enterovirus C	CVB3	99.3	99.3
	CVA24	80.0	86.1
	EV-C99	80.7	98.7
	CVA13	81.8	86.4
	CVA1	86.1	94.7
	CVA19	93.9	94.6
	CVA22	96.6	98.4

Values in bold are min/max percentages for each Enterovirus species.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0255846.t002>

67.3% (72,685) of filtered contigs mapped with different EVs types (Table 1, S1 Table). In total, 27 different EV types belonging to *Enterovirus A* species (9 types), *Enterovirus B* species (12 types) and *Enterovirus C* species (6 types) were detected (Table 2, S2 Table). Values of nucleotide identity between OTUs and reference sequences with which they were mapped, ranged between 88.2 to 100, 81.1 to 100, and 80 to 98.7 for Enterovirus A, B, and C, respectively (Table 2).

Only 5 EV types (CVA10, EV-A71, CVA9, E6 and CVA24) were detected at both sampling periods, while 22 types were detected exclusively in either one of the two sampling periods: 12 types in 2011–2012 (CVA2, A3, A4, A16, A22, B1, B3, E1, E14, E21, EV-A90 and EV-C99), and 10 types in 2017–2018 (CVA1, A5, A6, A13, A19, B2, B4, B5, E11 and E30) (Table 3). Negative samples were not further investigated.

Enterovirus A71 detection and characterisation

EV-A71 was detected in a sample from January 2012 collected in Paysandú (OTU-C), and in samples from September and October 2017 collected in Bella Unión and Salto, respectively

Table 3. Enterovirus types detected in wastewater samples from Uruguay in 2011–2012 and 2017–2018.

Type ^a /month	2011–2012												2017–2018											
	M	A	M	J	J	A	S	O	N	D	J	F	M	A	M	J	J	A	S	O	N	D	J	F
CVA2						X					X													
CVA3											X													
CVA4		X		X																				
CVA5													X											
CVA6													X									X	X	
CVA10			X														X	X		X				
CVA16	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X												
EV-A71											X								X	X				
EV-A90		X																						
CVA9			X	X	X		X									X	X							
CVB1							X	X		X	X	X												
CVB2																X	X	X	X	X				
CVB3							X				X	X												
CVB4													X	X										
CVB5														X		X	X			X				
E1	X																							
E6											X		X	X			X		X	X			X	X
E11													X											
E14				X																				
E21	X		X		X																			
E30																X	X							
CVA1														X	X	X			X				X	X
CVA13																X								X
CVA19														X	X	X		X	X	X				
CVA22	X	X	X	X			X			X	X	X												
CVA24			X										X	X	X			X						
EV-C99	X	X	X	X	X	X	X	X		X	X													
EV-C (untyped)			X*																					

^aCVA: coxsackievirus A, CVB: coxsackievirus B, E: echovirus, EV-A: enterovirus A, EV-C: enterovirus C.

* This OTU mapped with reference sequences of different types from Species C (CVA24 and EV-C99). Therefore, it was considered untyped. None of the other 183 OTUs presented incongruent results in the mapping process.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0255846.t003>

(OTUs A and B); with an abundance (percentage of contigs mapping against EV-A71) between less than 1% and more than 99% per sample (Table 4).

These OTUs were subject to phylogenetic analyses along with 7,655 strains worldwide reported. The whole set of sequences segregated into seven different clusters (SH-aLRT ≥ 0.9)

Table 4. Defined OTUs of enterovirus A71 and echovirus 30.

OTUs ^a	Enterovirus A71			Echovirus 30			
	OTU-A	OTU-B	OTU-C	OTU-D	OTU-F	OTU-G	OTU-H
Location ^b	BU	SA	PY	BU	BU	FB	FB
Date	Sep-2017	Oct-2017	Jan-2012	Jun-2017	Jul-2017	Jun-2017	Jul-2017
Abundance (%contigs)	99.98%	<1%	<1%	16.40%	8%	99.97%	100%

^aOTUs: Operational Taxonomic Units.

^bBU: Bella Unión, SA: Salto, PY: Paysandú, FB: Fray Bentos.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0255846.t004>

according to previously proposed genetic classification of the EV-A71 in genogroups A to G [40]. Additionally, 4,550 strains of genogroup C segregated into sub-genogroups C1 to C5 ($SH-aLRT \geq 0.7$) (Fig 2A, S1 File).

Uruguayan strains of EV-A71 detected in this study clustered together with 559 worldwide strains reported as sub-genogroup C2 and dated between 1995 and 2018 ($SH-aLRT = 0.9$) (Fig 3, S3 File). Uruguayan OTUs A and B corresponding to Bella Unión and Salto respectively, segregated in a monophyletic sub-group ($SH-aLRT = 0.73$) alongside Argentine strains from 2017 and 2018 previously reported by our group [29]. Phylogenetic analysis suggests that there were at least four other introductions of EV-A71 sub-genogroup C2 into South America (three in Córdoba in 2011, 2012 and 2017, and one in Paysandú in 2012 [OTU-C]) characterised by the absence of local dispersion evidence.

In turn, the sub-genogroup C1 (S4 File) encompassed a sub-cluster composed of two strains from Córdoba Province, Argentina isolated in November and December 2017 alongside 196 sequences from Europe reported in the last 7 years ($SH-aLRT = 0.84$).

Echovirus 30 detection and characterisation

E30 was detected in samples from June and July 2017 in Bella Unión and Fray Bentos. Samples from Bella Unión (OTUs-D and F) had less than 20% of contigs mapping with E30, and samples from Fray Bentos (OTUs-G and H) had abundances higher than 99% (Table 4). All E30 OTUs were selected for phylogenetic reconstruction together with 1,293 strains of global circulation including sequences of strains detected previously in wastewater samples from Argentina, as in the case of EV-A71.

E30 strains segregated into five well aLRT supported (≥ 0.85) phylogenetic clusters, representing genotypes A, B, E, F and H after pruning of non-clustered sequences belonging to genotypes C, D and G (Fig 2B, S2 File). The Uruguayan strains of E30 reported in this study segregate into the E genotype alongside sequences from Córdoba-Argentina (all from 2017) previously reported by our group [28] and other 19 strains reported in 2016–2017 in the United Kingdom and Austria ($SH-aLRT = 0.9$) (Fig 4, S5 File). Additionally, five E30 strains sampled in 2011–2012 in Córdoba and previously reported by our group [29], segregated in a highly supported ($SH-aLRT = 0.8$) monophyletic group alongside Argentine sequences from the same period reported during an outbreak of AM, and a Brazilian sequence reported in 2015 (Fig 4, S5 File).

On the other hand, six additional E30 strains from Córdoba reported in 2017, clustered together with strains belonging to genotype F (S6 File), and shared a node ($SH-aLRT = 0.72$) with a sub-cluster of European strains reported between 2014 and 2018.

Discussion

Twenty-seven different EVs types belonging to *Enterovirus A*, *Enterovirus B* and *Enterovirus C* species were detected in this study, among which 12 circulated in 2011–2012, 10 in 2017–2018, and 5 during both sampling periods.

In a previous study based on Sanger sequencing of amplicons directly obtained from wastewater samples from SET_1 [28], we reported the presence of six out of all types now reported. This means that by this Next-Generation Sequencing approach we expanded our knowledge about the circulation of EVs in Uruguay, and updated the information about their circulation to more recent years.

Contrarily to a previous observation made by us in Córdoba-Argentina [29], where most types detected in 2011–2012 were also identified in samples from 2017–2018, an important type 'exchange' was observed between the same sampling periods analysed in Uruguay. A

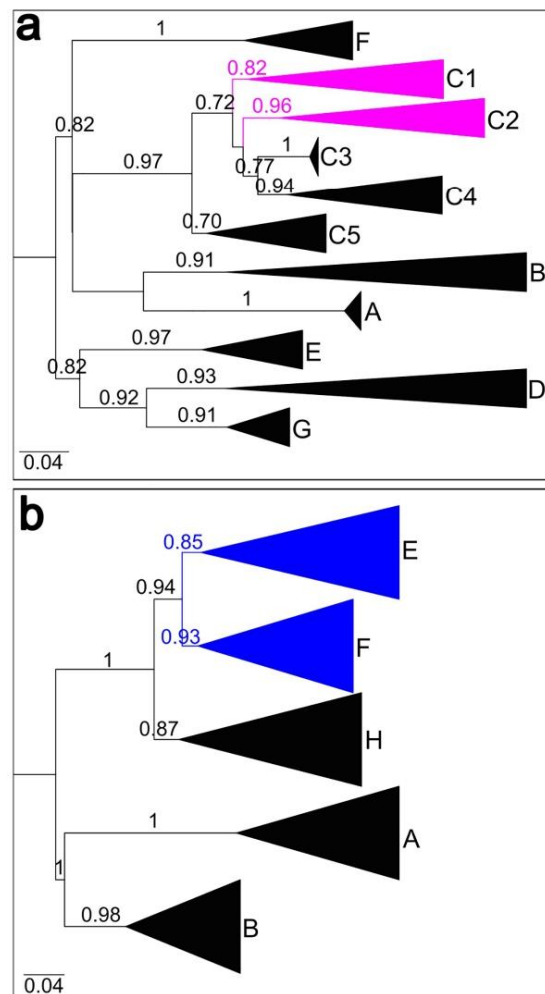


Fig 2. Maximum likelihood phylogenetic trees of enterovirus A71 and echovirus 30. Phylogenetic trees of enterovirus A71 (a) and echovirus 30 (b) were constructed with 7,658 and 1,297 worldwide reported strains, respectively, including 16 strains of EV-A71 and 22 strains of E30 from Uruguay and Argentina reported by us. Clades were collapsed and named according to previously established classification in different lineages. SH-aLRT support values are shown at branches. Each tree is midpoint rooted. For echovirus 30, lineages described by Lema et al. 2019 [35] as extinct were excluded. Bars at the bottom denote genetic distance. Clades containing sequences from this study were highlighted.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0255846.g002>

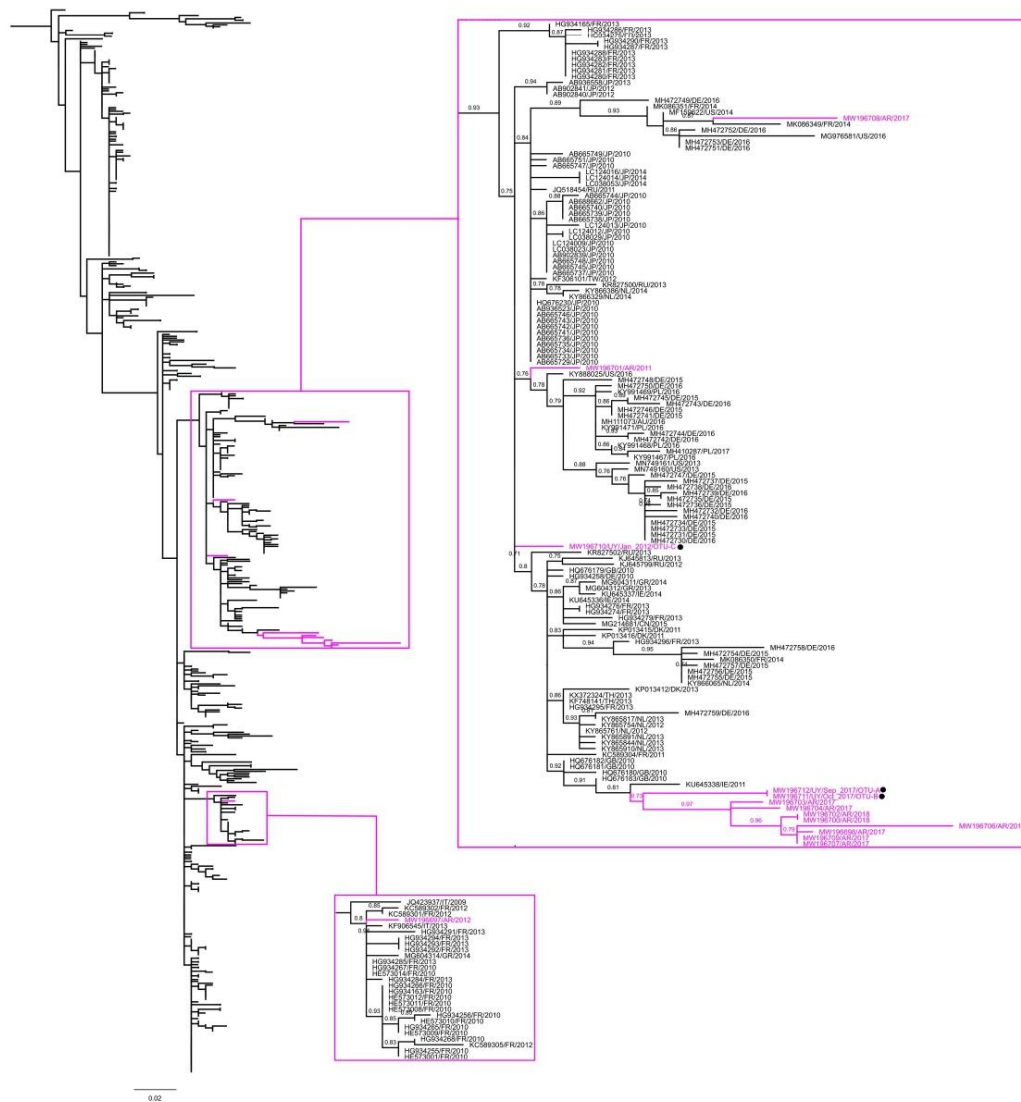


Fig 3. Maximum likelihood phylogenetic tree of enterovirus A71 sub-genogroup C2. The image corresponds to the non-collapsed view of the C2 lineage from Fig 2A, which clustered 573 worldwide circulating strains, including 11 strains from Argentina and 3 strains from Uruguay reported by us in this study. South American strains and clusters that contain them were pink-highlighted, and magnified at right. Strains were named by their GenBank accession numbers, the Alpha-2 country codes (ISO3166), and their detection dates. Black circles highlight Uruguayan strains. SH-aLRT values ≥ 0.7 are shown. The bar at the bottom denotes genetic distance. [S3 File](#) shows a full view of the entire tree.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0255846.g003>

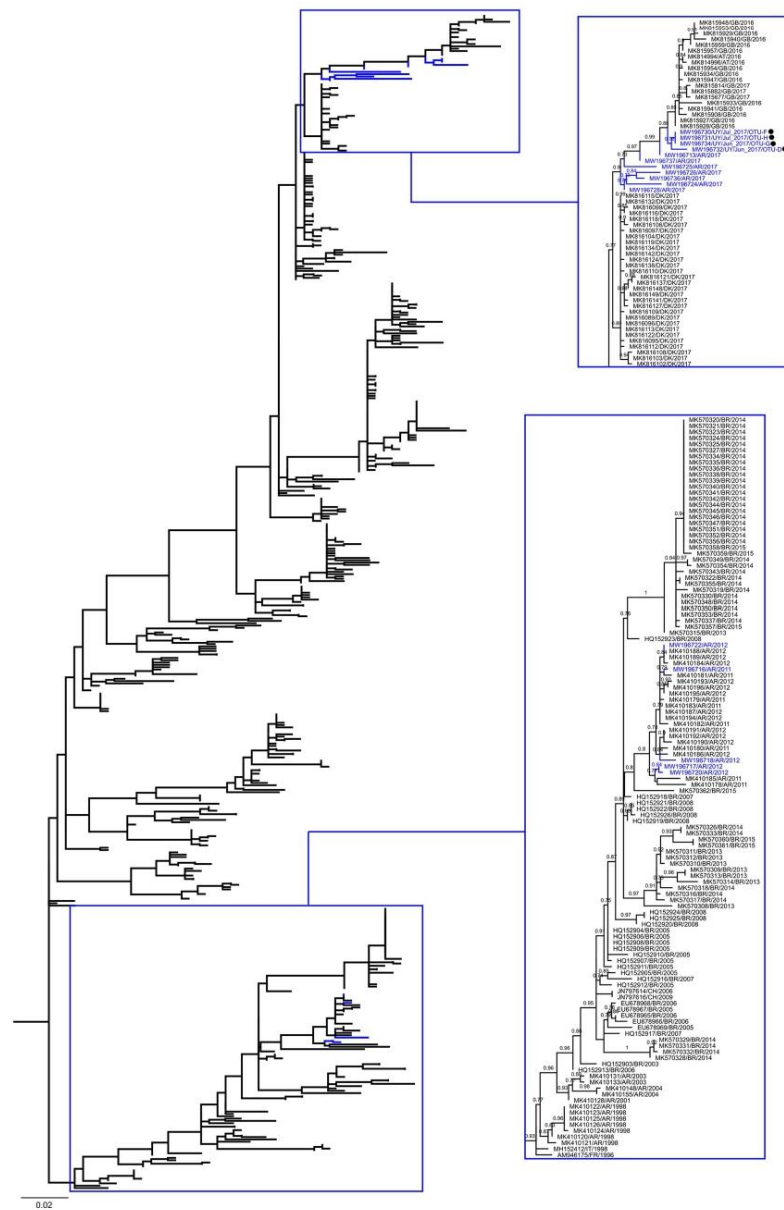


Fig 4. Maximum likelihood phylogenetic tree of echovirus 30 genotype E. The image corresponds to the non-collapsed view of genotype E in Fig 2b, which clustered 508 worldwide circulating strains, including 16 strains from Uruguay and Argentina reported by us in this study (blue branches). Clusters that contain Uruguayan and Argentine strains reported by us are blue-highlighted and magnified at right. Strains were named by their GenBank accession numbers, the Alpha-2 country codes (ISO3166) and their detection dates. Black circles highlight Uruguayan strains. SH-aLRT values ≥ 0.7 are shown. The bar at the bottom denotes genetic distance. S5 File shows a full view of the entire tree.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0255846.g004>

plausible explanation for differences between the results obtained for Córdoba and Uruguay could be related to the population size of the analysed cities and its effect in the duration of transmission chains in the community. We can suppose that in larger populations—Córdoba has 1,329,604 inhabitants—transmission chains are longer than in smaller cities such as those studied by us in Uruguay (the most populated is Salto with 104,028 inhabitants).

Unfortunately, little information is available about the impact of EV's types in the Uruguayan population's health and there is a great uncertainty about which EV types are causing AM, encephalitis, or AFP, among other diseases commonly associated with these viruses. Therefore, the implications of the observed exchange of EV types over time for Uruguayan public health, remain unknown.

Since samples from 2011–2012 remained frozen for longer periods than samples from 2017–2018 prior to the sequencing, this could be affecting the diversity of enteroviruses assessed in the oldest samples. Moreover, primers proposed by Nix et al. [30] are quite degenerated and we found some mismatches during the alignment of primers to genomic sequences of enteroviruses that were discovered after the date in the which these primers were designed, which could be affecting the detection of additional types to the reported here. These limitations of our study, lead us to consider that the diversity of enteroviruses in our samples probably could be higher than the described here. Despite the fact that primers designed by Nix et al. are broadly reactive for enteroviruses, future studies should consider more than a single strategy for detecting this group of highly diverse viruses.

EV-A71 is one of the main etiological agents causing HFMD epidemics worldwide, with high incidence in the Asian-Pacific region [40]. There is a strong association between EV-A71 infections and severe forms of HFMD, sometimes with complications at CNS level [41–44]. Interestingly, our results show the *Enterovirus A* species type replacement along the two sampling periods. In 2011–2012, CVA16 circulated predominantly, although in 2017–2018 other types emerged as CVA6 or CVA10, coinciding with reports of HFMD epidemics attributed to these pathogens since 2018 in this geographic region [45, 46]. Nevertheless, EV-A71 was not detected during the study of clinical cases from these epidemics in spite of its detection in wastewater samples collected in Uruguay in September and October, 2017. In the extent that new reports from medical diagnosis describe the presence of EVs in Uruguay, WBE will be an important complement to understand the dynamic of EVs circulation in the country.

Despite global efforts to understand the epidemiology of EV-A71, the knowledge about its circulation in South America is limited. The first genetic record of EV-A71 in South America comes from the detection of genogroup B in Colombia in 1994 [47], and then, in 1999 this genogroup was detected in a stool sample obtained from a patient suffering AFP in Northern Brazil [48]. However, first evidence about the circulation of the virus in Brazil comes from a previous study of serum samples obtained from patients with AFP and paresis [49]. Besides, strains from sub-genogroup C1 were isolated from nasopharyngeal swab samples collected from individuals with flu-like symptoms in Peru in 2006–2009 [50]. Recently, a study found EV-A71 responsible for ~8% of the AFP cases associated with enteroviruses in Brazil in the period 2005–2017 [51]. Interestingly, the study reported that EV-A71 sub-genogroup B1 exclusively circulated up to 2014, and that sub-genogroup C2 replaced it from then. Our study

expands the knowledge about the geographic range of sub-genogroup C2 in South America, through the characterization of several strains from both Uruguay and Argentina, representing at least five different introduction events in the region, one of them successfully disseminated in both countries during 2017–2018. Additionally, we evidenced that EV-A71 C2 has circulated in South America at least from 2011, since we detected this sub-genogroup in a sample collected in Córdoba that year.

First evidence about C2 circulation in the Americas are from 1997–1998 and come from the USA [47]. EV-A71 has been characterized in the USA as a virus of low circulation, and specifically C2 was associated with some outbreaks in the middle 2000 [52–54]. However, C2 was detected at a lower frequency than C1 during the study of a large outbreak of neurologic disease in children that occurred in 2018 [55]. Additionally, a low frequency of detection during the study of HFMD cases reported in Cuba between 2011 and 2013, suggests a low circulation of C2 in the Caribbean region too [56].

Unfortunately, since the South American C2 strains herein characterized belong to wastewater samples, and considering the lack of reports from clinical surveillance, it is hard to know whether they come from asymptomatic/mild infections, or from severe diseases such as muscular paralysis or meningitis, that were not reported.

Interestingly, two EV-A71 strains detected in Córdoba in 2017 belong to a sub cluster proposed as an emergent lineage of EV-A71 C1 (C1-like variant), which has been mainly detected since 2015 in European countries [57–62]. The emergence of this C1-like variant in Europe was associated with sporadic cases and outbreaks of severe neurological disorders such as AM, encephalitis or AFP. This meant a concern for countries in which the C1-like variant replaced other sub-genogroups increasing the number of affected individuals, or in where EV-A71 had not been a problem until the C1-like variant entered. Moreover, China has recently reported the emergence of a recombinant strain originated from C1-like variant strains and coxsackievirus A, that could not be effectively neutralized by EV-A71 C4a neutralizing antibodies, which raises concern about the usefulness of the present immunization strategy against the virus [63].

Beyond the first detection of the emergent C1-like variant in South America, our results show the co-circulation of C2 and C1 sub-genogroups in Argentina during 2017, which could propitiate the genomic recombination and upsurge of new variants. Therefore, the epidemic potential of EV-A71 C1-like variant and the possibility of recombination events, together with the severity of the diseases, the long-term sequelae in affected individuals, and the different antigenicity between this variant and vaccine strains, raise concern and call for an active surveillance in our region [63–66].

Although this study constitutes the first report of E30 in Uruguay, this virus was extensively characterised from AM cases in the neighbour countries of Argentina and Brazil [17, 35, 67, 68]. In line with a previous study, we verify the circulation of E30 genotypes E and F in Argentina [35]. The study of AM cases accounted for 2007–2008 in Córdoba [68] found a high predominance of lineage H. Despite this lineage seems to be replaced at local level by E and F in next few years, this data shows how dynamic is the behaviour of E30 in Córdoba, and probably in Argentina all.

In Uruguay, we only detected genotype E. The strains circulating in Uruguay in 2017 were highly related to some strains that circulated in the same year in Argentina, raising the possibility of a single event of introduction -probably from Europe- with a posterior regional dispersion, as was also suggested for EV-A71. On the other hand, some E30 strains detected in wastewater samples from Argentina in 2011–2012, clustered together with other Argentine strains also detected in 2011–2012 during the study of different outbreaks and sporadic cases of AM [35].

Although most of the Argentine E30 strains characterised by our group belong to genotype E, a minor proportion corresponding to samples from Córdoba detected in 2017, belong to genotype F. This genotype circulated in Argentina at least since 1998 when an outbreak of AM occurred in the Province of Mendoza and its last register in the country was in 2007 [35]. In our analysis, strains reported in Brazil in 2017, also clustered inside the genotype F, and strains detected by us in Córdoba in 2017 too, which confirms the recent presence of this genotype in the South American region.

Our results show that a previously unrecognized diversity of EV types circulated in Uruguay. Some of these types silently spread into the communities in the absence of published reports from medical diagnosis about diseases such as AM, encephalitis or AFP. OTUs most divergent regarding our database were mostly from species C (CVA24, EV-C99 and CVA13), which agrees with the previous report of circulation in Uruguay of highly divergent strains from this species [28]. These results emphasise the importance to sequence strains that circulate in remote geographic locations, in order to know divergent strains regarding those already described in the rest of world, as a first step to understand the role of this divergence in the re-emergence of types/subtypes [69]. In line with that, our study is a contribution to elucidate global evolutionary patterns in the extent that divergent members of a genus scarcely described in South America are being characterized.

Specifically, with regards to EV-A71 and E30, our results showed that some variants are widely spread into our region, and others as the emergent EV-A71 C1-like variant -which was detected only in Argentina at the end of 2017- probably entered very recently. Surveillance programs should be strengthened in Uruguay -as well as in other South American countries- to trace the dynamics and behaviour of endemic and emerging variants, especially of those EV types strongly associated with severe diseases poorly studied in our geographic region.

Supporting information

S1 Table. Data processing: Next-generation sequencing results and mapping process.
(XLSX)

S2 Table. Results of mapping process for all OTUs obtained in this study.
(XLSX)

S1 File. Maximum likelihood phylogenetic tree (midpoint rooted) constructed with 7,658 partial VP1 fragments of enterovirus A71 strains worldwide reported. The file is optimized for FigTree v1.4.3.
(NXS)

S2 File. Maximum likelihood phylogenetic tree (midpoint rooted) constructed with 1,297 partial VP1 fragments of echovirus 30 strains worldwide reported. The file is optimized for FigTree v1.4.3.
(NXS)

S3 File. Maximum likelihood phylogenetic tree of enterovirus A71 sub-genogroup C2.
(PNG)

S4 File. Maximum likelihood phylogenetic tree of enterovirus A71 sub-genogroup C1. The image corresponds to the non-collapsed view of the C1 sub-genogroup in Fig 2a, which clustered 440 worldwide circulating strains, including 2 strains from Argentina reported by us (blue branches). SH-aLRT ≥ 0.7 are shown at branches. The C1 like-variant sub-cluster is highlighted in red. GenBank accession numbers, Alpha-2 country codes (ISO3166) and

detection dates code each strain. The bar at the bottom denotes genetic distance.
(PNG)

S5 File. Maximum likelihood phylogenetic tree of echovirus 30 genotype E.
(PNG)

S6 File. Maximum likelihood phylogenetic tree of echovirus 30 genotype F. The image corresponds to the non-collapsed view of the F genotype in Fig 2b, which clustered 350 worldwide circulating strains, including 6 strains from Argentina (blue branches) reported by us. SH-aLRT ≥ 0.7 are shown at branches. GenBank accession numbers, Alpha-2 country codes (ISO3166) and detection dates code each strain. The bar at the bottom denotes genetic distance.
(PNG)

Acknowledgments

Authors thank the logistic support received from the Cenur Litoral Norte staff during the wastewater sampling campaigns implemented in different Uruguayan cities.

Author Contributions

Conceptualization: Andrés Lizasoain, Rodney Colina.

Data curation: Daiana Mir.

Formal analysis: Andrés Lizasoain, Daiana Mir.

Funding acquisition: Silvia Nates, Rodney Colina.

Investigation: Andrés Lizasoain, Daiana Mir, Matías Salvo, Viviana Bortagaray, Gisela Masachessi, Matías Victoria.

Methodology: Andrés Lizasoain, Matías Salvo, Viviana Bortagaray, Gisela Masachessi, Adrián Farías.

Resources: Nélica Rodríguez-Osorio, Silvia Nates, Matías Victoria, Rodney Colina.

Supervision: Andrés Lizasoain, Rodney Colina.

Validation: Andrés Lizasoain.

Visualization: Andrés Lizasoain, Daiana Mir.

Writing – original draft: Andrés Lizasoain.

Writing – review & editing: Andrés Lizasoain, Daiana Mir, Matías Salvo, Viviana Bortagaray, Gisela Masachessi, Adrián Farías, Nélica Rodríguez-Osorio, Silvia Nates, Matías Victoria, Rodney Colina.

References

1. Pallansch MA, Roos RP. Enteroviruses: Polioviruses, coxsackieviruses, echoviruses, and newer enteroviruses. In: Knipe DM, Howley PM, Griffin DE, Lamb RA, Martin MA, Roizman B, Stephen ES, editors. *Fields Virology*, 4th edn. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2001. pp. 723–775.
2. Tapparel C, Siegrist F, Petty TJ, Kaiser L. Picornavirus and enterovirus diversity with associated human diseases. *Infect Genet Evol*. 2013. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2012.10.016> PMID: 23201849
3. Simmonds P, Gorbalenya AE, Harvala H, Hovi T, Knowles NJ, Lindberg AM, et al. Recommendations for the nomenclature of enteroviruses and rhinoviruses. *Arch Virol*. 2020. <https://doi.org/10.1007/s00705-019-04520-6> PMID: 31980941

4. Christopher S, Theogaraj S, Godbole S, John T.J. An epidemic of acute hemorrhagic conjunctivitis due to coxsackievirus A24. *J Infect Dis*. 1982. <https://doi.org/10.1093/infdis/146.1.16> PMID: 6282991
5. 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. <https://doi.org/10.1099/vir.0.80148-0> PMID: 15483233
6. Smura T, Blomqvist S, Paananen A, Vuorinen T, Sobotová Z, Bubovica V, et al. Enterovirus surveillance reveals proposed new serotypes and provides new insight into enterovirus 5'-untranslated region evolution. *J Gen Virol*. 2007. <https://doi.org/10.1099/vir.0.82866-0> PMID: 17698662
7. Osterback R, Vuorinen T, Linna M, Susi P, Hyypiä T, Waris M. Coxsackievirus A6 and hand, foot, and mouth disease, Finland. *Emerg Infect Dis*. 2009. <https://doi.org/10.3201/eid1509.090439> PMID: 19788821
8. Kreuter JD, Barnes A, McCarthy JE, Schwartzman JD, Oberste MS, Rhodes CH, et al. A fatal central nervous system enterovirus 68 infection. *Arch Pathol Lab Med*. 2011. <https://doi.org/10.5858/2010-0174-CR.1> PMID: 21631275
9. Van Leer-Buter CC, Poelman R, Borger R, Niesters HG. Newly Identified Enterovirus C Genotypes, Identified in the Netherlands through Routine Sequencing of All Enteroviruses Detected in Clinical Materials from 2008 to 2015. *J Clin Microbiol*. 2016. <https://doi.org/10.1128/JCM.00207-16> PMID: 27358467
10. Bao J, Thorley B, Isaacs D, Dinsmore N, Elliott EJ, McIntyre P, et al. Polio—The old foe and new challenges: An update for clinicians. *J Paediatr Child Health*. 2020. <https://doi.org/10.1111/jpc.15140> PMID: 32905647
11. Suresh S, Forgie S, Robinson J. Non-polio Enterovirus detection with acute flaccid paralysis: A systematic review. *J Med Virol*. 2018. <https://doi.org/10.1002/jmv.24933> PMID: 28857219
12. Chen L, Xu SJ, Yao XJ, Yang H, Zhang HL, Meng J, et al. Molecular epidemiology of enteroviruses associated with severe hand, foot and mouth disease in Shenzhen, China, 2014–2018. *Arch Virol*. 2020. <https://doi.org/10.1007/s00705-020-04734-z> PMID: 32666145
13. Uprety P, Graf EH. Enterovirus infection and acute flaccid myelitis. *Curr Opin Virol*. 2020. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2020.06.006> PMID: 32711392
14. Lee TC, Guo HR, Su HJ, Yang YC, Chang HL, Chen KT. Diseases caused by enterovirus 71 infection. *Pediatr Infect Dis J*. 2009. <https://doi.org/10.1097/INF.0b013e3181a41d63> PMID: 20118685
15. Lei D, Griffiths E, Martin J. WHO working group meeting to develop WHO Recommendations to assure the quality, safety and efficacy of enterovirus 71 vaccines. *Vaccine*. 2020. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2020.05.001> PMID: 32418797
16. Li ML, Shih SR, Tolbert BS, Brewer G. Enterovirus A71 Vaccines. *Vaccines (Basel)*. 2021. <https://doi.org/10.3390/vaccines9030199> PMID: 33673595
17. Ramalho E, Sousa I Jr, Burlandy F, Costa E, Dias A, Serrano R, et al. Identification and Phylogenetic Characterization of Human Enteroviruses Isolated from Cases of Aseptic Meningitis in Brazil, 2013–2017. *Viruses*. 2019. <https://doi.org/10.3390/v11080690> PMID: 31362357
18. Bubba L, Broberg EK, Jasir A, Simmonds P, Harvala H, Enterovirus study collaborators. Circulation of non-polio enteroviruses in 24 EU and EEA countries between 2015 and 2017: a retrospective surveillance study. *Lancet Infect Dis*. 2020. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(19\)30566-3](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(19)30566-3) PMID: 31870905
19. McWilliam Leitch EC, Bendig J, Cabrerizo M, Cardosa J, Hyypiä T, Ivanova OE, et al. Transmission networks and population turnover of echovirus 30. *J Virol*. 2009. <https://doi.org/10.1128/JVI.02109-08> PMID: 19091869
20. Brown DM, Zhang Y, Scheuermann RH. Epidemiology and Sequence-Based Evolutionary Analysis of Circulating Non-Polio Enteroviruses. *Microorganisms*. 2020. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8121856> PMID: 33255654
21. Apostol LN, Imagawa T, Suzuki A, Masago Y, Lupisan S, Olveda R, et al. Genetic diversity and molecular characterization of enteroviruses from sewage-polluted urban and rural rivers in the Philippines. *Virus Genes*. 2012. <https://doi.org/10.1007/s11262-012-0776-z> PMID: 22743820
22. Ndiaye AK, Diop PA, Diop OM. Environmental surveillance of poliovirus and non-polio enterovirus in urban sewage in Dakar, Senegal (2007–2013). *Pan Afr Med J*. 2014. <https://doi.org/10.11604/pamj.2014.19.243.3538> PMID: 25848458
23. Zoni R, Mezzetta S, Affanni P, Colucci ME, Fiore S, Fontana S, et al. Poliovirus and non-polio-enterovirus environmental surveillance in Parma within the "Global Polio Eradication Program" (GPEI). *Acta Biomed*. 2019. <https://doi.org/10.23750/abm.v90i9-S.8702> PMID: 31517896
24. Bisseux M, Debroas D, Mirand A, Archimbaud C, Peigue-Lafeuille H, Bailly JL, et al. Monitoring of enterovirus diversity in wastewater by ultra-deep sequencing: An effective complementary tool for clinical enterovirus surveillance. *Water Res*. 2020. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2019.115246> PMID: 31710918

25. Hovi T, Cantell K, Huovilainen A, Kinnunen E, Kuronen T, Lapinleimu K, et al. Outbreak of paralytic poliomyelitis in Finland: widespread circulation of antigenically altered poliovirus type 3 in a vaccinated population. *Lancet*. 1986. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(86\)91566-7](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(86)91566-7).
26. Savolainen-Kopra C, Paananen A, Blomqvist S, Klemola P, Simonen ML, Lappalainen M, et al. A large Finnish echovirus 30 outbreak was preceded by silent circulation of the same genotype. *Virus Genes*. 2011. <https://doi.org/10.1007/s11262-010-0536-x> PMID: 20960045
27. Lukashev AN, Vakulenko YA, Turbabin NA, Deviatkin AA, Drexler JF. Molecular epidemiology and phylogenetics of human enteroviruses: Is there a forest behind the trees? *Rev Med Virol*. 2018. <https://doi.org/10.1002/rmv.2002> PMID: 30069956
28. Lizasoain A, Burlandy FM, Victoria M, Tort LFL, da Silva EE, Colina R. An Environmental Surveillance in Uruguay Reveals the Presence of Highly Divergent Types of Human Enterovirus Species C and a High Frequency of Species A and B Types. *Food Environ Virol*. 2018. <https://doi.org/10.1007/s12560-018-9351-7> PMID: 29907902
29. Lizasoain A, Mir D, Masachessi G, Fariás A, Rodríguez-Osorio N, Victoria M, et al. Environmental Surveillance through Next-Generation Sequencing to Unveil the Diversity of Human Enteroviruses beyond the Reported Clinical Cases. *Viruses*. 2021. <https://doi.org/10.3390/v13010120> PMID: 33477302
30. Nix WA, Oberste MS, Pallansch MA. Sensitive, seminested PCR amplification of VP1 sequences for direct identification of all enterovirus serotypes from original clinical specimens. *J Clin Microbiol*. 2006. <https://doi.org/10.1128/JCM.00542-06> PMID: 16891480
31. Illumina, Inc. [Internet]. 16S Metagenomic Sequencing Library Preparation; [cited 2021 Jul 5]. Available from: https://support.illumina.com/documents/documentation/chemistry_documentation/16s/16s-metagenomic-library-prep-guide-15044223-b.pdf.
32. Rognes T, Flouri T, Nichols B, Quince C, Mahé F. VSEARCH: a versatile open source tool for metagenomics. *PeerJ*. 2016. <https://doi.org/10.7717/peerj.2584> PMID: 27781170
33. Lizasoain A, Mir D. Customized Human Enterovirus Database CHED v1.0; 2021 [cited 2021 Jul 5]. Database: figshare [Internet]. Available from: <https://doi.org/10.6084/m9.figshare.14854437.v1>.
34. Bessaud M, Razafindratsimandresy R, Nougairède A, Joffret ML, Deshpande JM, Dubot-Pères A, et al. Molecular comparison and evolutionary analyses of VP1 nucleotide sequences of new African human enterovirus 71 isolates reveal a wide genetic diversity. *PLoS One*. 2014. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0090624> PMID: 24598878
35. Lema C, Torres C, Van der Sanden S, Cisterna D, Freire MC, Gómez RM. Global phylogenetics of Echovirus 30 revealed differential behavior among viral lineages. *Virology*. 2019. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2019.02.012> PMID: 30856485
36. Edgar RC. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res*. 2004. <https://doi.org/10.1093/nar/gkh340> PMID: 15034147
37. Price MN, Dehal PS, Arkin AP. FastTree 2—approximately maximum-likelihood trees for large alignments. *PLoS One*. 2010. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0009490> PMID: 20224823
38. Shimodaira H, Hasegawa M. CONSEL: for assessing the confidence of phylogenetic tree selection. *Bioinformatics*. 2001. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/17.12.1246> PMID: 11751242
39. Anisimova M, Gascuel O. Approximate likelihood-ratio test for branches: A fast, accurate, and powerful alternative. *Syst Biol*. 2006. <https://doi.org/10.1080/10635150600755453> PMID: 16785212
40. Puenpa J, Wanlapakorn N, Vongpunsawad S, Poovorawan Y. The History of Enterovirus A71 Outbreaks and Molecular Epidemiology in the Asia-Pacific Region. *J Biomed Sci*. 2019. <https://doi.org/10.1186/s12929-019-0573-2> PMID: 31627753
41. Ho M, Chen ER, Hsu KH, Twu SJ, Chen KT, Tsai SF, et al. An epidemic of enterovirus 71 infection in Taiwan. Taiwan Enterovirus Epidemic Working Group. *N Engl J Med*. 1999. <https://doi.org/10.1056/NEJM199909233411301> PMID: 10498487
42. Wang Y, Feng Z, Yang Y, Self S, Gao Y, Longini IM, et al. Hand, foot, and mouth disease in China: patterns of spread and transmissibility. *Epidemiology*. 2011. <https://doi.org/10.1097/EDE.0b013e318231d67a> PMID: 21968769
43. Chen BS, Lee HC, Lee KM, Gong YN, Shih SR. Enterovirus and Encephalitis. *Front Microbiol*. 2020. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00261> PMID: 32153545
44. Wang J, Zhou J, Xie G, Zheng S, Lou B, Chen Y, et al. The Epidemiological and Clinical Characteristics of Hand, Foot, and Mouth Disease in Hangzhou, China, 2016 to 2018. *Clin Pediatr (Phila)*. 2020. <https://doi.org/10.1177/0009922820910822> PMID: 32146823
45. Lizasoain A, Mir D, Martínez N, Colina R. Coxsackievirus A10 causing hand-foot-and-mouth disease in Uruguay. *Int J Infect Dis*. 2020. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2020.02.012> PMID: 32081777

46. Lizasoain A, Piegas S, Victoria M, Da Silva EE, Colina R. Hand-foot-and-mouth disease in Uruguay: Coxsackievirus A6 identified as causative of an outbreak in a rural childcare center. *J Med Virol*. 2020. <https://doi.org/10.1002/jmv.25590> PMID: 31502682
47. Brown BA, Oberste MS, Alexander JP Jr, Kennett ML, Pallansch MA. Molecular epidemiology and evolution of enterovirus 71 strains isolated from 1970 to 1998. *J Virol*. 1999. <https://doi.org/10.1128/JVI.73.12.9969-9975.1999> PMID: 10559310
48. Castro CM, Cruz AC, Silva EE, Gomes M de L. Molecular and seroepidemiologic studies of Enterovirus 71 infection in the State of Para, Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2005. <https://doi.org/10.1590/s0036-46652005000200002> PMID: 15880216
49. da Silva EE, Phillips AMB, Schatzmayr HG, Cortes LC. Evidence of enterovirus 71 infections in Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1990. <https://doi.org/10.1590/s0074-02761990000100025> PMID: 2170817
50. Huaman JL, Carrion G, Ampuero JS, Ocaña V, Laguna-Torres VA, Hontz RD. Enterovirus-71 genotype C isolated in Peru between 2006 and 2009. *J Clin Virol*. 2016. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2016.10.023> PMID: 27833060
51. Sousa IP Jr, Oliveira MLA, Burlandy FM, Machado RS, Oliveira SS, Tavares FN, et al. Molecular characterization and epidemiological aspects of non-polio enteroviruses isolated from acute flaccid paralysis in Brazil: a historical series (2005–2017). *Emerg Microbes Infect*. 2020. <https://doi.org/10.1080/22221751.2020.1850181> PMID: 33179584
52. Khetsuriani N, Lamonte-Fowlkes A, Oberst S, Pallansch MA; Centers for Disease Control and Prevention. Enterovirus surveillance—United States, 1970–2005. *MMWR Surveill Summ*. 2006; 55(8):1–20. PMID: 16971890
53. Pérez-Vélez CM, Anderson MS, Robinson CC, McFarland EJ, Nix WA, Pallansch MA, et al. Outbreak of neurologic enterovirus type 71 disease: a diagnostic challenge. *Clin Infect Dis*. 2007. <https://doi.org/10.1086/521895> PMID: 17879907
54. McMinn PC. Recent advances in the molecular epidemiology and control of human enterovirus 71 infection. *Curr Opin Virol*. 2012. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2012.02.009> PMID: 22482716
55. Messacar K, Spence-Davison E, Osborne C, Press C, Schreiner TL, Martin J, et al. Clinical characteristics of enterovirus A71 neurological disease during an outbreak in children in Colorado, USA, in 2018: an observational cohort study. *Lancet Infect Dis*. 2020. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(19\)30632-2](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(19)30632-2) PMID: 31859216
56. Fonseca MC, Sarmiento L, Resik S, Martínez Y, Hung LH, Morier L, et al. Coxsackievirus A6 and enterovirus 71 causing hand, foot and mouth disease in Cuba, 2011–2013. *Arch Virol*. 2014. <https://doi.org/10.1007/s00705-014-2071-x> PMID: 24719197
57. Böttcher S, Diedrich S, Keeren K. The Laboratory Network For Enterovirus Diagnostic LaNED. Increased detection of enterovirus A71 infections, Germany, 2019. *Euro Surveill*. 2019. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2019.24.39.1900556> PMID: 31576805
58. Böttcher S, Obermeier PE, Neubauer K, Diedrich S. Laboratory Network for Enterovirus Diagnostics. Recombinant Enterovirus A71 Subgenogroup C1 Strains, Germany, 2015. *Emerg Infect Dis*. 2016. <https://doi.org/10.3201/eid2210.160357> PMID: 27439117
59. Midgley SE, Nielsen AG, Trebbien R, Poulsen MW, Andersen PH, Fischer TK. Co-circulation of multiple subtypes of enterovirus A71 (EV- A71) genotype C, including novel recombinants characterised by use of whole genome sequencing (WGS), Denmark 2016. *Euro Surveill*. 2017. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2017.22.26.30565> PMID: 28681718
60. González-Sanz R, Casas-Alba D, Launes C, Muñoz-Almagro C, Ruiz-García MM, Alonso M, et al. Molecular epidemiology of an enterovirus A71 outbreak associated with severe neurological disease, Spain, 2016. *Euro Surveill*. 2019. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2019.24.7.1800089> PMID: 30782267
61. Ngangas ST, Lukashev A, Jugie G, Ivanova O, Mansuy JM, Mengelle C, et al. Multirecombinant Enterovirus A71 Subgenogroup C1 Isolates Associated with Neurologic Disease, France, 2016–2017. *Emerg Infect Dis*. 2019. <https://doi.org/10.3201/eid2506.181460> PMID: 31107209
62. Richter J, Tryfonos C, Christodoulou C. Molecular epidemiology of enteroviruses in Cyprus 2008–2017. *PLoS One*. 2019. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0220938> PMID: 31393960
63. Zeng H, Yi L, Chen X, Zhou H, Zheng H, Lu J, et al. Emergence of a non vaccine-cognate enterovirus A71 genotype C1 in mainland China. *J Infect*. 2021. <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2020.12.020> PMID: 33373653
64. Huang MC, Wang SM, Hsu YW, Lin HC, Chi CY, Liu CC. Long-term cognitive and motor deficits after enterovirus 71 brainstem encephalitis in children. *Pediatrics*. 2006. <https://doi.org/10.1542/peds.2006-1547> PMID: 17116698

65. Yip CC, Lau SK, Woo PC, Yuen KY. Human enterovirus 71 epidemics: what's next? *Emerg Health Threats J.* 2013. <https://doi.org/10.3402/ehj.v6i0.19780> PMID: 24119538
66. Chang LY, Lin HY, Gau SS, Lu CY, Hsia SH, Huang YC, et al. Enterovirus A71 neurologic complications and long-term sequelae. *J Biomed Sci.* 2019. <https://doi.org/10.1186/s12929-019-0552-7> PMID: 31395054
67. dos Santos GP, da Costa EV, Tavares FN, da Costa LJ, da Silva EE. Genetic diversity of Echovirus 30 involved in aseptic meningitis cases in Brazil (1998–2008). *J Med Virol.* 2011. <https://doi.org/10.1002/jmv.22235> PMID: 22012725
68. Farías A, Cabrerizo M, Ré V, Glatstein N, Pisano B, Spinsanti L, et al. Molecular identification of human enteroviruses in children with neurological infections from the central region of Argentina. *Arch Virol.* 2011. <https://doi.org/10.1007/s00705-010-0828-4> PMID: 20931249
69. Lukashev AN, Vakulenko YA. Molecular evolution of types in non-polio enteroviruses. *J Gen Virol.* 2017. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.000966> PMID: 29095688

5.1.5.

Artículo 5: “Hand-foot-and-mouth disease in Uruguay: Coxsackievirus A6 identified as causative of an outbreak in a rural childcare center”.

Año: 2020

Revista: Journal of Medical Virology

En este trabajo se documenta una serie de brotes de HFMD registrados durante 2018 en distintas localidades del departamento de Salto (Noroeste de Uruguay), incluyendo la ciudad de Salto (capital del departamento homónimo).

Este artículo fue realizado en el marco de un proyecto para estudiar los casos de HFMD que ocurrieran en nuestro país en el periodo 2018-2021, el cual fue elaborado de manera conjunta con referentes departamentales del Departamento de Vigilancia Epidemiológica del Ministerio de Salud Pública de Salto y Paysandú. El proyecto cuenta con el aval del Comité de Ética Institucional del Centro Universitario Regional Litoral Norte de la Universidad de la República (ANEXO 1). Entre el 1 de junio y el 9 de agosto de 2018, se reportaron 149 casos de niños afectados por HFMD en el departamento de Salto. El 60% de los casos se originó en escuelas o centros de cuidado infantil, involucrando tanto localidades urbanas como rurales.

Se obtuvieron muestras clínicas (hisopado de lesiones, o heces) de 7 niños (5 niños y 2 niñas) de entre ~ 1 y 4 años de edad, con diagnóstico clínico de HFMD que asistían a un centro de cuidado infantil localizado en Belén, una pequeña localidad rural situada a 90 km al norte de la ciudad de Salto cuya población es de 1.926 habitantes.

Los síntomas preponderantes en estos 7 casos fueron rash cutáneo y ampollas en manos, pies y boca, concomitantes con dolor a nivel de la boca y la garganta, y en general los niños manifestaron pérdida de apetito, y sus padres o tutores declararon ausencia de aumento de temperatura corporal.

La detección de enterovirus se realizó mediante RT-PCR dirigida a un segmento codificante de VP1, y los productos de PCR fueron secuenciados mediante el método de Sanger para identificar posteriormente mediante análisis filogenético, las variantes asociadas a este brote.

Se detectó coxsackievirus A6 en 5 de las 7 muestras consideradas.

Las secuencias de coxsackievirus A6 obtenidas en este estudio, presentaron mayor identidad nucleotídica con cepas reportadas entre 2014 a 2017 fuera del continente americano, que con cepas reportadas entre 2011 y 2016 en Latinoamérica (incluyendo cepas argentinas y brasileras). Se observaron distintos clados de coxsackievirus A6 circulando en Sudamérica, lo que implicaría simultáneas entradas en la región.

Si bien la mayoría de los reportes de HFMD son durante las estaciones más cálidas y húmedas, los casos documentados en Salto ocurrieron en la época más fría del año, coincidiendo con reportes de brotes de HFMD asociados a coxsackievirus A6 durante el invierno en Estados Unidos, Israel o Reino Unido.



RESEARCH ARTICLE

JOURNAL OF
MEDICAL VIROLOGY WILEY

Hand-foot-and-mouth disease in uruguay: Coxsackievirus A6 identified as causative of an outbreak in a rural childcare center

Andrés Lizasoain¹ | Sofia Piegas¹ | Matías Victoria¹ | Edson E. Da Silva² |
Rodney Colina¹

¹Laboratorio de Virología Molecular,
Departamento de Ciencias Biológicas,
Universidad de la República, Salto, Salto,
Uruguay

²Laboratório de Enterovírus, Fundação
Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brasil

Correspondence

Andrés Lizasoain and Rodney Colina, 1350
Gral Rivera St., 50000 Salto, Uruguay.
Email: alizasoain@unorte.edu.uy; andres.
lizoain.cuelho@gmail.com and
rodneycolina1@gmail.com

Funding information

Polos de Desarrollo Universitario* from
"Comisión Coordinadora del Interior" of
"Universidad de la República, Grant/Award
Number: 2010; Comisión Académica de
Posgrados-CAP of Universidad de la
República, Grant/Award Number: PhD
fellowship

Abstract

To know the epidemiological context of hand-foot-and-mouth disease (HFMD) in a region of Uruguay and to identify the Enterovirus responsible for an outbreak in a rural childcare center in 2018. Swab samples from skin lesions and/or stools samples were collected from children suffering HFMD during an outbreak in a rural childcare center. Samples were subject to viral RNA extraction and reverse-transcription polymerase chain reaction towards VP1 coding segment, to identify the Enterovirus type by sequencing and phylogenetic analysis. Total of 149 cases of HFMD affecting 98 boys and 51 girls were reported in Salto Province-Uruguay in 2018. Total 60% of the cases were originated from outbreaks, which occurred in ten educative and childcare institutions from both urban and rural areas. Coxsackievirus-6 (CV-A6) was identified as responsible for one of the rural outbreaks. Uruguayan strains were more related to strains reported in Russia, Turkey, and Germany (2014-2017) than to strains reported in Brazil and Argentina from 2015 to 2016. This is the first report of CV-A6-associated HFMD in Uruguay, evidencing a wide geographic range of the virus in the Latin American region. Our report also warns about CV-A6-associated HFMD during winter, contrarily to most reports that register HFMD during summer and fall seasons.

KEYWORDS

coxsackievirus < virus classification, enterovirus < virus classification, foot and mouth disease
virus < virus classification, hand

1 | INTRODUCTION

Hand-foot-and-mouth disease (HFMD) results of a common, acute, viral infection by some human enteroviruses members of the family *Picornaviridae*, genus *Enterovirus*¹ and affects mainly young children and infants, although adolescents and adults also can be susceptible.² It consists of a transient vesicular maculopapular rash involving hands, feet, and mouth, encompassing clinical manifestations of a mild viral illness, lasting for 7 to 10 days with no observable sequelae in most cases.³ HFMD is usually a self-limiting affection but rarely entails to neurological complications.⁴⁻⁶

The infection spreads among the population through direct contact with an infected individual (through oral-pharyngeal secretions or by direct contact with blisters), or via contaminated water or objects with respiratory secretions, blister fluid, and/or feces of infected individuals.⁷⁻⁹

The highly contagious character of the disease helps it to spread quickly in educative institutions where children are living together and in close contact several hours a day.¹⁰ This leads to the occurrence of outbreaks, which must be contained to mitigate the impact of the disease and prevent new infections.

Since the first report of the HFMD in Canada in 1958, sporadic cases and outbreaks of the disease have been reported worldwide.^{11,12}

Southeast Asia appears as the most affected region, for example, China has accounted between approximately 500 000 and a million of HFMD cases per year.¹³ Most of the worldwide cases has been associated to coxsackievirus A16 (CV-A16) and enterovirus A71 (EV-A71), both members of enterovirus species A. Enteroviruses target numerous organs, causing diseases at gastrointestinal, myocardial, respiratory, and central nervous systems (CNS) level, as a consequence of their broad cell tropism.¹⁴ These are nonenveloped viruses with icosahedral capsids containing a single-stranded RNA genome of approximately 7 kb in length.¹⁵ Different enterovirus types other than CV-A16 and EV-A71 also have been associated with HFMD but to a lesser extent. Nevertheless, since 2008 when a CV-A6 caused a series of HFMD cases in the Finnish population,¹⁶ the emergence of this enterovirus linked to cases of HFMD turned an important issue for the public health. In fact, CV-A6 is nowadays, identified among the predominant types causing HFMD.¹⁷ The CV-A6 is known to cause both pediatric and adult's outbreaks,^{10,18,19} and many reports have shown presentations of the disease with more severe symptoms than typical HFMD cases, indeed involving the CNS.^{20,21}

From several years ago, Uruguay registers cases of HFMD, but up to nowadays, the enterovirus types associated with the disease remain unknown due to the lack of studies in this regard. In this work, it was analyzed the epidemiological context of HFMD in a region of Uruguay, and CV-A16 was associated with an outbreak occurred in a rural childcare center in 2018.

2 | MATERIALS AND METHODS

2.1 | Context of the study

Salto Province is one of the 19 Provinces of Uruguay and is located in the Northwest region of the country, bordering with Argentina by means of the Uruguay River. Salto city (capital of Salto Province) is the second most populated city of the country after Montevideo (capital of Uruguay) with 104 028 inhabitants²² and is approximately 500 km from Montevideo and 600 km from Buenos Aires (capital from Argentina). An international bridge over the Uruguay River links the Salto city with Argentina.

Many small villages, such as Belén, San Antonio, or Palomas, belong to this Province and surround Salto city inside a radius of approximately 100 km (Figure 1).

All Uruguayan children have medical coverage through social security in public or private health provider institutions, which report the cases of the notifiable disease to the Department of Surveillance in Public Health from the Ministry of Public Health. The sanitary legislation related to notifiable diseases (National Decree Number 41/012) indicates that HFMD cases must be notifiable to the health public authority when at least two cases are registered in a period of 7 days (which would constitute a possible outbreak). There are not guidelines neither protocols in the country to determine the etiologic agent of these outbreaks.

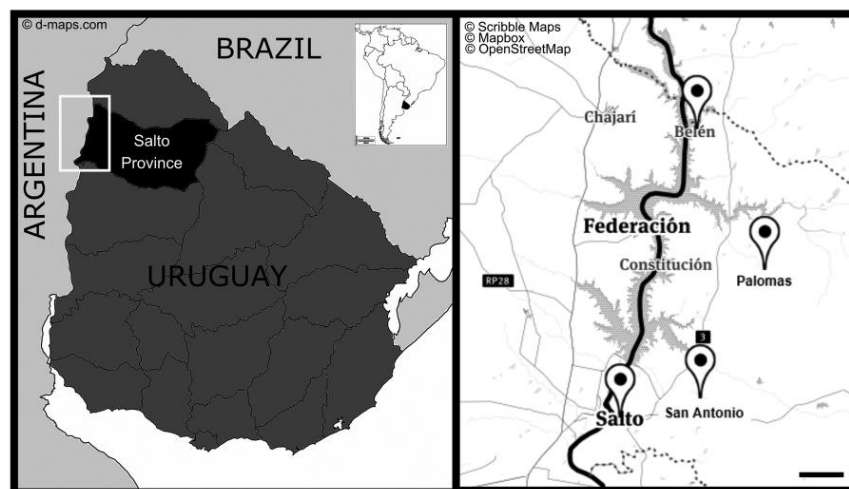


FIGURE 1 Geographic location of Salto city and the three rural villages that reported hand-foot-and-mouth disease outbreaks in schools (SCH) or childcare centers (CC) during 2018. The location of Salto Province (Uruguay), at the South American region, is shown in the left panel. The right panel shows an increased view of the region delimited by an unfilled rectangle in the left panel. Salto city (capital of Salto Province) and three rural villages are localizable by paddle signals. A dark black line represents the border between Argentina and Uruguay, and Uruguay River appears alongside this signal as a light gray area. The bar scale represents 10 kilometers in the map of the right panel. In Salto city occurred seven outbreaks in different CC-1 to CC-6 and in SCH-2. San Antonio and Paloma's villages reported outbreaks in CC-7 and in SCH-1, respectively. Belén village reported an outbreak in CC-8. Clinical samples of affected children in CC-8 were assayed in this study

2.2 | Sampling

Specimens were obtained from children clinically diagnosed with HFMD through a swab of skin lesions or directly from the stools. In all cases, samples were deposited in sterile tubes and maintained refrigerated on ice up to arrive at the Laboratory.

Information about clinical manifestations, its beginning, and duration, as well as age, sex, and the epidemiological context of the disease, was registered during a brief quiz posed to father, mother, or legal tutor of children.

A nurse was in charge of all procedures, which were performed at the participant home. Before giving the sample and answering the quiz, parents were informed about different aspects of the research, and about their rights as participants of a research with clinical human samples. After this, parents signed an informed consent form and received a copy of it.

2.3 | Elution of specimens

Each swab was poured in 500 µL of phosphate-buffered saline (PBS) 1X in 15 mL tubes and vortexed by 10 seconds. Eluted solution was collected in 1.5 mL tubes and was subject to RNA extraction immediately. A 10% fecal suspension with PBS 1X pH 7.2 was carried out with stools samples, which also was subject to RNA extraction.

2.4 | RNA extraction and complementary DNA synthesis

RNA was extracted from 140 microliters of swab eluates or fecal suspension with the QIAmp Viral RNA Mini Kit (Qiagen) obtaining 60 µL of final RNA extracted solution. Total 10 out of 60 µL were subject to complementary DNA synthesis by using the RevertAid Reverse Transcriptase (Thermo Fisher Scientific) and primers AN32, AN33, AN34, and AN35.²³

2.5 | Human enteroviruses detection by a polymerase chain reaction

Human enteroviruses detection was carried through a nested-polymerase chain reaction (PCR) towards a partial segment of the VP1 coding segment in the virus genome by using primers 222 and 224 (first round) and AN88 and AN89 (second round).²³ Second-round PCR products were resolved in 2% agarose gel, and expected-size bands (~350 bp) were excised from the gel and purified using the Quick Gel Extraction and PCR Purification Combo Kit (Invitrogen).

2.6 | Typification of positive cases by DNA sequencing

Macrogen Inc performed Sanger DNA sequencing, in forward and reverse senses with primers AN89 and AN88, respectively. Sequences were curated and assembled with BioEdit software²⁴ and were submitted to the Enterovirus Genotyping Tool²⁵ for type assignation. Sequences

obtained in this study were submitted to the GenBank database with the accession numbers [MK754259](#) to [MK754263](#).

2.7 | Phylogenetic analysis

Sequences from this study and sequences retrieved from the GenBank database of strains reported worldwide were aligned by the Clustal W program. MEGA 6.0 software²⁶ was used to construct a phylogenetic tree with the Neighbor Joining method under the Kimura 2-parameters as substitution nucleotide model. As a measure of the robustness of each node, the bootstrap method with 1000 pseudo-replicates was used. The phylogenetic tree was edited in FigTree program V1.2.

3 | RESULTS

Between 1 June and 9 August 2018, public and private health care services from Salto Province reported 149 cases of children with HFMD (98 boys and 51 girls). Total 60% of these cases (90 out of 149) has its origin in outbreaks that occurred in schools or childcare centers, located both in urban and rural areas. The remaining cases (59 out of 149) comprise 40 boys and 19 girls with ages ranging between 10 months and 7 years old. Table 1 shows the number of institutional outbreaks

TABLE 1 Hand-foot-and-mouth disease outbreaks in Salto Province-Uruguay, 2018

Institution	N° of affected individuals	Average ages (±SD)
CC-1	7	2 y 1 m (±4 m)
Urban	3(♂) 4(♀)	–
CC-2	20	2 y 4 m (±7 m)
Urban	13(♂) 7(♀)	–
CC-3	4	2 y 9 m (±6 m)
Urban	0(♂) 4(♀)	–
CC-4	21	2 y 1 m (±11 m)
Urban	13(♂) 8(♀)	–
CC-5	9	2 y 5 m (±11 m)
Urban	9(♂) 0(♀)	–
CC-6	4	2 y 7 m (±6 m)
Urban	2(♂) 2(♀)	–
CC-7	2	2 y 4 m (±10 m)
Rural	2(♂) 0(♀)	–
CC-8	10	2 y 1 m (±1 y 1 m)
Rural	7(♂) 3(♀)	–
SCH-1	4	5 y 7 m (±1 y)
Rural	1(♂) 3(♀)	–
SCH-2	9	2 y 1 m (±6 m)
Urban	8(♂) 1(♀)	–

Note: ♂, male; ♀, female.

Abbreviations: CC, childcare center; m, months old; SCH, school; y, years old.

reported, and summarizes the number of cases in each one, according to the sex, as well as the average ages of the affected children.

Clinical samples were obtained from seven of the 10 children affected in childcare center-8 (CC-8) (Table 2). This was the last reported outbreak and occurred in Belén village, which is located 90 km north to Salto city, coasting on the Uruguay River, with a rural population of 1926 inhabitants.²²

The CC-8 outbreak affected 10 children from 5 months to 2 years old, from August 2 to 9. All affected children were immunocompetent without a previous history of HFMD in their homes. Preponderant clinical manifestations were skin rash and blisters in hands, foot, and mouth accomplished of sores throat and mouth, and in general, a loss of appetite and fever absence (Table 2). Extension of clinical manifestations was on average a week and all cases evolve without complications.

Detection of human enterovirus by reverse-transcription-PCR confirmed the presence of the virus in samples from five children (Table 2) and sequencing revealed the circulation of the same strain (nucleotide identity of 100%). Submission of these sequences to the Enterovirus Genotyping Tool²⁵ allowed the identification of CV-A6. These sequences, together with sequences retrieved in a BLAST search with sequences of this study as query, and sequences of CV-A6 reported elsewhere, especially in countries of the Latin American region, were included in phylogenetic reconstruction (Figure 2).

Uruguayan sequences clustered with strong support, together with worldwide reported strains belonging to CV-A6. Particularly, Uruguayan strains formed a subcluster (97% of bootstrap support) together with strains reported in Russia (2014), Germany (2016-2017), and Turkey (2017). CV-A6 strains from Argentina, Brazil, and Cuba clustered outside of this group.

4 | DISCUSSION

This report constitutes the first characterization of the etiologic agent of HFMD in Uruguay, despite the first description of the disease in the country happened in 1973. Back then, authors hypothesized about the role of a CV-A, when isolated a virus from stools and blisters obtained from a 3 years old living in Montevideo-boy with symptoms of exanthema vesicular in palms and soles of feet, concomitant with enanthema vesicular in mucosa vestibular.²⁷

Up to nowadays, in the Latin American region, the HFMD has been scarcely studied and few reports shed light about the genetic diversity of the human enteroviruses responsible of outbreaks and sporadic cases of the disease.²⁸⁻³² In concordance with our results, recent reports from Argentina and Brazil have documented HFMD cases linked to CV-A6,³⁰⁻³² which demonstrates that this type is not only affecting European, Asiatic, and North American children, but also its emergence deserve attention by the public health systems of the Latin American region.

Different research groups have recently published different proposals for intratypic classification of CV-A6^{17,21,33,34} and there is no consensus yet about which one is the most appropriate one. Most of them employed the full-length VP1 coding segment to classify CV-A6

TABLE 2 Information about clinical manifestations and enterovirus detection in children from a rural childcare center (Belén Village, Salto Province-Uruguay), affected by an outbreak of hand-foot-and-mouth disease, in 2018

Individual	Sex	Age	Clinical manifestations							Specimen	Enterovirus detection	Enterovirus type
			Fever	Malaise	Sore throat	Sore mouth	Decreased appetite	Cold	Blisters	Skin rash		
A	♂	3 y 10 m	-	-	x	x	-	-	x	x	Swab lesions	Coxsackievirus A6
B	♀	3 y	-	-	x	x	x	-	x	x	Feces	Coxsackievirus A6
C	♀	2 y 9 m	-	x	-	-	x	-	x	x	Swab lesions	Coxsackievirus A6
D	♀	3 y 2 m	-	x	-	x	x	-	x	x	Swab lesions	Coxsackievirus A6
E	♀	1 y 4 m	-	-	x	x	x	-	x	x	Swab lesions	-
F	♀	2 y 3 m	-	-	-	x	-	-	x	x	Swab lesions	-
G	♀	2 y 1 m	x	x	x	x	x	x	x	x	Swab lesions	Coxsackievirus A6

Note: ♂, male; ♀, female.

Abbreviations: m, months old; y, years old.

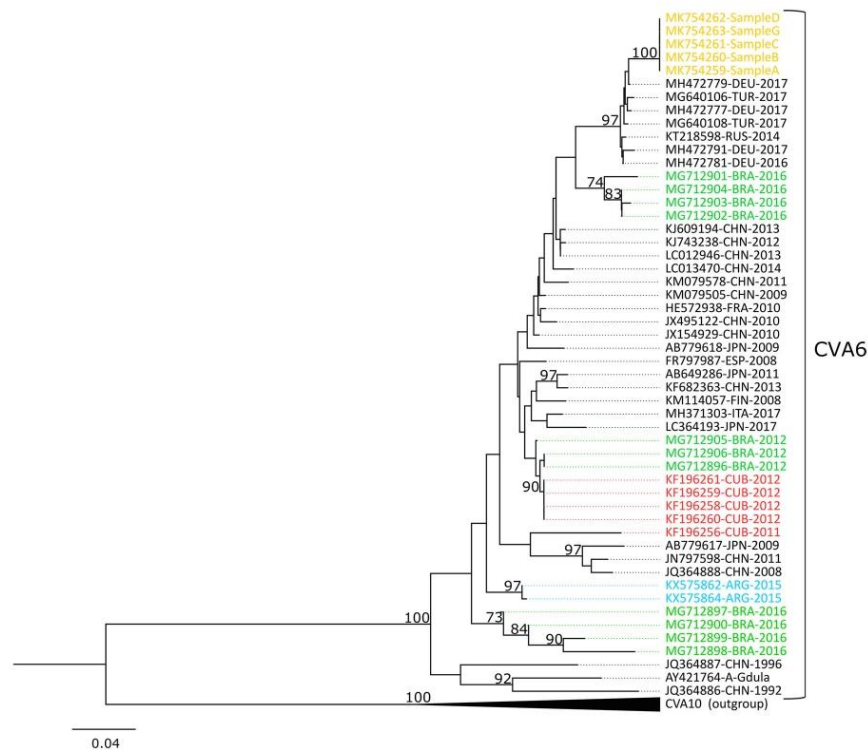


FIGURE 2 Phylogenetic analysis by Neighbor-Joining method constructed with partial sequences of VP1 of coxsackievirus A6 strains reported worldwide "Gdula" is the Reference strain for coxsackievirus A6. Only bootstraps values higher than 70% are shown at nodes. Strains are named by the Gene Bank accession number followed by the tree words-code of the country and year of detection. Uruguayan sequences of this study appear in yellow. Argentinian strains appear in light-blue, Brazilian strains in green and Cuban strains in red. Other strains reported worldwide are in black. Coxsackievirus A10 strains appear as a collapsed outgroup. The bar denotes the genetic distance

strains into cluster or lineages (and lower taxonomic units as sublineages), and demonstrated a high genetic diversity and different geographic expansion patterns for several of the proposed taxonomic units. In this study, we analyzed a partial segment of the VP1 coding segment (approximately 300 nucleotides) amplified with primers designed previously for broad target specificity in all the recognized enterovirus types.²³ This allowed the assignment of the correct type to Uruguayan strains and a comparison in a phylogenetic analysis with strains reported worldwide, without following any intratypic classificatory scheme. Longer fragments—including full-length genomes—would allow a more vast classification or study such features as recombination events, nevertheless, these objectives are beyond this report.

Coxsackievirus A6 Latin-American strains segregated into different clusters according to the country and the period in which were detected. Brazilian strains from 2016 formed two clusters with high bootstrap support. In addition, Argentinian and Cuban strains segregated also into unique clusters. Brazilian strains from 2012, clustered related to Cuban strains although with weak bootstrap support.

Uruguayan coxsackievirus A6 strains clustered related to European strains reported from 2014 to 2017. Nevertheless, the information about associated-disease for these strains remains unpublished, and relation with HFMD is specified only for Turkish strains from 2017 (MG640106 and MG640108).

Our phylogenetic analysis suggests that different clades of coxsackievirus A6 circulate in Latin America, and particularly in the South American region. This could be a consequence of different events of entry to this region from countries where coxsackievirus A6 has become predominant among the HFMD causing types.

Coxsackievirus A6 has emerged linked to severe and atypical forms of HFMD apart classical forms of the disease.^{10,19,34,35} Nevertheless, cases from CC-8 outbreak resemble more to classical symptomatology of HFMD. During this study, the follow up of children during the convalescent period was not carried out, and conditions, such as onychomadesis or skin desquamation (whose onsets often happen during this period in most of the atypical HFMD cases associated with CV-A6) could have appeared without being registered by this study.^{10,36,37}

Despite it has linked coxsackievirus A6 with only one of the ten outbreaks happened in Salto Province, the analysis of a sample collected from a child from CC-7 outbreak (Salto city) whose clinical manifestations started 4 days before the beginning of CC-8 outbreak, confirmed the same strain in both outbreaks (data not shown). This raises the possibility that those outbreaks from Salto city (urban area) were caused by coxsackievirus A6 also. Nevertheless, studying more samples from different outbreaks (including CC-7 outbreak) would be ideal to confirm CV-A6 not only in Belén village.

HFMD cases usually occur during summer and fall seasons.¹⁷ Nevertheless, the outbreaks reported here happened during the coldest months of the Uruguayan winter (June to August), which is in agreement with HFMD linked to CV-A6 cases accounted in winter, which were reported in the USA, Israel, and United Kingdom.³⁸⁻⁴⁰ This entails several complications for health care providers since during winters they are focused on mitigating the impact of the respiratory diseases in the pediatric population, and the emergence of HFMD during this season of the year raises additional efforts in human resources, planning, and budget. Further studies are needed to know the incidence of weather in patterns of spread and transmissibility of coxsackievirus A6 in Latin American countries, with the final aim to prepare the public health systems and strengthen the policies of prevention and care intended to the pediatric population.

In this work, we report a series of pediatric HFMD outbreaks in educative institutions from urban and rural areas in Salto Province (Uruguay) which took place during winter months in 2018. Additionally, we identified coxsackievirus A6 as the causative agent of at least one of the outbreaks accounted in rural areas. This work contributes to evidence the emergence of this pathogen causing HFMD in the Latin American region and constitutes the first report in the country characterizing the etiologic agent of HFMD, after more than forty years of presence of this disease in Uruguay.

ACKNOWLEDGMENTS

Authors acknowledge to Dr. Jonatan Lombardo from the "Red de Atención Primaria de la Administración de Servicios de Salud del Estado," who assured the involvement of the Department of Surveillance in Public Health from Salto in this study. Authors also are grateful with those pediatricians and Institutions that reported the HFMD cases to the surveillance system.

FUNDING INFORMATION

The program "Polos de Desarrollo Universitario" from "Comisión Coordinadora del Interior" of "Universidad de la República" supported this work. AL, MV, and RC receive financial support from "Sistema Nacional de Investigadores-SNI" of the "Agencia Nacional de Investigación e Innovación-ANII." AL also received financial support in the framework of his PhD studies from "Comisión Académica de Posgrados-CAP" of "Universidad de la República."

CONFLICT OF INTERESTS

The authors declare that there are no conflict of interests.

ETHICS STATEMENT

This article was written in the framework of the study: "Typification of Human Enteroviruses responsible for hand-foot-and-mouth disease cases in infantile population from Uruguay." The study has the approval of the Ethics Commission of the Centro Universitario del Litoral Norte, Universidad de la República, and was conducted in compliance with national laws and institutional guidelines and in accordance with the ethical standards of the Declaration of Helsinki.

ORCID

Rodney Colina  <http://orcid.org/0000-0003-3731-5383>

REFERENCES

1. Knowles NJ, Hovi T, Hyypia T, et al. Family *Picornaviridae*. In: King AMQ, Adams MJ, Carstens EB, Lefkowitz EJ, eds. *Virus Taxonomy: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. London: Academic Press; 2012:855-880.
2. Ramirez-Fort MK, Downing C, Doan HQ, et al. Coxsackievirus A6 associated hand, foot, and mouth disease in adults: clinical presentation and review of the literature. *J Clin Virol*. 2014;60(4):381-386. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2014.04.023>
3. Muehlenbachs A, Bhatnagar J, Zaki SR. Tissue tropism, pathology, and pathogenesis of enterovirus infection. *J Pathol*. 2015;235(2):217-228. <https://doi.org/10.1002/path.4438>
4. McMinn PC. An overview of the evolution of enterovirus 71 and its clinical and public health significance. *FEMS Microbiol Rev*. 2002;26(1):91-107.
5. Huang Y, Zhou Y, Lu H, et al. Characterization of severe hand, foot, and mouth disease in Shenzhen, China, 2009-2013. *J Med Virol*. 2015;87(9):1471-1479. <https://doi.org/10.1002/jmv.24200>
6. Long L, Xu L, Xiao Z, et al. Neurological complications and risk factors of cardiopulmonary failure of EV-A71-related hand, foot and mouth disease. *Sci Rep*. 2016;6:23444. <https://doi.org/10.1038/srep23444>
7. Sun L, Lin H, Lin J, et al. Evaluating the transmission routes of hand, foot, and mouth disease in Guangdong, China. *Am J Infect Control*. 2016;44(2):e13-e14. <https://doi.org/10.1016/j.ajic.2015.04.202>
8. Chan JH, Law C, Hamblion E, Fung H, Rudge J. Best practices to prevent transmission and control outbreaks of hand, foot, and mouth disease in childcare facilities: a systematic review. *Hong Kong Med J*. 2017;23(2):177-190. <https://doi.org/10.12809/hkmj166098>
9. Centers for Disease Control and Prevention. Hand, foot, and mouth disease (HFMD). Causes and transmission. Available from: <https://www.cdc.gov/hand-foot-mouth/about/transmission.html>. Accessed June 10, 2019.
10. Li J, Zhu R, Huo D, et al. An outbreak of coxsackievirus A6-associated hand, foot, and mouth disease in a kindergarten in Beijing in 2015. *BMC Pediatr*. 2018;18(1):277. <https://doi.org/10.1186/s12887-018-1253-1>
11. Robinson CR, Doane FW, Rhodes AJ. Report of an outbreak of febrile illness with pharyngeal lesions and exanthem: Toronto, summer 1957; isolation of group A coxsackie virus. *Can Med Assoc J*. 1958;79(8):615-621.
12. Ventarola D, Bordone L, Silverberg N. Update on hand-foot-and-mouth disease. *Clin Dermatol*. 2015;33(3):340-346. <https://doi.org/10.1016/j.clindermatol.2014.12.011>

13. Wang Y, Feng Z, Yang Y, et al. Hand, foot, and mouth disease in China: patterns of spread and transmissibility. *Epidemiology*. 2011;22(6):781-792. <https://doi.org/10.1097/EDE.0b013e318231d67a>
14. Lin JY, Shih SR. Cell and tissue tropism of enterovirus 71 and other enteroviruses infections. *J Biomed Sci*. 2014;21:18. <https://doi.org/10.1186/1423-0127-21-18>
15. Pallansch MA, Oberste MS, Whitton JL. Enteroviruses: polioviruses, coxsackieviruses, echoviruses and newer enteroviruses. In: Knipe DM, Howley PM, eds. *Fields Virology*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2013:490-530.
16. Österback R, Vuorinen T, Linna M, Susi P, Hyytiä T, Waris M. Coxsackievirus A6 and hand, foot, and mouth disease, Finland. *Emerg Infect Dis*. 2009;15(9):1485-1488. <https://doi.org/10.3201/eid1509.090438>
17. Bian L, Wang Y, Yao X, Mao Q, Xu M, Liang Z. Coxsackievirus A6: a new emerging pathogen causing hand, foot and mouth disease outbreaks worldwide. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2015;13(9):1061-1071. <https://doi.org/10.1586/14787210.2015.1058156>
18. Cabrerizo M, Tarragó D, Muñoz-Almagro C, et al. Molecular epidemiology of enterovirus 71, coxsackievirus A16 and A6 associated with hand, foot and mouth disease in Spain. *Clin Microbiol Infect*. 2014;20(3):O150-O156. <https://doi.org/10.1111/1469-0691.12361>
19. Broccolo F, Drago F, Ciccarese G, et al. Severe atypical hand-foot-and-mouth disease in adults due to coxsackievirus A6: Clinical presentation and phylogenesis of CV-A6 strains. *J Clin Virol*. 2019;110:1-6. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2018.11.003>
20. Yang F, Yuan J, Wang X, et al. Severe hand, foot, and mouth disease and coxsackievirus A6-Shenzhen, China. *Clin Infect Dis*. 2014;59(10):1504-1505. <https://doi.org/10.1093/cid/ciu624>
21. Xiao K, Duan L, Peng Y, et al. Epidemiologic features of enterovirus associated with hand, foot and mouth disease in 2013 and 2014 in Shenzhen, China. *Sci Rep*. 2019;9(1):3856. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-40402-2>
22. National Institute of Statistical. Censos 2011. Contame que te cuento. (Spanish) Available from: <http://www5.inecubuy/censos2011/resultados-finales/salto.html>. Accessed June 10, 2019.
23. Nix WA, Oberste MS, Pallansch MA. Sensitive, seminested PCR amplification of VP1 sequences for direct identification of all enterovirus serotypes from original clinical specimens. *J Clin Microbiol*. 2006;44(8):2698-2704.
24. Hall TA. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl Acids Symp Ser*. 1999;41:95-97.
25. Kroneman A, Vennema H, Deforche K, et al. An automated genotyping tool for enteroviruses and noroviruses. *J Clin Virol*. 2011;51(2):121-125. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2011.03.006>
26. Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Mol Biol Evol*. 2013;30(12):2725-2729. <https://doi.org/10.1093/molbev/mst197>
27. Perillo de Aguirrezabala M, Somma MP, Russi J, Campione J, Hortal M, Tosi HC. Maculopapular vesicular disease of hand, foot, and mouth. *First National Observation. Arch Pediatr Urug*. 1973;44:111-113.
28. Fonseca MC, Sarmiento L, Resik S, et al. Coxsackievirus A6 and enterovirus 71 causing hand, foot and mouth disease in Cuba, 2011-2013. *Arch Virol*. 2014;159(9):2451-2455. <https://doi.org/10.1007/s00705-014-2071-x>
29. Machain-Williams C, Dzúl-Rosado AR, Yeh-Gorocica AB, et al. Detection of hand, foot and mouth disease in the yucatan peninsula of Mexico. *Infect Dis Rep*. 2014;6(4):5627. <https://doi.org/10.4081/idr.2014.5627>
30. Cisterna DM, Lema CL, Martínez LM, et al. Atypical hand, foot, and mouth disease caused by coxsackievirus A6 in Argentina in 2015. *Rev Argent Microbiol*. 2019;51:140-143. <https://doi.org/10.1016/j.ram.2018.05.003>
31. Sousa IP Jr, Burlandy FM, Costa EV, Tavares FN, da Silva EE. Enteroviruses associated with hand, foot, and mouth disease in Brazil. *J Infect*. 2018;77(5):448-454. <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2018.08.012>
32. Sousa IP Jr, Burlandy FM, Tavares FN, da Silva EE. Enterovirus B74 associated with hand, foot, and mouth disease. *Infect Genet Evol*. 2018;65:15-17. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2018.07.011>
33. Lu J, Zeng H, Zheng H, et al. Hand, foot and mouth disease in Guangdong, China, in 2013: new trends in the continuing epidemic. *Clin Microbiol Infect*. 2014;20(7):O442-O445. <https://doi.org/10.1111/1469-0691.12468>
34. Anh NT, Nhu LNT, Van HMT, et al. Emerging coxsackievirus A6 causing hand, foot and mouth disease, Vietnam. *Emerg Infect Dis*. 2018;24(4):654-662. <https://doi.org/10.3201/eid2404.171298>
35. Horsten H, Kemp M, Fischer T, Lindahl K, Bygum A. Atypical hand, foot, and mouth disease caused by coxsackievirus A6 in Denmark: a diagnostic mimicker. *Acta Dermato Venereologica*. 2018;98(3):350-354. <https://doi.org/10.2340/00015555-2853>
36. Wei SH, Huang YP, Liu MC, et al. An outbreak of coxsackievirus A6 hand, foot, and mouth disease associated with onychomadesis in Taiwan, 2010. *BMC Infect Dis*. 2011;11:346. <https://doi.org/10.1186/1471-2334-11-346>
37. Feder HM Jr, Bennett N, Modlin JF. Atypical hand, foot, and mouth disease: a vesiculobullous eruption caused by coxsackie virus A6. *Lancet Infect Dis*. 2014;14(1):83-86. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(13\)70264-0](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(13)70264-0)
38. Flett K, Youngster I, Huang J, et al. Hand, foot, and mouth disease caused by coxsackievirus a6. *Emerg Infect Dis*. 2012;18(10):1702-1704. <https://doi.org/10.3201/eid1810.120813>
39. Ben-Chetrit E, Wiener-Well Y, Shulman LM, et al. Coxsackievirus A6-related hand foot and mouth disease: skin manifestations in a cluster of adult patients. *J Clin Virol*. 2014;59(3):201-203. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2013.12.012>
40. Sinclair C, Gaunt E, Simmonds P, et al. Atypical hand, foot, and mouth disease associated with coxsackievirus A6 infection, Edinburgh, United Kingdom, January to February 2014. *Euro Surveill*. 2014;19(12):20745.

How to cite this article: Lizasoain A, Piegas S, Victoria M, Da Silva E and Colina R. Hand-foot-and-mouth disease in uruguay: Coxsackievirus A6 identified as causative of an outbreak in a rural childcare center. *J Med Virol*. 2019;1-7. <https://doi.org/10.1002/jmv.25590>

5.1.6.

Artículo 6: “Coxsackievirus A10 causing hand-foot-and-mouth disease in Uruguay”.

Año: 2020

Revista: International Journal of Infectious Diseases

Los datos publicados en este Case report son apenas una parte de los resultados obtenidos del estudio de una epidemia de HFMD que tuvo lugar en 2019 en el Departamento de Paysandú (Noroeste de Uruguay).

El reporte describe un caso de HFMD asociado a un coxsackievirus A10, el cual sería el primer registro de este serotipo causando dicha enfermedad en Sudamérica. La identificación del mismo fue posible mediante la obtención de una muestra de hisopado de lesiones en la piel de una niña de 15 meses de edad, residente en Paysandú, que manifestó malestar generalizado, faringitis, y dolorosas ampollas a nivel oral y peri-oral, las cuales también se hicieron visibles en la región dorsal de manos y plantas de pies, así como en las regiones perineal e inguinal. Todo ello luego de un contacto cercano con un hermano tres años mayor, que asistía a un centro educativo afectado por la epidemia que tuvo lugar en Paysandú, y que había sido diagnosticado clínicamente con la enfermedad.

La detección de este coxsackievirus A10 se realizó mediante la aplicación de una RT-PCR genérica para enterovirus, dirigida a una región parcial codificante de VP1. Se obtuvo dicha secuencia mediante el método de Sanger, y se caracterizó mediante análisis filogenético junto a cepas del virus reportadas mundialmente. Se logró identificar a la cepa causante del caso en cuestión, como miembro del linaje C, el cual fue caracterizado hace más de diez años en Europa a partir del estudio de brotes de HFMD.

Con el objetivo de conocer el origen del coxsackievirus A10 detectado, realizamos una inferencia filogenética Bayesina escalada en el tiempo, para 162 cepas del linaje C, reportadas entre 2006 y 2019, en conjunto con una reconstrucción ancestral de locaciones epidémicas. Estos análisis sugieren que el linaje C se podría haber originado en torno al año 2004 (95% Highest Probability Density [HPD]: 1988–2006), y que Finlandia y Rusia podrían ser dos fuentes principales de dispersión epidémica a nivel global.

En cuanto al ingreso del linaje C al continente americano, probablemente ello sucedió en al menos tres oportunidades distintas, una de ellas a través de nuestro país en el año 2017 (95% HPD: 2015–2018).



Contents lists available at ScienceDirect

International Journal of Infectious Diseases

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

Short Communication

Coxsackievirus A10 causing hand-foot-and-mouth disease in Uruguay

Andrés Lizasoain^{a,1}, Daiana Mir^{b,1}, Natalia Martínez^{c,d}, Rodney Colina^{a,*}^a Laboratorio de Virología Molecular, Departamento de Ciencias Biológicas, Centro Universitario Regional del Litoral Norte, Universidad de la República, 1350 Gral. Rivera St, 50000, Salto, Uruguay^b Unidad de Genómica y Bioinformática, Departamento de Ciencias Biológicas, Centro Universitario Regional del Litoral Norte, Universidad de la República, 1350 Gral. Rivera St, 50000, Salto, Uruguay^c Corporación Médica de Paysandú-COMEPA, 1224 Colón St, 60000, Paysandú, Uruguay^d Residente de Pediatría, Clínica Pediátrica A, Centro Hospitalario Pereira Rossell, Universidad de la República, 1550 Gral. Artigas Blvd, 11600, Montevideo, Uruguay

ARTICLE INFO

Article history:

Received 10 January 2020

Received in revised form 10 February 2020

Accepted 11 February 2020

Keywords:

Phylogeny

Coxsackievirus

HFMD

Enterovirus

Epidemic

Ancestral character reconstruction

ABSTRACT

We report for the first time in South America an HFMD case associated with Coxsackievirus A10. The viral strain belongs to a lineage involved in important European outbreaks and probably entered Uruguay after 2017 with a Greek origin. These findings call for strengthening the regional surveillance of HFMD.

© 2020 The Authors. Published by Elsevier Ltd on behalf of International Society for Infectious Diseases. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Hand-foot-and-mouth disease (HFMD) is an acute viral disease with high incidence in humans younger than five years old, characterized by a vesicular exanthema, mostly in hands, feet, and oral mucosa, which is associated with the infection by different Human Enteroviruses, mainly Coxsackievirus (CV) A6, A10, A16 and Enterovirus A71 (Esposito and Principi, 2018). During an outbreak of this disease in which at least 179 children from Paysandú Province – Uruguay were affected (between April and June 2019), we sampled 46 clinical specimens, without any bias, from the total of cases reported to the local Public Health authorities during this epidemic. A pediatrician registered epidemiological and clinical information of each of the 46 studied cases, after each outpatient consultation and an interview with parents. This information was matched with throat or skin-lesion swabbing of affected individuals. Parents, as legal guardians of children, also signed informed written consent to participate in this study, and were informed about ethical aspects of the research and about their rights as participants in research with humans. One of the 46 individuals was a girl (15 months old) who got ill

after close contact with her three year-old brother, who attends one childcare center involved in the large outbreak herein described. The brother had manifested HFMD symptoms since three days before her and no one in the family had travel history outside Uruguay. The body temperature of the girl, during the course of HFMD symptoms never exceeded 98.6 °F (according to information provided by parents). Preponderant symptoms included malaise, pharyngitis, and painful oral and perioral blisters, which were also present in the dorsal region of hands and soles of feet. Similar blisters were observed in the perineal and inguinal regions. The girl recovered from HFMD without complications at the sixth day after the beginning of symptoms. Following a PCR protocol for Human Enteroviruses characterization (Nix et al., 2006), a Coxsackievirus A10 strain (CVA10) was detected from the girl's skin-lesion swab (GenBank accession number **MN689742**). This was the only case associated with CVA10 during the outbreak, while CVA6 and CVA16 were detected in most of the analyzed samples. CVA10 is a member of the Human Enterovirus species A (Genus *Enterovirus*, Family *Picornaviridae*). Despite its early association with HFMD during the 1960s (Duff, 1968), this virus became an emerging cause of the disease during the last ten years, correlating in some cases with severe forms of HFMD, including neurological complications (Bian et al., 2019). Knowledge about the presence of CVA10 in the Americas is limited to

* Corresponding author.

E-mail address: rodneycolina1@gmail.com (R. Colina).¹ These first authors contributed equally to this work.<https://doi.org/10.1016/j.ijid.2020.02.012>1201-9712/© 2020 The Authors. Published by Elsevier Ltd on behalf of International Society for Infectious Diseases. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

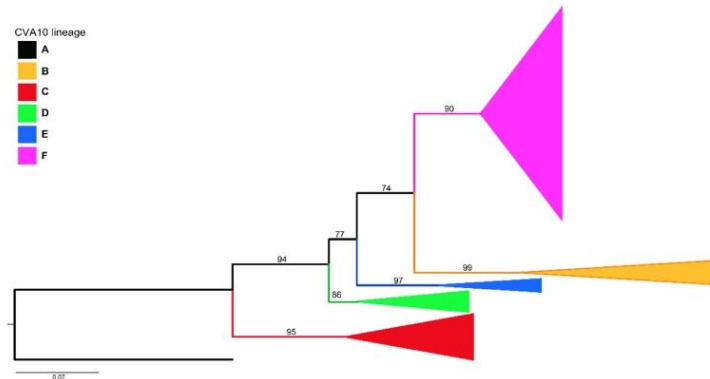


Figure 1. Maximum likelihood phylogenetic tree of all Coxsackievirus A10 (CVA10) strains with known sampling date and location, available in GenBank by September 2019. For a better understanding, each cluster appears collapsed and differently colored representing distinct CVA10 genetic lineages as indicated at the legend (top left). Percentage Shimodaira-Hasegawa-like local support values are shown for key nodes estimated from 1,000 resamples. All horizontal branch lengths are drawn to a scale of nucleotide substitutions per site. The Uruguayan strain clustered with 161 lineage C strains detected worldwide. The tree was constructed from 1,317 sequences corresponding to a partial segment of 303 nucleotides in the viral capsid coding region.

some reports from North America (Prill et al., 2018), and as far as we know, it has not been associated with HFMD in South America. Six genetic lineages (A to F) have been described for CVA10 (Bian et al., 2019). Through a maximum-likelihood based phylogenetic analysis using FastTree 2.1 (Price et al., 2010) under the GTR evolutionary model, we characterized the CVA10 Uruguayan strain as member of the lineage C (CVA10_C) (Figure 1). Despite CVA10_C being involved in large outbreaks in Europe ten years ago (Blomqvist et al., 2010; Mirand et al., 2012), lineage F (CVA10_F) drove the emergence of CVA10 associated with HFMD in the Pacific-Asia region and seems predominant in the current global epidemiology of CVA10 associated with HFMD (Bian et al., 2019). Aiming to unveil the origin of the CVA10 Uruguayan strain

responsible for the HFMD case reported here, we focused our study in CVA10_C, from its emergence in Europe up to its arrival in Uruguay. To this end, we performed a time-scaled Bayesian phylogenetic inference on 162 CVA10_C partial VP1-gene sequences (sampled between 2006–2019), coupled with an ancestral character reconstruction (ACR) of epidemic locations produced by PASTML using Marginal Posterior Probabilities Approximation (MPPA) with an F81-like model (Ishikawa et al., 2019). The results suggest that the CVA10_C lineage likely originated at around 2004 (95% Highest Probability Density [HPD]: 1988–2006), and although the location of the CVA10_C root is unresolved, PastML predictions suggest Finland and Russia as the two main sources of global epidemic ignition. In the American region in turn, three

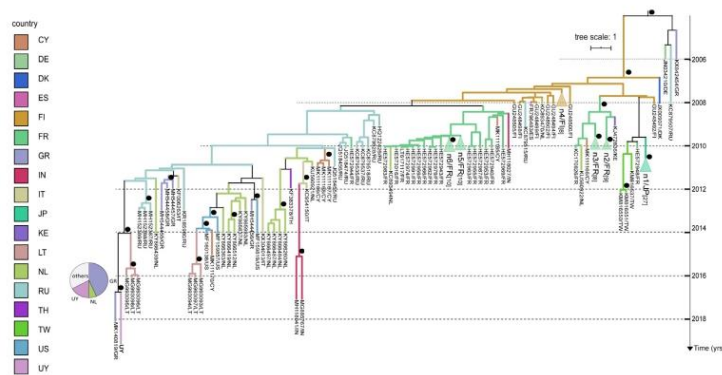


Figure 2

Figure 2. Ancestral geographical reconstruction of Coxsackievirus A10 lineage C partial VP1-gene sequences (162 sequences, 303 nucleotides in length) based on a time-scaled Bayesian phylogenetic tree. Internal tree branches are colored according to the most probable location state of their ancestral nodes (legend at left). Ancestral nodes with high posterior probability support (clade credibility ≥ 0.8) are indicated with dark full circles. Black branches indicate unresolved ancestral nodes. For a better understanding, some clusters appear collapsed with the number of sequences indicated in brackets. All horizontal branch lengths are drawn to a scale of years. The tree is automatically rooted under the assumption of a relaxed molecular clock. The pie chart displayed at the Uruguayan strain ancestral node shows the marginal probabilities of every location state for that ancestor. Country names are abbreviated according to the two-letter country codes.

introductions of the CVA10_C lineage were inferred. The first two gave origin to the aforementioned North America's reports and the third one originated the Uruguayan strain herein reported. The phylogenetic and MPPA inference suggest that the introduction to Uruguay could be a recent event (2017 [95% HPD: 2015–2018]) most likely of Greek origin [ACR country marginal probability: 0.43] (Figure 2). More in depth genetic studies and a better surveillance at a global level would provide higher certainty to inferences here discussed. This CVA10-associated-HFMD case in South America raises concern about the CVA10 role in the account of new HFMD cases and outbreaks in a wider geographic range than previously recognized, and calls to strengthen the surveillance in a region in where Human Enteroviruses are sub-reported.

Funding

This work was supported by the "Programa Polos de Desarrollo Universitario" from Universidad de la República.

Ethical statement

This study was approved by the Ethics Commission of the Centro Universitario Regional del Litoral Norte, Universidad de la República (EXP. 311170-001310-19), and was conducted in accordance with The Code of Ethics of the World Medical Association (Declaration of Helsinki) for experiments involving humans.

Conflict of interest statement

None.

Acknowledgments

We are grateful to Néilda Rodríguez-Osorio and Gonzalo Bello for a critical reading of this article. We also thank local health public authorities from Paysandú Province, who collaborated with us providing data during the HFMD outbreak.

References

- Bian L, Gao F, Mao Q, Sun S, Wu X, Liu S, et al. Hand, foot, and mouth disease associated with coxsackievirus A10: more serious than it seems. *Expert Rev Anti Infect Ther* 2019;17(4):233–42. doi:http://dx.doi.org/10.1080/14787210.2019.1585242.
- Blomqvist S, Klemola P, Kaijalainen S, Paananen A, Simonen ML, Vuorinen T, et al. Co circulation of coxsackieviruses A6 and A10 in hand, foot and mouth disease outbreak in Finland. *J Clin Virol* 2010;48(1):49–54. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.jcv.2010.02.002.
- Duff MF. Hand-foot-and-mouth syndrome in humans: coxsackie A10 infections in New Zealand. *Br Med J* 1968;2(5606):661–4. PubMed PMID: 5658411.
- Esposito S, Principi N. Hand, foot and mouth disease: current knowledge on clinical manifestations, epidemiology, aetiology and prevention. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2018;37(3):391–8. doi:http://dx.doi.org/10.1007/s10096-018-3206-x.
- Ishikawa SA, Zhukova A, Iwasaki W, Gascuel O. A fast likelihood method to reconstruct and visualize ancestral scenarios. *Mol Biol Evol* 2019;36(9):2069–85. doi:http://dx.doi.org/10.1093/molbev/msz131.
- Mirand A, Henquell C, Archimbaud C, Ughetto S, Antona D, Bailly JL, et al. Outbreak of hand, foot and mouth disease/herpangina associated with coxsackievirus A6 and A10 infections in 2010, France: a large citywide, prospective observational study. *Clin Microbiol Infect* 2012;18(5):E110–8. doi:http://dx.doi.org/10.1111/j.1469-0691.2012.03789.x.
- Nix WA, Oberste MS, Pallansch MA. Sensitive, seminested PCR amplification of VP1 sequences for direct identification of all enterovirus serotypes from original clinical specimens. *J Clin Microbiol* 2006;44(8):2698–704. doi:http://dx.doi.org/10.1128/JCM.00542-06.
- Price MN, Dehal PS, Arkin AP. FastTree 2—approximately maximum-likelihood trees for large alignments. *PLoS One* 2010;5(3):e9490. doi:http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0009490.
- Prill MM, Dahl RM, Midgley CM, Chern SW, Lu X, Feikin DR, et al. Severe respiratory illness associated with rhinovirus during the enterovirus D68 outbreak in the United States, August 2014–November 2014. *Clin Infect Dis* 2018;66(10):1528–34. doi:http://dx.doi.org/10.1093/cid/cix1034.

5.2. Datos preliminares para un artículo en construcción (Artículo 7)

5.2.1. Descripción de la epidemia de HFMD reportada en Paysandú (Uruguay) en 2019

Más allá de este Case Report, restan publicarse los resultados acerca de la caracterización de la epidemia de HFMD que ocurrió en Paysandú en 2019, los cuales se detallan a continuación.

Entre los meses de abril y junio de 2019, la dirección departamental de Salud de Paysandú (Ministerio de Salud Pública) recibió la notificación de 179 casos de HFMD ocurridos en todo el departamento.

Fue posible acceder a 48 muestras clínicas de 46 de estos individuos.

La obtención de cada muestra, estuvo acompañada por el llenado del formulario-ficha epidemiológica que se utilizó en Lizasoain et al. (2020a).

El procedimiento para la obtención de la muestra, su procesamiento para la detección de enterovirus, y la secuenciación de los casos positivos se detalló previamente también en dicho artículo.

Los diferentes tipos de muestras clínicas obtenidas desde los 46 individuos se detallan a continuación:

- 2 muestras de heces
- 34 muestras de hisopados faríngeos
- 12 muestras de hisopados de lesiones/ampollas/líquido

Los 46 individuos se distribuyeron de la siguiente manera:

- 25 de sexo masculino y 21 de sexo femenino
- 34 casos provenían de instituciones educativas o de cuidado y 12 casos no tenían nexo conocido con brotes en instituciones
- Edades comprendidas entre 9 meses y 12 años (promedio 3 años +/- 2 años)

Del total de muestras procesadas, se detectó enterovirus en el 69% (33/48) y la tipificación fue posible en el 87,8% (29/33) de estas.

Las 29 muestras tipificadas correspondieron a los siguientes enterovirus:

- Coxsackievirus A10: 1 muestra
- Coxsackievirus A16: 8 muestras
- Coxsackievirus A6: 20 muestras

A continuación, se detallan las características de los cuadros clínicos según el sexo de los individuos, para el total de casos estudiados, así como desglosadas para los distintos coxsackievirus y para los casos considerados sin tipificar (Tabla 2). Dicha información fue recabada por un médico pediatra durante la consulta ambulatoria, mediante una entrevista con padres o tutores legales de los niños.

Tabla 2. Manifestaciones clínicas de los casos de enfermedad manos-pies-boca estudiados durante el brote ocurrido en Paysandú-Uruguay en 2019, según tipo de enterovirus detectado, y discriminando por sexo

	TOTAL (n=46)			Coxsackievirus A6 (n=20)			Coxsackievirus A16 (n=8)			Coxsackievirus A10 (1)		Sin tipificar (17)		
	total	masculinos	femeninos	total	masculinos	femeninos	total	masculinos	femeninos	total	femenino	total	masculinos	femeninos
Fiebre	46	25	21	20	10	10	8	3	5	1	1	17	12	5
Malestar general	34	18	16	18	8	10	5	2	3	1	1	10	8	2
Dolor de garganta	19	10	9	10	4	6	4	3	1	1	1	4	3	1
Inapetencia	24	11	13	10	4	6	5	2	3	1	1	8	5	3
Tos/moco/resfriado	16	9	7	5	2	3	4	3	1	1	1	6	4	2
Ullas/ampollas en manos, pies, boca	12	8	4	3	1	2	3	2	1	0	0	6	5	1
Manchas rojas en manos, pies, boca	38	23	15	19	9	10	5	3	2	0	0	14	11	3
Lesión en piel de otras partes del cuerpo	28	16	12	12	5	7	6	3	3	1	1	9	8	1
Dolor en lesiones orales	17	6	11	7	3	4	2	0	2	0	0	8	3	5
	18	9	9	7	1	6	3	3	0	1	1	7	5	2

5.2.2. Comparación de variantes detectadas mediante el estudio de muestras clínicas y de agua residual

A continuación, se integran en distintos análisis filogenéticos, las cepas de los tres coxsackievirus detectadas a nivel clínico durante el estudio de brotes de HFMD ocurridos en Uruguay, conjuntamente con las variantes de estos serotipos que fueron detectados en muestras de agua residual durante esta tesis y secuenciadas mediante el método de Sanger o mediante *next-generation sequencing*

Para el caso de coxsackievirus A10, las cepas detectadas en el agua residual en las distintas ciudades de Uruguay y Argentina, se incorporaron al árbol filogenético previamente realizado durante el reporte del primer caso de HFMD asociado a este serotipo en Sudamérica y descrito en Lizasoain et al. (2020b) (Figura 15).

Para coxsackievirus A16 y A6 fueron contruidos nuevos árboles filogenéticos (Figura 16 y Figura 17, respectivamente) luego de haber obtenido de la base de datos de Genbank, todas aquellas secuencias de estos serotipos utilizando los términos de búsqueda “coxsackievirus A6” y “coxsackievirus A16”.

Una vez obtenido cada set de secuencias, ambos fueron alineados mediante la herramienta MAFFT v7 (Kato et al. 2019), y los alineamientos fueron acotados al fragmento codificante de VP1 que amplificamos tanto a partir de muestras de agua residual como clínicas en esta tesis.

Se descartaron secuencias sin información disponible sobre país y fecha de detección, así como también fueron descartadas secuencias idénticas mediante la herramienta CD-HIT (Li & Godzik, 2006).

En ambos casos, se redujo el número de secuencias de aquellos países con mayor aporte de secuencias, utilizando la herramienta CD-HIT y un cut-off de 0.98 (esto contribuyó principalmente a disminuir el número de secuencias provenientes de China). Ambos pasos de CD-HIT se realizaron una vez que se inspeccionaron árboles filogenéticos preliminares contruidos con los datasets completos.

Las secuencias de coxsackievirus A6 y A16 obtenidas durante el estudio de brotes de HFMD en Uruguay, fueron incorporadas a estos alineamientos, junto a secuencias obtenidas mediante *next-generation sequencing* a partir del estudio de agua residual de las ciudades uruguayas de Bella Unión, Salto, Paysandú y Fray Bentos, así como de Córdoba y Buenos Aires en Argentina (todas ellas obtenidas en el marco de esta tesis). También se incorporaron secuencias obtenidas de GenBank provenientes de países de la región latinoamericana (las cuales podían haber sido descartadas en los pasos de CD-HIT previos, pero que por su origen geográfico nos parecía interesante recuperar para el análisis).

Los alineamientos fueron utilizados para construir árboles filogenéticos de máxima verosimilitud mediante FastTree v2.1 software (Price et al. 2010), utilizando el modelo de sustitución de nucleótidos General Time Reversible (GTR). El soporte estadístico de cada rama, en cada árbol, se estimó mediante un approximate likelihood-ratio test (aLRT) (Anisimova & Gascuel, 2006), basándose en un procedimiento del tipo Shimodaira-Hasegawa (Shimodaira & Hasegawa, 2001). Los árboles filogenéticos fueron visualizados y editados en FigTree v1.4.3.

Las secuencias de coxsackievirus A10 obtenidas mediante *next-generation sequencing* a partir de muestras de agua residual colectadas en Uruguay y en Córdoba (Argentina), se agruparon en dos clados distintos dentro del linaje C (linaje reportado previamente en Uruguay a partir del estudio de un caso de HFMD ocurrido en Paysandú en 2019), y en un clado dentro del linaje epidémico asiático F (Figura 15).

Uno de los clados del linaje C, incluyó secuencias obtenidas a partir de muestras colectadas en 2017 en Bella Unión y en Salto, que agruparon junto a secuencias europeas y de Estados Unidos reportadas en el periodo 2008-2016 (aLRT-SH=0.8) (Figura 15, ANEXO 4). El otro clado, incluyó secuencias obtenidas a partir de muestras colectadas en 2017 en Córdoba (Argentina), y en 2011 en Fray Bentos (Uruguay). La topología del árbol permite inferir que probablemente, estos clados sean introducciones independientes del linaje C en nuestra región, con respecto a la introducción de la variante responsable del caso de HFMD reportado en Paysandú en 2019 (Figura 15, ANEXO 4).

La presencia del linaje F en nuestra región se evidenció por la detección de variantes uruguayas cuyas secuencias agruparon junto a variantes de Estados Unidos, Rusia, Australia y China reportadas entre 2014 y 2017 (aLRT-SH=0.92). Este es uno de los dos clusters dentro del linaje F que evidencia la dispersión del mismo hacia fuera de Asia, siendo el restante, un cluster formado por secuencias españolas, francesas, y eslovacas reportadas entre 2007 y 2010 (aLRT-SH=0.82) (Figura 15, ANEXO 4).

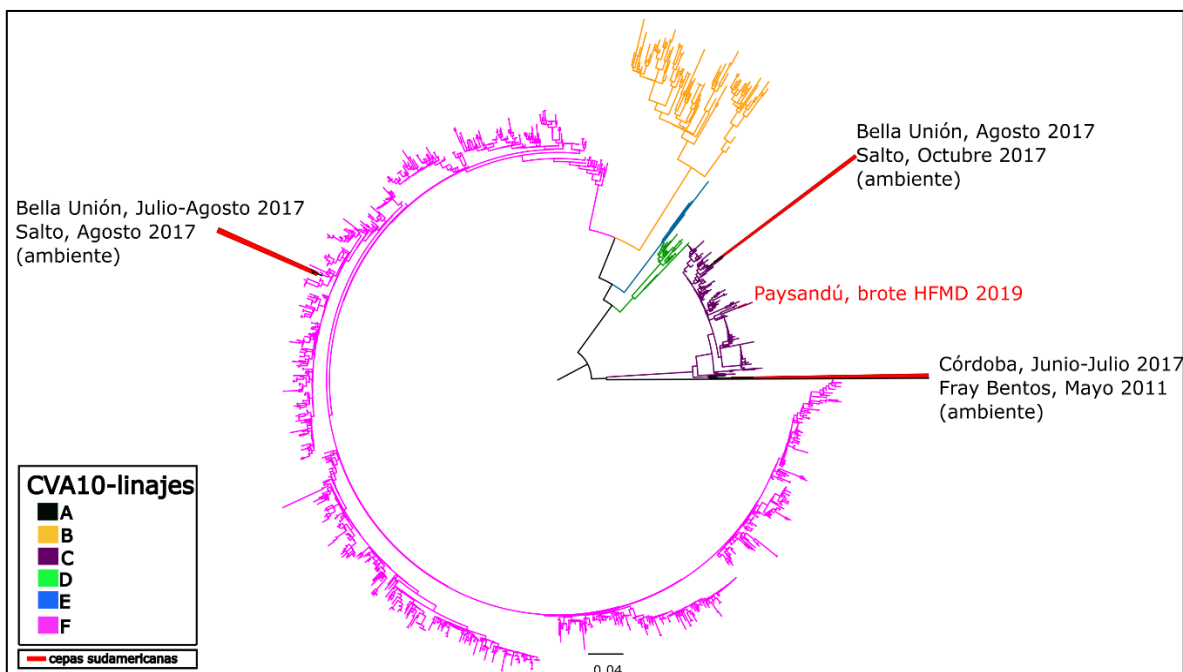


Figura 15. Árbol filogenético de máxima verosimilitud construido con secuencias nucleotídicas correspondientes a un fragmento genómico codificante para VP1 de 1,325 cepas reportadas globalmente, de los seis linajes de coxsackievirus A10. Cada linaje está definido por valores de aLRT-SH >70. Se señala con barras rojas las secuencias obtenidas en esta tesis, indicando ciudad y fecha de detección. La barra en la parte inferior indica distancia genética. El árbol fue enraizado por su punto medio. El ANEXO 4 de esta tesis provee del archivo original del árbol filogenético en formato Nexus.

Todas las secuencias de coxsackievirus A16 obtenidas en el marco de esta tesis, ya sea desde muestras de agua residual de Uruguay o de Argentina, como a partir de muestras clínicas correspondientes al brote de HFMD ocurrido en Paysandú en 2019, agruparon con cepas reportadas globalmente del linaje denominado B3, entre las que se incluyen cepas reportadas desde Brasil y Perú (Figura 16). Los 8 casos de HFMD tipificados como coxsackievirus A16 durante el estudio del brote de HFMD ocurrido en Paysandú en 2019 agruparon conjuntamente con variantes reportadas en Brasil en 2012 y 2016. Por otro lado, las secuencias uruguayas obtenidas a partir de muestras de agua residual colectadas en el marco de esta tesis en 2011-2012, agruparon juntas, incluyendo a una secuencia de Córdoba detectada en una muestra ambiental en marzo de 2011, y estuvieron estrechamente relacionadas con variantes francesas y rusas reportadas durante el mismo periodo. En este cluster, encontramos secuencias obtenidas por el método de Sanger y reportadas en Lizasoain et al. (2018) (las cuales aparecen precedidas por su número de acceso a GenBank e identificadas como uruguayas por "URY"). Nótese la estrecha distancia genética entre estas secuencias y las obtenidas mediante *next-generation sequencing* para las ciudades uruguayas (Figura 16, ANEXO 5).

Las secuencias argentinas de coxsackievirus A16 obtenidas en el marco de esta tesis a partir de muestras de agua residual colectadas en 2011-2012 en Córdoba y en 2011 en Buenos Aires agruparon juntas con un aLRT-SH=0.94 separándose del resto de las secuencias sudamericanas, lo cual podría indicar un evento de

introducción del virus en la Argentina seguido por una amplia dispersión geográfica del mismo (Figura 16, ANEXO 5).

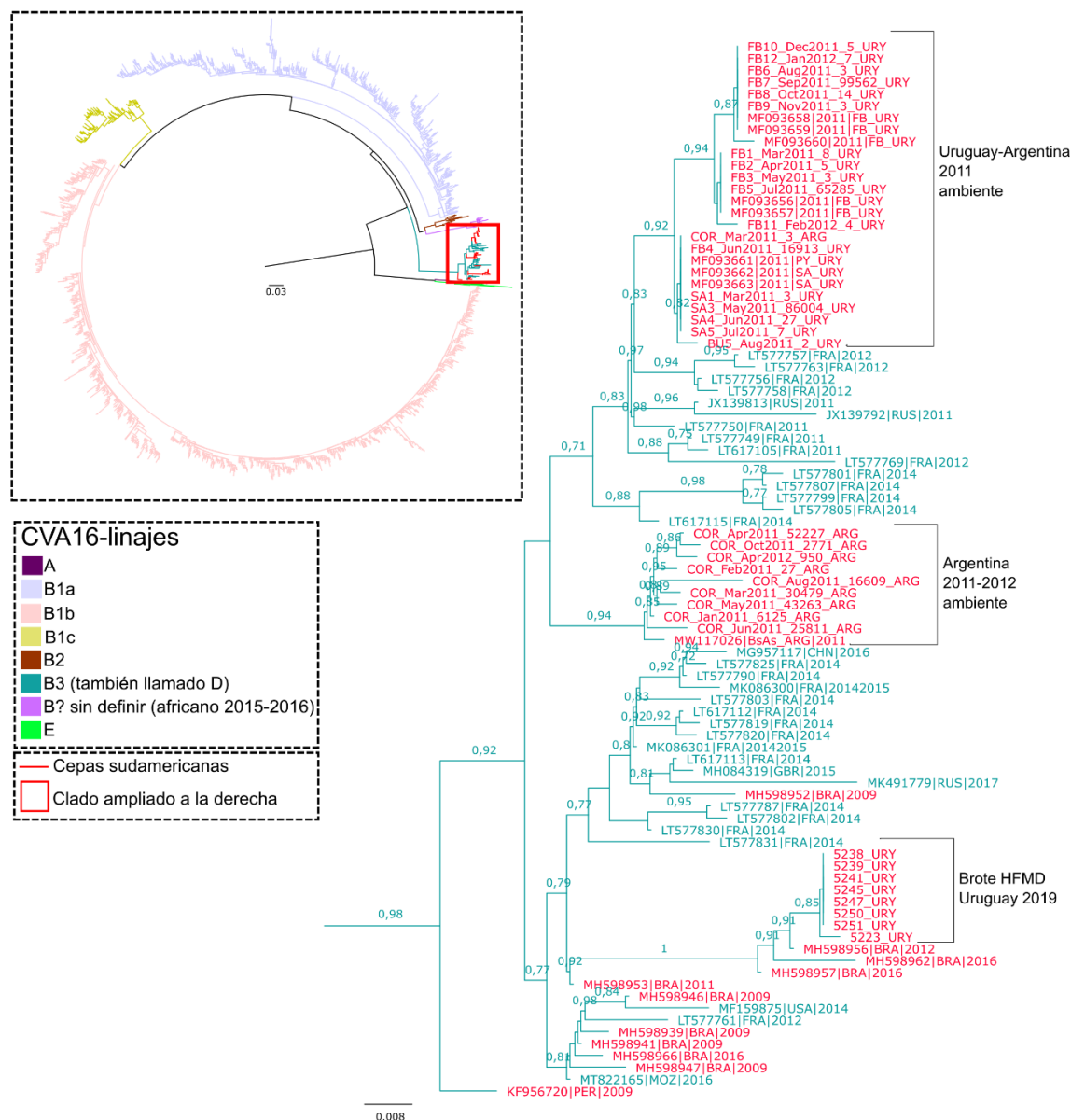


Figura 16. Árbol filogenético de máxima verosimilitud construido con secuencias nucleotídicas correspondientes a un fragmento genómico codificante para VP1 de 2.203 cepas reportadas globalmente, de los tres linajes de coxsackievirus A16 (linajes A, B y E) (izquierda) y ampliación del sublinaje B3 (derecha). Tanto linajes como sublinajes están definidos por valores de aLRT-SH >70. Las ramas coloreadas de rojo indican las secuencias reportadas en Sudamérica. La barra en la parte central del árbol indica distancia genética. El árbol fue enraizado por su punto medio. Un cuadrante rojo señala la porción del árbol que se amplía a la derecha, donde se observa el clado correspondiente al sublinaje B3 (también llamado D). Los valores de aLRT-SH > 0.7 son mostrados en las ramas, las secuencias sudamericanas aparecen en rojo, y aquellas obtenidas en el marco de esta tesis se señalan con llaves rectas negras. La barra al pie del clado ampliado indica distancia genética. El ANEXO 5 de esta tesis provee del archivo original del árbol filogenético en formato Nexus.

Las secuencias de coxsackievirus A6 reportadas desde países latinoamericanos entre 2010 y 2019 pertenecen a los sublinajes D1, D2, y D3 (Figura 17).

A excepción de un par de secuencias obtenidas a partir de muestras de agua residual colectadas en Córdoba en 2011 que agruparon junto a cepas del sublinaje D1 reportadas a nivel global, el resto de las secuencias de coxsackievirus A6 obtenidas en el marco de esta tesis, segregaron en distintos clados dentro del sublinaje D3 (Figura 17).

La evidencia más antigua de la presencia de este sublinaje en la región, la constituye un clado en el que agruparon secuencias obtenidas a partir de muestras de agua residual colectadas en Córdoba en 2012, junto con secuencias obtenidas desde brotes de HFMD reportados en Brasil y en Cuba en 2012 y 2013, respectivamente, y secuencias de distribución global del periodo 2009-2015 (aLRT-SH=0.81) (Figura 17, ANEXO 6).

Por otro lado, la evidencia más reciente de este sublinaje está dada por las secuencias obtenidas a partir de los brotes de HFMD ocurridos en Uruguay en 2018 y 2019, los cuales segregaron en dos clusters distintos. Uno de ellos comprende exclusivamente variantes provenientes del brote de Paysandú reportado en 2019, y el otro comprende algunas variantes detectadas durante este brote, así como variantes reportadas durante el brote de 2018 que ocurrió en Salto.

El cluster de secuencias formado exclusivamente a partir de variantes del brote de 2019 comparte un nodo (aLRT-SH=0.98) con secuencias obtenidas por *next-generation sequencing* a partir de muestras de agua residual colectadas en Uruguay en mayo de 2017 y enero de 2018, junto a secuencias reportadas en India en 2013 y 2018, en Australia en 2016, en China y Japón en 2017, en Estados Unidos en 2018, y en distintos países europeos en 2017-2018 (ANEXO 6).

El cluster de secuencias provenientes tanto del brote de Paysandú de 2019 como del brote de Salto de 2018, se integró además por secuencias reportadas por otros autores en 2018 desde Venezuela, Brasil y Argentina, y por secuencias reportadas en Europa entre 2014 y 2018, así como en Rusia en 2014-2017, Turquía y China en 2017, y Estados Unidos en 2018, así como por secuencias obtenidas por nosotros mediante *next-generation sequencing* de muestras de agua residual colectadas en Córdoba en julio de 2017 y febrero de 2018 (aLRT-SH=0.84) (Figura 17, ANEXO 6). Es de destacar también, un tercer cluster, en el que se encuentran secuencias obtenidas por nosotros a partir de muestras de agua residual de Córdoba y de Uruguay colectadas en 2017 y 2018, respectivamente, las cuales se relacionaron estrechamente con secuencias obtenidas durante el estudio de brotes de HFMD ocurridos en Argentina en 2015 y en Brasil en 2016 (aLRT-SH=0.86) (Figura 17, ANEXO 6).

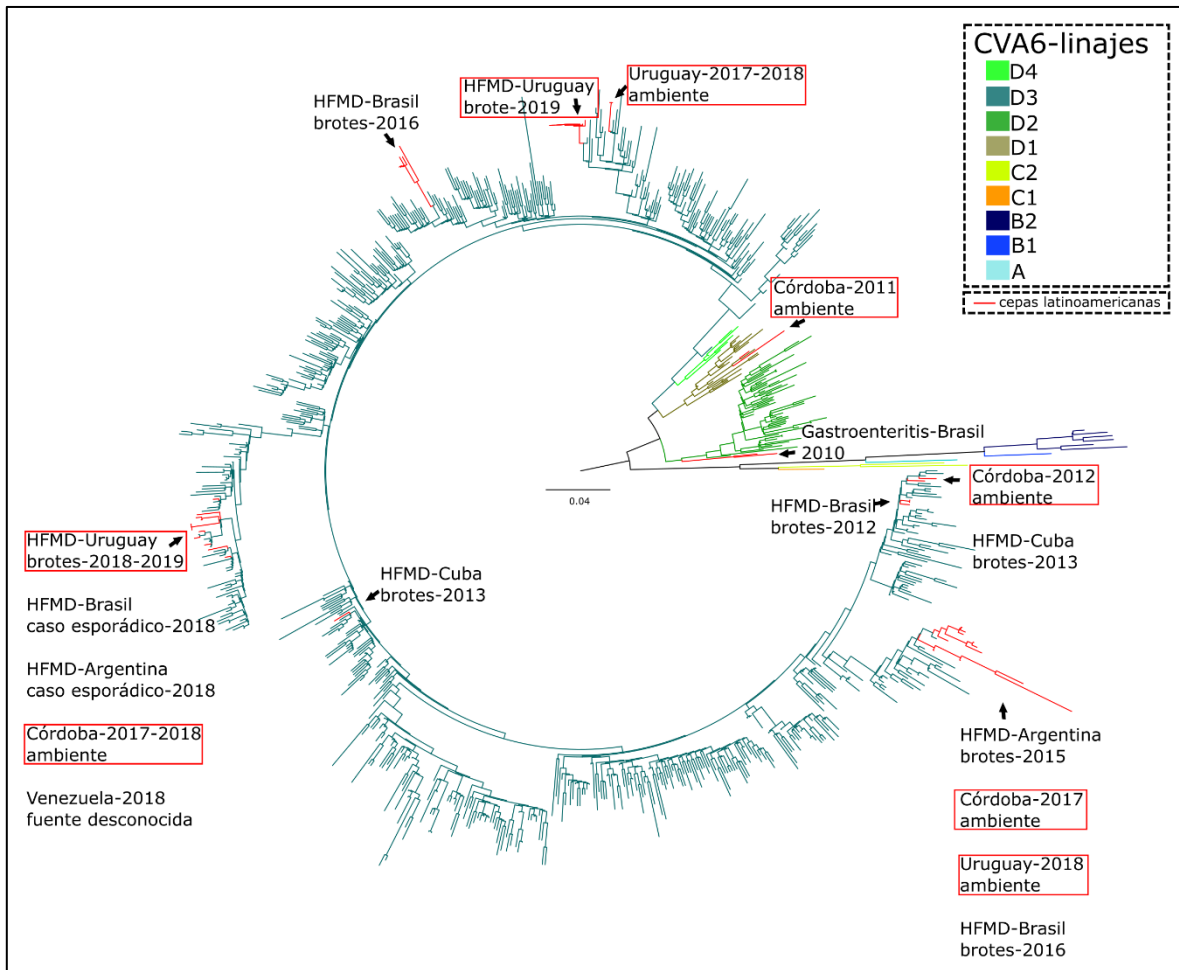


Figura 17. Árbol filogenético de máxima verosimilitud construido con secuencias nucleotídicas correspondientes a un fragmento genómico codificante para VP1 de 885 cepas reportadas globalmente, de los cuatro linajes (y sublinajes) de coxsackievirus A6 (linajes A, B, C y D). Tanto linajes como sublinajes están definidos por valores de aLRT-SH >70. Las ramas que representan variantes detectadas en Latinoamérica aparecen coloreadas en rojo. La barra en la parte central del árbol indica distancia genética. El árbol fue enraizado por su punto medio. Pequeñas flechas negras indican clados donde se encuentran variantes latinoamericanas. La fecha y país de las variantes secuenciadas en el marco de esta tesis, ya sea desde muestras de agua residual o muestras clínicas obtenidas durante brotes de enfermedad manos-pies-boca (HFMD), aparecen encuadrados en rojo, próximos a los clados que contienen dichas variantes. El ANEXO 6 de esta tesis provee del archivo original del árbol filogenético en formato Nexus.

6. DISCUSION

En las siguientes secciones se realizará una discusión global acerca de los resultados más relevantes que han sido incluidos en los distintos artículos que se desprenden de esta tesis, así como sobre algunos aspectos generales de la realización de la misma.

En primer lugar, se discutirán algunos aspectos metodológicos sobre el abordaje de virología ambiental en el cual se basó gran parte del proyecto de tesis, para luego discutir los resultados acerca de la diversidad de enterovirus que se evidenció a partir del estudio de las muestras de agua residual de Uruguay y Argentina, y de muestras clínicas provenientes de casos de HFMD obtenidas durante epidemias reportadas en Uruguay en 2018-2019.

6.1. Sobre el abordaje metodológico en el cual se basó esta tesis para describir la diversidad de enterovirus a partir de muestras de agua residual

Gran parte de los resultados obtenidos en esta tesis, provienen de la aplicación de una misma metodología de detección y caracterización mediante RT-PCR, *next-generation sequencing* y análisis filogenético, a distintas muestras de agua residual colectadas en el marco de distintos proyectos llevados a cabo por distintos grupos de investigación de Argentina y Uruguay.

En general, el estudio de estas muestras fue realizado de manera retrospectiva, ya que se trataba de colecciones de muestras que los laboratorios habían adquirido en periodos anteriores. A excepción de las muestras de agua residual colectadas en Uruguay en 2017-2018, las cuales fueron específicamente colectadas para el proyecto de esta tesis, el resto se colectó originalmente con distintos propósitos al de estudiar enterovirus.

La totalidad de muestras de agua residual evaluadas durante esta tesis comprende:

- Muestras de Uruguay (Lizasoain et al. 2021a): cada muestra consiste de 100 ml de agua residual (o de agua de una cañada que recibe el efluente de una laguna de estabilización de agua residual en el caso de la ciudad de Bella Unión), que fue concentrada mediante un método de adsorción-elución a una membrana cargada negativamente hacia un volumen de 1 ml (método modificado a partir del propuesto por Katayama et al. (2002) y modificado por Haramoto et al. (2009).
- Muestras de Buenos Aires (Lizasoain et al. 2021b): cada muestra consiste de 44 ml de agua residual que fue concentrada mediante un método de ultracentrifugación (Pina et al. 1998) en un volumen de 1 ml.
- Muestras de Córdoba (Lizasoain et al. 2021c): cada muestra consiste de 1,5 litros de agua residual que fue concentrada mediante un método de precipitación con polietilenglicol hacia un volumen de 15 ml, tal como es descrito en Masachessi et al. (2018).

Al analizar los resultados que fueron obtenidos mediante un mismo abordaje de detección por RT-PCR y *next-generation sequencing* aplicado a los distintos

conjuntos de muestras (ANEXO 2), es evidente que este abordaje tuvo distintas performances dependiendo del tipo de muestra que se estudiaba.

La diferencia más grande radica en el alto rendimiento que mostraron las muestras de Córdoba (Lizasoain et al. 2021c) con respecto a las de Uruguay (Lizasoain et al. 2021a) y de Buenos Aires (Lizasoain et al. 2021b).

Sumando las 32 muestras de Córdoba, se obtuvo luego de todos los pasos de filtrado de *reads*, un total 670 OTUs (3.668.631 *reads*), de las cuales 591 OTUs (3.587.962 *reads*) mapearon con algún enterovirus en nuestra base de secuencias de referencia. Esto demuestra que el proceso de amplificación fue altamente específico para enterovirus, ya que apenas un 2.2% del total de *reads* que superaron los distintos filtros de calidad no correspondía a enterovirus (ANEXO 3). Por otro lado, para las 10 muestras de Buenos Aires, la suma de OTUs fue de 52 (1.120.661 *reads*), de las cuales 37 OTUs (1.078.633 *reads*) mapearon con enterovirus, lo que representa un 96% en término de *reads* mapeados entre el total de *reads* que superaron el filtrado por calidad (ANEXO 3).

En cambio, al considerar las 50 muestras positivas para enterovirus de Uruguay, estas comprenden un total de 480 OTUs (5.400.035 *reads*), de las cuales apenas 184 OTUs (3.634.257 *reads*) mapearon con enterovirus, lo cual representa un 67% en término de *reads* (ANEXO 3). Este 33% de *reads* que no mapearon con enterovirus, corresponden a 296 OTUs, que al ser corroboradas mediante la herramienta BLAST resultaron secuencias de otros microorganismos, principalmente procariotas, o secuencias sin similitud significativa con las secuencias disponibles en GenBank (no mostrado).

Los distintos tipos de muestras, también presentaron distinta performance en cuanto al número de OTUs que mapearon con enterovirus. Mientras que para Córdoba mapearon con enterovirus unas 18 OTUs por muestra, para Buenos Aires y Uruguay, en promedio fueron 4 OTUs por muestra las que mapearon (ANEXO 3).

Además, mientras que se detectaron hasta 16 enterovirus distintos por muestra en Córdoba (promedio=8), en Buenos Aires y en Uruguay se detectaron hasta 7 tipos distintos (promedio=3 en cada conjunto de muestras).

Considerando que el abordaje de *next-generation sequencing* de amplicón justamente fue elegido para poder discernir la diversidad de enterovirus en las muestras de agua residual, y, que otros estudios han mostrado que estas muestras contienen una gran diversidad de tipos, y han logrado describir la presencia de hasta 60 tipos diferentes en una única muestra (Brinkman et al. 2017, Jofret et al. 2018, Majumdar et al. 2018a), el rendimiento de las muestras de Buenos Aires y de Uruguay, podría mejorarse para incrementar el número de enterovirus detectado por muestra.

Brinkman et al. (2017) reportaron que gran parte de los *reads* procedentes de *next-generation sequencing* de amplicones obtenidos mediante RT-PCR con cebadores pan-enterovirus (los cuales comparten gran parte de su secuencia con los cebadores que nosotros utilizamos) desde muestras de agua residual, resultaron en apenas unas pocas secuencias de enterovirus, y muchas secuencias de fagos. Postularon que VP1 no era una región eficiente para la tipificación de enterovirus desde agua residual, recomendando el tratamiento con DNAsa sobre el material extraído desde la muestra, como un paso previo a la obtención del amplicón y su

secuenciación. De hecho, con fines de reducir el número de *reads* inespecíficos que se obtienen en experimentos de *next-generation sequencing* de muestras ambientales para caracterizar virus, se han propuesto distintas posibilidades como la clarificación de las muestras mediante utilización de filtros, tratamientos con DNAsa, centrifugación, entre otros (Kim et al. 2015, Fernández-Cassi et al. 2017). Considerando que aproximadamente 1/3 de los *reads* obtenidos en las muestras uruguayas, no mapeó con enterovirus (Lizasoain et al. 2021a), la elección de alguno de estos tratamientos aplicado a los concentrados virales podría mejorar la eficiencia de la metodología.

Anteriormente, se describió que la composición de una comunidad viral observada en una muestra de agua residual, es influenciada por el método de concentración escogido (Hjelmsø et al. 2017), lo que nos lleva a suponer que probablemente, para aquellas muestras que, luego de su concentración, conserven genomas virales (así como también de procariotas) que puedan ser blanco de amplificaciones inespecíficas por los cebadores que utilizamos para la detección de enterovirus, perderemos profundidad de secuenciación específica para enterovirus, generando secuencias que luego serán filtradas y descartadas (secuencias de fagos por ejemplo).

Cuando analizamos las muestras de Buenos Aires (Lizasoain et al. 2021b), encontramos que el porcentaje de *reads* inespecíficos fue bajo (4%), sin embargo, se detectó en promedio la misma cantidad de enterovirus por muestra que en Uruguay. Esto podría sugerir que la detección de un menor número de enterovirus por muestra depende de distintos factores, más allá de la pérdida de eficiencia por amplificaciones inespecíficas.

Si bien la observación de una mayor cantidad de enterovirus en las muestras de Córdoba podría deberse simplemente a una mayor diversidad de enterovirus circulando en su población, en comparación con lo que circula en las poblaciones de Buenos Aires y de las ciudades de Uruguay, esto es quizás lo menos probable por tratarse de contextos socio-económicos, sanitarios, e incluso, epidemiológicos, no muy diferentes entre ambos países.

Probablemente el volumen inicial colectado de agua residual, y el factor de concentración que se alcanza mediante el método de concentración elegido, tengan una influencia importante en la cantidad de tipos de enterovirus detectados.

Si bien es difícil hacer una comparación entre los diferentes abordajes que se han publicado, parecería que algunas características de los mismos, podrían llegar a incidir en la sensibilidad para descifrar la diversidad de enterovirus contenida en las muestras de agua residual. En primer lugar, tanto el volumen inicial de muestra, como el método y el factor por el cual la muestra es llevada a un volumen menor buscando concentrar las partículas virales presentes en la muestra original, parecería incidir en la capacidad de detectar múltiples y diversos tipos virales en cada muestra (Majumdar et al. 2021, Shaw et al. 2021). No obstante, también parecería importante, la fracción que se toma del concentrado para realizar la extracción de ARN que luego será sobre la cual se amplificarán los genes de enterovirus. Por ejemplo, si bien Brinkman et al. (2017) concentraron 1 litro de agua residual en un factor de ~30 hasta obtener 30 ml, toman un tercio de este concentrado (10 ml) para obtener el ARN de cada muestra, y posiblemente esta

gran fracción que utilizan como molde de amplificación sea en parte los que les aseguró la detección de más de 80 tipos durante su muestreo.

Por supuesto que otras características de los diferentes estudios, como la posibilidad de obtener muestras compuestas a partir de alícuotas tomadas en diferentes momentos del día en vez de muestras obtenidas en colectas puntuales (*grab samples*), o la utilización de PCRs de un único round, entre otras, puedan jugar un papel clave en la diversidad de tipos detectados en cada muestra ensayada.

Un factor no menor, es que los cebadores utilizados sean ampliamente reactivos para la gran diversidad de enterovirus que existen. En esta tesis han sido utilizados los cebadores diseñados por Nix et al. (2006), que son recomendando por el CDC y la OMS para la vigilancia de enterovirus a nivel clínico (World Health Organization, 2015), y fueron evaluados en su momento para una gran diversidad de cepas prototipo. Sin embargo, han transcurrido unos 15 años desde que Nix et al. publicaran su trabajo. Desde entonces se han descrito nuevos enterovirus (Ayukekbong et al. 2013, Piralla et al. 2013). Por lo tanto, podría haber algunos tipos, (específicamente aquellos más nuevos), que estuvieran escapando a la detección por parte de los cebadores que utilizamos.

Bisseux et al. (2020) y Tao et al. (2020) han utilizado también la combinación de cebadores que fue utilizada en nuestra estrategia, para secuenciar mediante *next-generation sequencing* los amplicones obtenidos desde ARN extraído de muestras de agua residual colectada en Francia y en China, respectivamente, detectando algunos enterovirus de manera adicional a los reportados por nosotros, como CVA14, CVA20, CVB6, EV-A89, EV-A119, EV-B78, EV-C109, E20, E25, E27 y E33. Ello demuestra que la diversidad de tipos que puede ser detectada con los cebadores 222-224 y AN89-AN88 no se limita únicamente a la reportada por nosotros. Sin embargo, hemos revisado las secuencias de dichos cebadores, encontrando varios *mismatches* con secuencias de aquellos enterovirus que han sido más recientemente descubiertos, tanto a nivel de la región degenerada como de la región no degenerada de cada cebador CODEHOP (no mostrado), lo cual podría llevar a la posibilidad de que haya enterovirus en nuestras muestras de agua residual que no pudieron ser identificados porque los cebadores fallaron en su amplificación. Sería oportuno revisar la utilidad de los cebadores de Nix et al. (2006) para la detección de varios enterovirus, que están siendo reportados por otros estudios que emplean diferentes estrategias de amplificación.

Más allá de las distintas performances que obtuvimos con nuestro abordaje para los distintos tipos de muestras analizadas, las distintas limitaciones que nuestro estudio presenta, e incluso la existencia de algunos aspectos que deberán ser reformulados en futuros abordajes, la estrategia que empleamos para obtener gran parte de los resultados de esta tesis, nos permitió identificar y estudiar una gran diversidad de enterovirus en Uruguay y Argentina, y en ello se basa la discusión de las siguientes secciones.

6.2. Sobre la diversidad de enterovirus humanos detectados en muestras de agua residual de Uruguay y Argentina

En esta tesis se reporta la detección de un total de 47 enterovirus distintos, a partir del estudio de aguas residuales colectadas en Uruguay (Lizasoain et al. 2018, 2021a) y en Argentina (Lizasoain et al. 2021b, 2021c) durante distintos periodos. En mucho de los casos, se trata de la primera vez que se reportan algunos de estos tipos en ambos países, o incluso en la región de América del Sur.

Aunque desde Argentina se han publicado, varios artículos describiendo por ejemplo, el rol de echovirus 30 en los casos de meningitis que ocurren en el país (Palacios et al. 2002, Farías et al. 2011, Lema et al. 2019), así como se han realizado estudios de tipificación de enterovirus a partir de muestras clínicas provenientes de individuos con variados cuadros clínicos relacionados a enterovirus (Mistchenko et al. 2006, Cisterna et al. 2007), e incluso se han realizado algunos estudios de vigilancia ambiental (Cisterna et al. 2008, Farías et al. 2018, 2019), no hay datos publicados en base a una vigilancia activa, que sea sostenida en el tiempo, desde los cuales se puedan comprender los patrones de circulación de los enterovirus en la población argentina; mucho menos estos datos existen para Uruguay.

Al desconocer estas características, los resultados que hemos obtenido por un lado aportan conocimiento sobre las variantes que potencialmente pueden llegar a estar afectando la salud de la población, pero, por otro lado, al haber sido detectadas en aguas residuales, sin una asociación clara con lo que sucede a nivel de la consulta médica en ambos países, dificulta establecer cuán relevante es la detección de su circulación en la comunidad. Sin embargo, ya sea por contar con un historial de detección desde el ámbito médico en nuestros países, o en base a la importancia que los sistemas de vigilancia de otros países le han dado a la detección de determinadas variantes, es que hemos dirigido el esfuerzo por estudiar en profundidad la circulación de algunos tipos sobre otros.

Más allá de la relevancia que los enterovirus aquí reportados pueden tener para la salud de la población argentina y uruguaya, esta tesis constituye un importante aporte a la descripción de la diversidad genética de los enterovirus que circulan en nuestra región. Durante esta tesis, se obtuvieron unas 800 secuencias nucleotídicas de enterovirus humanos (en forma de OTUs), lo cual excede ampliamente el número de secuencias sudamericanas de enterovirus no polio que podían ser obtenidas desde distintas bases de datos hasta el momento, según los reportes de Lukashev et al. (2018) y Brown et al. (2020).

6.2.1. Enterovirus de la especie A

Con respecto a la especie A, muchos de los miembros de esta especie fueron por lo general detectados en una baja abundancia en cada muestra colectada en Córdoba, con la excepción del periodo marzo-junio de 2011 cuando se evidenció un incremento en la abundancia de coxsackievirus A16 con respecto a los demás enterovirus presentes en cada muestra (Lizasoain et al. 2021c). También en Buenos Aires, se evidenció la presencia de coxsackievirus A16 en una muestra colectada

en mayo de 2011 (Lizasoain et al. 2021b). En Uruguay, la mayoría de los enterovirus de la especie A se detectaron de manera esporádica en las muestras de agua residual. No obstante, coxsackievirus A16 fue detectado consistentemente durante todo el muestreo de 2011-2012 (Lizasoain et al. 2021a). Interesantemente, más allá de la predominancia que este virus tuvo principalmente en 2011 (tanto en Córdoba como en Uruguay), ya no fue detectado durante 2017-2018. A su vez, mientras muchos de los enterovirus de la especie A que fueron detectados en baja frecuencia en 2011-2012 en Córdoba, continuaron circulando del mismo modo en 2017-2018 (Lizasoain et al. 2021c), a diferencia de lo que sucedió en Uruguay, donde varios de los tipos que se detectaron en 2011-2012 no se volvieron a detectar en 2017-2018 (CVA2, CVA3, CVA4, CVA16, y EVA90) (Lizasoain et al. 2021a). No obstante, en las muestras uruguayas de este último periodo, se detectaron algunos tipos que no habían sido detectados previamente, o comenzaron a detectarse con mayor frecuencia (CVA5, CVA6, CVA10).

Además de estar principalmente asociados a la HFMD, (y a algunos de ellos nos referiremos más adelante en esta discusión), y haber sido reportados previamente desde el estudio de brotes y casos esporádicos de esta enfermedad en distintos países de la región (Sousa et al. 2018b, Cisterna et al. 2019), en particular, los miembros de esta especie, apenas aparecen en los reportes que existen a nivel clínico en Argentina (Cisterna et al. 2007). Sin embargo, a nivel de la región, desde Brasil se ha publicado recientemente que miembros de esta especie (sin considerar a enterovirus A71), fueron detectados desde muestras de heces de individuos con AFP en el periodo 2005-2017, variando entre 1 a 16 casos (dependiendo del tipo en cuestión) en un total de 341 casos reportados para todo el periodo (Sousa et al. 2020). A su vez, algunos tipos como CVA4, CVA6, y CVA16 también fueron identificados a partir de muestras respiratorias obtenidas durante una vigilancia pasiva realizada en Perú en el periodo 2005-2010, a partir de pacientes con síntomas de influenza (9 casos de un total de 175 casos en los cuales se detectó la presencia de enterovirus para todo el periodo) (Huaman et al. 2014). Nuestros datos, en conjunto con estos reportes, nos sugieren que, aunque la circulación de estos enterovirus en nuestras comunidades, se da en una baja frecuencia en comparación con la de enterovirus de otras especies, circula una gran diversidad de tipos, los cuales pueden estar sumando en la casuística de diversas complicaciones para la salud del ser humano (más allá de la HFMD). En tal sentido, será importante, ir estudiándolos poco a poco, en la medida que sabemos que varios de estos enterovirus de la especie A, poseen un historial de rápida expansión global mediante eventos epidémicos a distintas escalas (Kimmis et al. 2018, Bian et al. 2019).

6.2.2. Enterovirus de la especie B

Cuando observamos la diversidad de tipos detectados en ambos países en conjunto, constatamos que los miembros de la especie B son los más abundantes (23 enterovirus de la especie B, 12 de la especie A y 12 de la especie C), y esta predominancia se mantiene cuando se analiza cada país individualmente (14 tipos de un total de 29 en Uruguay, y 22 tipos de un total de 45 en Argentina). Esto es esperado, no sólo por tratarse la especie B de la especie que mayor cantidad de

enterovirus contiene en comparación con las otras 3 (Zell et al. 2017), sino que está de acuerdo con la mayoría de los estudios que analizan la diversidad de enterovirus en agua residual (Tao et al. 2016, Brinkman et al. 2017, Pogka et al. 2017).

En Córdoba, la especie B fue detectada en el 100% de las muestras, y por lo general los miembros de esta especie fueron más abundantes que el resto cuando se analizó cada muestra. Sin embargo, hay dos periodos donde se registra una disminución de la abundancia de esta especie: entre marzo y junio de 2011 cuando se detectaron algunos miembros de la especie A con una abundancia marcadamente mayor en comparación con el resto del muestro, y en gran parte de 2017-2018 debido al aumento de abundancia de la especie C, principalmente dado por la emergencia de la circulación de CVA1 junto a otros miembros de la especie C (Lizasoain et al. 2021c).

A su vez, en Uruguay, aunque distintos miembros de esta especie fueron detectados a lo largo de todo el muestreo, se evidenció un reemplazo en los enterovirus que se detectaron en 2017-2018 con respecto a los detectados en 2011-2012, ya que de los 7 enterovirus B detectados en 2011-2012, apenas 2 fueron detectados también en 2017-2018, cuando se detectaron 4 tipos adicionales (Lizasoain et al. 2021a). Este recambio no fue tan marcado en Córdoba, pero si se observó que algunos tipos abundantes y frecuentes en 2011-2012, no lo fueron en 2017-2018, y viceversa. Por ejemplo, echovirus 6 fue detectado durante varios meses de 2011 con abundancias en torno a 30%-80% por muestra, pero en 2017-2018 apenas fue detectado en tres muestras con abundancias inferiores al 1%, o como en el caso de coxsackievirus B5 que fue detectado durante varios meses de 2012 con valores de abundancia oscilando también entre ~30-80%, pero que luego en 2017-2018, si bien fue frecuente, su abundancia fue menor al 1% casi todas las veces que fue detectado. En cambio, coxsackievirus B4, apenas fue detectado en 2011-2012 con valores de abundancia por lo general menores al 1%, pero en 2017-2018, fue detectado consistentemente entre los meses de agosto y diciembre, en abundancias hasta de ~80% (Lizasoain et al. 2021c).

Estos patrones que observamos a partir del análisis integrado de resultados para cada muestra, pueden estar influenciados por diversas cuestiones, incluso metodológicas o de la naturaleza de cada muestra, pero es interesante cuando estos son entendidos en el contexto en que se da la circulación de enterovirus en una población, con picos epidémicos cada pocos años, incluso en aquellos tipos que son endémicos de una región y se evidencian continuamente a través del estudio de casos esporádicos, pero que potencialmente pueden causar epidemias (Brown et al. 2020).

Si bien no hay datos a nivel de vigilancia clínica para los períodos abordados en esta tesis ni para Uruguay ni Argentina (a excepción de lo reportado para echovirus 30 en Argentina por Lema et al. 2019), un estudio previo reportó la detección de la especie B en el 35% de un total de 335 casos de enfermedades relacionadas al sistema nervioso (como meningitis, AFP, encefalitis, y otras) en individuos menores de 15 años de edad de Buenos Aires, en el periodo 1998-2003 (Mistchenko et al. 2006). Este estudio reportó la circulación de varios de los enterovirus de la especie B que fueron detectados en esta tesis a partir del agua residual de Córdoba y

Buenos Aires, como E30, E18, E14, E9, E5, E2 y CVB2-CVB5 (Lizasoain et al. 2021b, 2021c).

También Cisterna et al. (2007) reportaron previamente varios de los enterovirus B que nosotros detectamos en agua residual, pero a partir del estudio de muestras de individuos con enfermedades del sistema nervioso central, obtenidas durante 1991-1998, y provenientes de toda la Argentina. De los enterovirus detectados por nosotros en Argentina, Cisterna et al. (2007) reportaron E9, E17 y E30 durante el estudio de brotes de meningitis, mientras que CVB2, CVB5, y E11 en casos esporádicos. Por otro lado, identificaron E4, E7 y E24 en los casos de encefalitis estudiados, ninguno de los cuales fue detectado por nosotros en las aguas residuales. También identificaron 28 enterovirus distintos asociados a las AFP, entre los cuales CVB1, CVB3, CVB5, E13, E11, E2, E20 y E7 representaron el 60% de los casos.

Interesantemente, Farías et al. (2011), reportaron la detección de echovirus 30, coxsackievirus A9, y coxsackievirus B4 a partir del estudio de 10 pacientes hospitalizados en Córdoba debido a la sospecha de infección del sistema nervioso central, y con resultado de análisis de LCR positivo para enterovirus, en el periodo 2007-2008. También Farías et al. reportaron mediante el estudio de aguas residuales y aguas superficiales contaminadas con éstas, colectadas en Córdoba durante el periodo 2009-2014, la circulación de algunos de los tipos que hemos detectado durante esta tesis como E6, E13, E14, E16, CVA9, y CVB4 (Farías et al. 2018, 2019).

Ello indica que la circulación, de varios de los miembros de la especie B reportados por nosotros, data desde ya hace muchos años, en Córdoba, como en Buenos Aires, y probablemente, en la Argentina toda.

Con respecto a Uruguay, hasta el momento de realizar esta tesis, apenas se tenía conocimiento en el país de la circulación de 8 echovirus (E3, E4, E5, E6, E11, E13, E14 y E18) y de 6 coxsackievirus (CVA9, CVB1, CVB2, CVB3, CVB4 y CVB5) según las tesis de Hernández (2014) y Recarey (2011). De todos ellos, apenas no se detectó en agua residual E4, E13 y 18. Sin embargo se detectó un enterovirus de esta especie de suma importancia a nivel de la epidemiología global de las meningitis, como es echovirus 30 (Brown et al. 2020, Brouwer et al. 2021), constituyendo el primer registro en nuestro país de su circulación, hasta donde nuestro conocimiento nos permite afirmar.

Desafortunadamente, muchas de las secuencias nucleotídicas de los enterovirus reportados desde los estudios de pacientes de Uruguay y Argentina, o no corresponden al mismo segmento que nosotros hemos amplificado para caracterizar los enterovirus, o simplemente no se hicieron disponibles públicamente, limitando en gran medida la posibilidad de comparación con cepas más recientemente detectadas.

Cuando fue posible integrar (debido a disponibilidad) en nuestros análisis filogenéticos, aquellas secuencias de enterovirus obtenidas en los estudios clínicos previos que se han realizado en Argentina, junto a las secuencias obtenidas desde el ambiente tanto de Uruguay como de Argentina, y otras secuencias de la región y del mundo, se constató que algunos de los enterovirus detectados tanto en ambiente como en pacientes, están representados en nuestra región por variantes

pertenecientes a diversos clados, algunos de los cuales han logrado dispersarse a nivel de múltiples países de la región sudamericana, evidenciando que hay variantes que al parecer tuvieron mucho éxito en su dispersión a lo largo de extensas regiones geográficas (Lizasoain et al. 2021a, 2021b).

6.2.3. Enterovirus de la especie C

Es de destacar que en las muestras que hemos analizado, se han detectado enterovirus de la especie C, de descubrimiento reciente, de los cuales aún se conoce relativamente muy poco. Tal es el caso de enterovirus C105 (detectado en Buenos Aires en setiembre de 2013), o de enterovirus C116 (detectado en 2011 en Buenos Aires y en 2011-2012 y 2017-2018 en Córdoba).

El enterovirus C105 fué inicialmente reportado durante el estudio de muestras nasofaríngeas de niños afectados por enfermedad respiratoria en Perú durante 2009, y ha sido subsecuentemente identificado en muestras del mismo tipo en Chipre (Richter et al. 2013), Cuba (Muné, 2014), Nueva Zelanda (Todd et al. 2015), Italia, Burundi (Piralla et al. 2015), Holanda (Van Leer-Buter et al. 2016) y recientemente en China (Li et al. 2019), mostrando una distribución mundial. Sin embargo, también ha sido identificado durante el estudio de un caso fatal de AFP registrado durante un brote de poliomielitis en la República del Congo en noviembre de 2010 (Lukashev et al. 2012), durante el estudio de un caso de AFP ocurrido en India en 2011 (Maan et al. 2019) y durante un caso de AFM que afectó a un niño en Estados Unidos en 2014 (Horner et al. 2015).

Por otro lado, enterovirus C116 fue descrito por primera vez en setiembre de 2010 durante el estudio de heces de un paciente con gastroenteritis en Rusia (Lukashev et al. 2012). Ha sido identificado a partir del estudio de heces de 2 individuos sanos residentes en el sur de Costa de Marfil en 2013 y 2014 (Cristanziano et al. 2015), en un caso de gastroenteritis en Tailandia en 2014 (Kumthip et al. 2017) y también ha sido detectado por estudios que analizaron muestras de agua residual mediante *next-generation sequencing* de amplicon en Nigeria, Pakistán, Reino Unido, y Francia (Majumdar et al. 2018a, 2021, Bisseux et al. 2020, Shaw et al. 2021).

Más allá de la detección de estos enterovirus de la especie C, otros tipos de esta especie se detectaron frecuentemente durante el desarrollo de esta tesis, como coxsackievirus A1, A22 y enterovirus C99.

Tanto coxsackievirus A1 como A22, han sido conocidos clásicamente (junto a coxsackievirus A19) por no poder aislarle en cultivo de células, y si bien se conocen reportes de enfermedades asociados a estos enterovirus (Begier et al. 2008, Kapusinszky et al. 2010, Chitambar et al. 2012), no han sido frecuentemente reportados desde la vigilancia clínica, al recaer ésta en general, en el aislamiento en cultivo celular. Sin embargo, al igual que nosotros, varios autores han reportado detección de variantes de estos virus a partir del estudio de muestras de agua residual por *next-generation sequencing* (Brinkman et al. 2017, Majumdar et al. 2018a, 2021; Bisseux et al. 2020). Ello lleva a cuestionarnos, si en realidad el reporte reciente de estos enterovirus es consecuencia de una emergencia a nivel global en los últimos años, o si es consecuencia apenas de una innovación en la metodología de detección.

Un patrón bien interesante fue el que evidenciamos a partir de las muestras de agua residual colectadas en las ciudades uruguayas: mientras que CVA1, A13 y A19 se detectaron exclusivamente en 2017-2018, CVA22 y EV-C99 se detectaron exclusivamente en 2011-2012 (Lizasoain et al. 2021a).

En las muestras de Córdoba colectadas en 2011-2012, CVA22 también co-circuló con EV-C99, aunque en algunos meses también se detectó la presencia de CVA1 representado en menos de 1% de los *reads* (abril y junio de 2012). Sin embargo, a partir de 2017, emerge una gran diversidad de variantes de CVA1, y pasa a ser uno de los enterovirus más abundantes en cada muestra, siendo detectado además durante los 12 meses de colecta, aunque, si bien comienzan a detectarse también otros tipos como CVA11 y CVA19, sigue dándose la circulación de CVA22 y EV-C99 (Lizasoain et al. 2021c).

Aunque las comparaciones de abundancia entre periodos son relativas, ya que las muestras de 2017-2018 se secuenciaron en mayor profundidad que las muestras de 2011-2012, esta diferencia por sí sola no es capaz de explicar el patrón de cambio entre periodos que se evidencia para coxsackievirus A1. Al parecer este virus emergió en la región de manera reciente, se ha diversificado, y circula ampliamente en nuestras poblaciones. Determinar cuáles son las relaciones ecológicas entre los distintos enterovirus resulta más que interesante, sobre todo al recordar que en mayo de 2012 Uruguay sustituyó la vacuna OPV (preparada con tres cepas que replican en el intestino del individuo vacunado) por la IPV (preparada con cepas inactivadas, sin capacidad replicativa), y que, en 2016, Argentina dejó de suministrar el serotipo 2 en el plan de inmunización con OPV. Si estos reemplazos alteraron los nichos de algunos enterovirus, es apenas una especulación, que, aunque apasionante, necesita estudios específicamente dirigidos a desentrañar esta cuestión.

Es de destacar que se constató una alta divergencia entre algunos miembros de la especie C detectadas por nosotros en agua residual, con respecto al resto de las secuencias conocidas y disponibles en la base de datos de GenBank, tanto al examinar secuencias que obtuvimos por el método de Sanger (Lizasoain et al. 2018) como por el de Illumina *next-generation sequencing* (Lizasoain et al. 2021a). Por ejemplo, en Uruguay detectamos mediante secuenciación por Sanger, un coxsackievirus A13 y un enterovirus C99 que fueron 20,4% y 16,6% diferentes en su secuencia con respecto a las variantes más similares disponibles en GenBank, respectivamente, y también mediante *next-generation sequencing* se detectó una OTU mapeada con CVA24, con apenas 80% de identidad nucleotídica con la cepa de menor *e-value* en una búsqueda BLAST.

Este patrón de detección de miembros de la especie C altamente divergentes con respecto a las cepas de circulación contemporánea, ha sido reportado previamente (Zhang et al. 2016b, Majumdar et al. 2018a), y focaliza la atención sobre este grupo de virus, que tal como se ha documentado en otras partes del mundo, por parte de estudios de *wastewater-based epidemiology*, al parecer circulan de manera frecuente también en nuestra región, ya que los hemos detectado muy frecuentemente tanto en Argentina como en Uruguay.

Más allá del interés que despiertan algunos miembros de la especie C por su capacidad de recombinar con poliovirus, lo cual estaría implicado en la emergencia

y patogenicidad de los cVDPV (Sadeuh-Mba et al. 2019), algunos miembros de esta especie, han mostrado ser un verdadero problema para la salud humana. Tal es el caso por ejemplo de coxsackievirus A24 variante (CVA24v), principal causante de conjuntivitis hemorrágica aguda que se ha manifestado como un virus pandémico en más de una oportunidad (Baggen et al. 2018b).

Por otro lado, si bien un estudio reciente realizado en Brasil (Sousa et al. 2020) reportó a coxsackievirus A13 y enterovirus C99 como dos de los 10 enterovirus no polio más comunes asociados a AFP en el periodo 2005-2017 (17 y 13 casos, respectivamente), otro estudio realizado entre 2008 y 2013 en la República Democrática del Congo (Sadeuh-Mba et al. 2019) reportó que mientras coxsackievirus 13 era detectado en las heces del 4% de niños sanos, no fue detectado en 150 casos de AFP estudiados (y EV-C99 apenas se detectó en un caso de AFP). Considerando la frecuencia relativamente alta con la que al parecer los miembros de la especie C están apareciendo durante el estudio de agua residual, habría que estudiar con más profundidad el rol emergente asociado a AFP que están teniendo.

Es muy interesante desde el punto de vista evolutivo, ese amplio espectro de diversidad de secuencia que al parecer se ha expandido por distintas regiones del planeta, sin que lleguen a causar hasta el momento, importantes complicaciones para la salud del ser humano. Algunos de los enterovirus de la especie C, integran un subcluster junto a los poliovirus, y se ha postulado que podrían ser un reservorio de información genética, desde el cual podrían emerger los “polio del futuro”, en un mundo donde el virus, tal como lo conocemos actualmente con sus tres serotipos, se haya erradicado (Rieder et al. 2001).

La silenciosa circulación de coxsackievirus de la especie C en una frecuencia relativamente alta en diferentes regiones de Madagascar, tal como reportó Rakoto-Andrianarivelo para el periodo 1994-2002, habría jugado un rol fundamental al conjugarse con una baja cobertura de OPV, en la emergencia del brote de AFP por cVDPV que tuvo lugar en la isla en 2002 (Rakoto-Andrianarivelo et al. 2005).

En tal sentido, en el conjunto de muestras que estudiamos en Córdoba (Lizasoain et al. 2021c), se observa un incremento en la abundancia y cantidad de tipos de la especie C hacia el periodo de 2017-2018. Si bien apenas algunos tipos son los que poseerían capacidad de recombinar con cepas vacunales Sabin (Brouwer et al. 2020), es sumamente alentador que Argentina, no sólo haya realizado el cambio de la trivalente OPV a la bivalente OPV en 2016, sino que además el haber sustituido su esquema de vacunación mixta OPV-IPV, por el uso exclusivo de la IPV, a partir del año 2020, disminuye el potencial riesgo de emergencia de derivados vacunales a nivel de todo el territorio nacional. No obstante, si la frecuente circulación de tipos de la especie C, como hemos observado en nuestro estudio, es también un patrón que acontece en otros países de la región, que aún habiendo introducido al menos una dosis de IPV en sus esquemas, presentan porcentajes de cobertura vacunal bajos (Falleiros-Arlant et al. 2020), ello podría ser un escenario propicio para la emergencia y circulación de derivados vacunales con el potencial riesgo de producir parálisis.

6.3. Sobre la detección de poliovirus a partir de muestras de agua residual de Córdoba, y su ausencia en muestras de Buenos Aires y Uruguay

En 6 muestras de agua residual colectadas en Córdoba (Argentina) se detectaron cepas de poliovirus relacionadas a la vacuna Sabin (Figura 14). Tal como se esperaba, no se detectó PV2 en las muestras de 2017-2018 (Argentina realizó el cambio de la trivalente OPV hacia la bivalente OPV en 2016, retirando el serotipo 2 de esta vacuna). Sin embargo, PV2 apenas fue detectado en una muestra colectada en noviembre en 2012, lo cual nos exige que la ausencia de PV2 en 2017-2018 sea interpretada con precaución, considerando que durante todo 2011-2012 Argentina suministró la trivalente OPV a su población y PV2 debería haber sido detectado en una frecuencia mayor a la observada.

También se detectó la presencia del serotipo PV1 en las muestras colectadas en enero 2012 y marzo de 2017, y del serotipo PV3 en abril, julio y setiembre de 2011. Córdoba es una ciudad con aproximadamente 1.300.000 habitantes (Instituto Nacional de Estadística y Censos de la República Argentina, 2021), y las muestras de agua residual fueron colectadas a la entrada de una planta de tratamiento que trata las aguas residuales domésticas de ~60% de la población. Cada muestra consistía de 1,5 litros de agua residual, y se concentró mediante un método de precipitación con polietilenglicol hacia un volumen de 15 ml (factor de concentración=100). Este método de concentración ha sido utilizado de manera exitosa por varios estudios que buscan detectar poliovirus en distintas matrices ambientales, incluyendo muestras de agua residual (Mueller et al. 2009, Matrajt et al. 2018). Además, ha sido mencionado como una alternativa al método de separación en dos fases que la OMS propone para la concentración de especímenes de agua residual en sus recomendaciones para la vigilancia ambiental de poliovirus (Global Polio Eradication Initiative, 2015).

La baja frecuencia de detección de poliovirus (6/32, 19%) en las muestras de Córdoba que analizamos, puede ser comparable con la frecuencia reportada por estudios realizados en Brasil (de Oliveira Pereira et al. 2016) y en Senegal (Ndiaye et al. 2014), que aún empleando el algoritmo de detección de poliovirus mediante aislamiento en células RD y L20B, recomendado por la OMS, fueron capaces de aislar poliovirus en el 26% y 34% del total de muestras analizadas, respectivamente. Sin embargo, la cantidad de muestras en las cuales se detectó poliovirus mediante nuestro abordaje, dista enormemente de lo reportado previamente por Mueller et al. (2009) quienes aislaron poliovirus en el 100% de las muestras de agua residual colectadas en la ciudad de Córdoba en 2006, en un contexto de vacunación sostenida con OPV.

Probablemente, la presencia de varios enterovirus no polio en cada una de las muestras de Córdoba que se estudió en esta tesis (hasta 16 tipos distintos en una muestra), enmascara la presencia de poliovirus, y disminuye la probabilidad de que estos sean amplificados por los cebadores pan-enterovirus que utilizamos. Las muestras de 2011-2012 y 2017-2018 evaluadas en Lizasoain et al. (2021c) fueron tomadas del mismo sitio que en el estudio de Mueller et al. (2009), y es poco probable que haya variado mucho la captación de excretores de poliovirus vacunal, así como la cobertura con OPV en la población cordobesa, entre los distintos muestreos, por lo que probablemente, si sometiéramos las 32 muestras de Córdoba

utilizadas en esta tesis, al algoritmo de aislamiento de poliovirus recomendado por la OMS obtendríamos un número mayor de muestras positivas para este virus, tal como sucedió en un estudio previo en el que muestras de agua residual colectadas en China fueron sometidas en paralelo a detección por métodos moleculares y a aislamiento en cultivo de células (Tao et al. 2020).

Otros abordajes de *next-generation sequencing* de amplicones obtenidos directamente desde muestras de agua residual han detectado también poliovirus en baja frecuencia. Por ejemplo, Majumdar et al. (2018a) amplificaron con cebadores pan-enterovirus la región completa codificante de VP1, a partir de 3 muestras de agua residual colectada en Pakistán en 2013, 2014 y 2015. Apenas el 0,3% de los *reads* de la muestra de 2013 mapeó con un poliovirus (PV2), aunque en esta muestra fue posible identificar la presencia de 59 tipos de enterovirus distintos, cada uno representado por un porcentaje de *reads* que osciló entre 0,1% y 8,8%. Recordemos que Pakistán es un país donde no se ha interrumpido la circulación del virus polio salvaje²⁴, que vacuna con OPV, y que además ha sido afectado por brotes de cVDPV, de hecho, entre agosto de 2012 y diciembre de 2013 reportó unas 61 parálisis a causa de cVDPV-2 (Diop et al. 2014).

Adicionalmente, Shaw et al. (2020), secuenciaron mediante la metodología de Oxford Nanopore, amplicones de cápside, obtenidos directamente desde 8 muestras de agua residual colectada también en Pakistán, y lograron la detección de poliovirus en todas ellas, sin embargo, en 6 de las 8 muestras, los poliovirus estuvieron representados por un porcentaje de *reads* que osciló entre 0,002% y 6,65%. Cuando realizaron la secuenciación mediante Illumina MiSeq, pudieron producir contigs de la cápside completa de poliovirus apenas en dos muestras, representando el 0,08% y el 5,47% del total de *reads*.

Para determinar si un poliovirus es del tipo Sabin, o un derivado vacunal, o incluso un virus salvaje, es necesario analizar la secuencia nucleotídica de la región codificante de VP1 en su extensión completa, determinando el porcentaje de diferencias nucleotídicas con respecto a las cepas de la vacuna Sabin (Burns et al. 2014). Si bien las secuencias de poliovirus amplificadas desde las muestras de Córdoba son secuencias parciales de aproximadamente 300 nt (un tercio de la región codificante para la proteína VP1), igualmente se analizó la similitud nucleotídica de las mismas con las cepas vacunales Sabin.

El análisis se realizó considerando todas las secuencias únicas que clusterizaron en torno a cada secuencia centroide en cada OTU. Los valores de identidad de cada secuencia, con respecto a la cepa Sabin, fueron relacionados con la abundancia de cada una de esas secuencias.

Los valores de identidad para las secuencias cordobesas tomaron valores entre 98,7 y 100% con respecto a las cepas Sabin 1 y Sabin 3 y entre 99 y 100% con respecto a la cepa Sabin 2 (Figura 14).

Sin embargo, aquellas secuencias más divergentes con respecto a las cepas de la vacuna Sabin, estaban representadas por apenas unos pocos *reads* en las distintas OTUs, por lo que es altamente probable que parte de dicha divergencia provenga

²⁴ Ver evolución de casos confirmados de poliovirus salvaje en Pakistán al 17 de agosto de 2021:
<https://polioeradication.org/wp-content/uploads/2021/08/Weekly-polio-analyses-WPV-20210817.pdf>

de meros errores de secuenciación. De hecho, cuando se descartan aquellas secuencias cuya abundancia es de 2 *reads*, tanto las secuencias cordobesas de PV1 como de PV3 presentan valores de divergencia de hasta 1% con respecto a cepas Sabin, por lo que serían consideradas cepas del tipo vacunal, y de igual manera si descartamos las secuencias cuya abundancia es de hasta 10 *reads*, todas las secuencias cordobesas de PV2 serían consideradas del tipo vacunal también (Figura 14). No obstante, es importante de nuevo señalar que, esta clasificación debería realizarse en base a la secuencia completa codificante de VP1, y que nosotros realizamos este análisis apenas para tener una aproximación de la divergencia que existía en las secuencias obtenidas con respecto a las cepas Sabin. Durante el procesamiento bioinformático de nuestros datos, decidimos eliminar aquellos contigs cuya abundancia fuese menor de 2, por lo tanto, algunos contigs presentes en nuestras muestras están representados por apenas 2 secuencias idénticas. Si bien existe la probabilidad de que estos sean consecuencia de errores en la secuenciación de variantes que se encuentran en mayor proporción (como hemos discutido que sucedió para los poliovirus más divergentes que encontramos, los cuales coincidentemente eran aquellos menos abundantes en cada muestra), también hemos mapeado *contigs* en nuestras muestras, cuya abundancia es igual a 2, y que mostraron ser 100% idénticos a secuencias uruguayas obtenidas previamente mediante el método de Sanger durante el estudio del mismo conjunto de muestras (Lizasoain et al. 2021a). Ello nos da la pauta de que haber sido conservativos en este paso de filtrado, nos permitió alcanzar la detección de algunas variantes que se encontraban en baja proporción en una muestra, lo cual en definitiva también es el objetivo del uso de la *next-generation sequencing* de amplicon.

Las muestras de Uruguay, habían sido colectadas en el marco de otros proyectos que nuestro laboratorio desarrolló anteriormente, con objetivos distintos al de esta tesis. Por lo tanto, las características de estas muestras (volumen colectado, método de concentración utilizado, sitios de colecta elegidos, etc.) no están necesariamente de acuerdo con las recomendaciones para una buena sensibilidad en la vigilancia ambiental de poliovirus en una población (Global Polio Eradication Initiative, 2015). Sin embargo, resultaba más que interesante evaluar la posibilidad de detectar poliovirus, al menos en aquellas muestras que correspondían a periodos de colecta que acompañaban la utilización de la vacuna OPV en el esquema nacional de inmunización de Uruguay, es decir, las muestras que habían sido colectadas antes del mes de mayo de 2012, cuando nuestro país reemplazó totalmente la vacuna atenuada por un esquema exclusivo con IPV.

Estudios previos realizados con muestras de agua residual colectada en poblaciones recientemente inmunizadas con OPV, nos mostraban que había una gran factibilidad de encontrar cepas poliovirus en este tipo de muestras (Mueller et al. 2009, Esteves-Jaramillo et al. 2014, Nakamura et al. 2015). A su vez, en Uruguay, la OPV se suministraba de manera continua según el requerimiento dado por la edad de cada individuo, y no en eventos especiales como los conocidos Días Nacionales de Inmunización, por lo que era de esperar que cepas vacunales circularan en el agua residual durante el transcurso de todo el periodo 2011-2012,

especialmente considerando los altos porcentajes de cobertura vacunal que Uruguay ha ostentado históricamente (Sorondo & Frantchez, 2014; Quian, 2015). No fue posible aislar poliovirus desde ninguna de las muestras uruguayas que se sometieron al algoritmo de inoculación en paralelo de células RD y L20B recomendado por OMS. Apenas 4 muestras de un total de 44 desarrollaron efecto citopático en células RD, y al inocular sus sobrenadantes en células L20B, el resultado fue negativo. Estos aislados en células RD se caracterizaron molecularmente como echovirus 6 y coxsackievirus B3.

Esta baja tasa de aislamiento de enterovirus no polio, contrasta con el alto porcentaje de detección de enterovirus que se había obtenido previamente mediante métodos moleculares, a partir de dichas muestras (Lizasoain et al. 2018). A su vez, diversos estudios han reportado altos porcentajes de aislamiento de enterovirus no polio a partir de muestras de agua residual (Richter et al. 2011, Wang et al. 2014, Benschop et al. 2017). Esto también plantea que la permanencia de las muestras, en condiciones de congelamiento a -20 °C durante 5 años aproximadamente (se colectaron en 2011-2012 y se analizaron en 2017), pudo haber llevado al deterioro de las partículas virales, y a una disminución de su viabilidad. No obstante, también es importante recalcar que hubo una importante detección de enterovirus de las especies A y C cuando los mismos concentrados virales que se sometieron a aislamiento en líneas celulares, fueron abordados directamente mediante RT-PCR y secuenciación por Sanger de un fragmento codificante de la proteína VP1. Considerando que la utilización de células RD para el aislamiento de enterovirus, podría dificultar la identificación de las especies A y C al ser más susceptibles a otros enterovirus, principalmente de la especie B (Adeniji & Faleye, 2014; Faleye & Adeniji, 2015), esto podría haber incidido también en la baja tasa de aislamiento a partir de nuestras muestras.

Al considerar los resultados de *next-generation sequencing* del amplicón de VP1 de enterovirus obtenido a partir de muestras de agua residual de Uruguay (Lizasoain et al. 2021a), estos coinciden con los experimentos de aislamiento en líneas celulares, ya que no se detectaron tampoco durante la secuenciación masiva, *reads* que mapearan contra alguno de los tipos de poliovirus, por más que la base de datos de secuencias de referencia que se construyó para el mapeo, integraba 3.693 secuencias de poliovirus. Esto reafirma la idea de que, en realidad, la ausencia de aislamiento de poliovirus a partir de las muestras de agua residual de Uruguay, se debió principalmente a una baja sensibilidad de la vigilancia ambiental.

Tampoco se identificaron poliovirus en las muestras de agua residual colectadas en Buenos Aires en 2011 y 2013, a pesar de que durante este periodo se suministraba la vacuna OPV a la población argentina (Lizasoain et al. 2021b).

Si bien los cebadores que utilizamos para generar los amplicones que fueron sometidos a *next-generation sequencing*, fueron validados originalmente para la detección de distintas cepas de poliovirus (Nix et al. 2006), estos también son reactivos para una gran especificidad de blanco dentro de las cuatro especies de enterovirus humanos (se consideran cebadores pan-enterovirus), y de encontrarse poliovirus en las muestras de agua residual de Uruguay, probablemente estaban en concentraciones inferiores con respecto a otros enterovirus de circulación comunitaria, por lo que los diversos enterovirus no-polio podrían haber significado

durante la amplificación, una fuerte competencia para éstos, sesgando la síntesis de nuevas moléculas de ADN hacia un perfil de enterovirus no-polio.

La baja proporción de poliovirus con respecto al total de tipos de enterovirus no polio que pueden llegar a ser evidenciados en cada muestra de agua residual, incluso en aquellas tomadas en países donde el virus polio no ha sido erradicado (Majumdar et al. 2018a), o en donde se inmuniza con la vacuna OPV (Tao et al. 2020), cuando estas son sometidas a PCR con cebadores pan-enterovirus, resalta la importancia de métodos altamente específicos y sensibles para la detección de poliovirus, ya que por lo general estos se encuentran en un contexto de co-circulación con gran diversidad de enterovirus.

Otros estudios que también han utilizado los cebadores de Nix et al. (2006) acoplados a *next-generation sequencing* de amplicón, han logrado la detección de poliovirus a partir de agua residual, tanto durante un esquema de vacunación con OPV (Tao et al. 2020), como incluso en un esquema de vacunación exclusiva con IPV mantenido durante muchos años, demostrando la posibilidad de detectar la importación de cepas vacunales desde países que utilizan OPV (Bisseux et al. 2020). No obstante, lo han detectado en una baja frecuencia, a diferencia de otros enterovirus no polio que son detectados constantemente. Sin embargo, estos estudios partieron de volúmenes de agua residual de 20 litros y de 1 litro por muestra, concentrando a 60 ml y 10 ml, lo que significa factores de concentración de aproximadamente 330 y 100, respectivamente (nosotros concentramos 42 ml de agua residual hasta 1 ml, por lo que el factor de concentración es en el mejor de los casos, menos de la mitad del empleado en otros estudios que detectaron poliovirus con éxito).

En un contexto en el cual el virus salvaje fue erradicado y, donde se da circulación del virus vacunal en la comunidad, es esperable que las cepas detectadas en agua residual sean cepas vacunales, o relacionadas a la vacuna. Por lo tanto, mediante la utilización de métodos de concentración adecuados y volúmenes de partida de agua residual que maximicen la probabilidad de detección de eventos de excreción de virus polio en una comunidad, el abordaje que aquí presentamos, es útil para determinar qué serotipos de poliovirus están presentes en una muestra (PV1, PV2 o PV3), aunque deberían realizarse amplificaciones adicionales de la región codificante de VP1 en su extensión completa para poder discernir si se trata de un poliovirus del tipo vacunal o VDPV.

Si bien Shaw et al. (2020) han propuesto una metodología que acopla la amplificación de la región codificante completa de cápside de poliovirus con *next-generation sequencing*, para realizar la diferenciación entre polios vacunales, derivados vacunales y salvajes, ésta todavía no logra valores de especificidad y sensibilidad óptimos cuando se la compara con el aislamiento en cultivo de células, por lo que al parecer, el algoritmo propuesto por la OMS, seguirá vigente hasta que se mejoren las existentes, o desarrollen nuevas metodologías.

6.4. Sobre la detección de enterovirus A71 y echovirus 30 en muestras de Uruguay y Argentina

Enterovirus A71 y echovirus 30 fueron detectados en muestras de agua residual colectadas en Córdoba (Lizasoain et al. 2021c) y en distintas ciudades uruguayas (Lizasoain et al. 2021a).

En Uruguay, esta detección representó la primera evidencia de circulación de ambos virus. En Argentina, si bien ambos ya habían sido detectados con anterioridad por otros estudios clínicos (Cisterna et al. 2007, Farías et al. 2011, Lema et al. 2019) hasta el momento no había secuencias disponibles de enterovirus A71 de Argentina, en la base de datos de GenBank. Por otro lado, sí había disponibles secuencias de echovirus 30 procedentes de distintas provincias de Argentina como consecuencia de la caracterización de diversos brotes y casos esporádicos de meningitis asépticas ocurridos en el periodo 1998-2012 (Lema et al. 2019).

Debido a la importancia de estos dos enterovirus, como patógenos asociados a nivel global a meningitis aséptica y AFP, durante esta tesis existió especial interés en la caracterización de las cepas que fueron detectadas durante el estudio de muestras de agua residual.

La diversidad genética de los echovirus 30 que circulan globalmente, ha sido clasificada por Lema et al. (2019) en base al análisis filogenético del segmento codificante de VP1, en 8 genotipos diferentes (A-H), y en algunos pequeños grupos que aparentemente se encuentran extintos, al igual que sucede con los genotipos B, C, D y G, los cuales habrían circulado hasta 2004, 1981, 1997, y 2004, respectivamente. Por lo tanto, la diversidad de echovirus 30 que circula actualmente puede ser resumida a los genotipos A, E, F y H.

Cepas provenientes de distintos países sudamericanos han sido clasificadas dentro de distintos genotipos. Por un lado, las cepas argentinas han sido clasificadas dentro de los genotipos E (1998-2012) y F (1998-2007), las brasileras dentro de los genotipos E (1998-2008) y F (2006), y una cepa colombiana de 1995 como parte del genotipo A (Lema et al. 2019). Farías et al. (2011) sugirieron la circulación del linaje H en Argentina, a partir del estudio de algunos casos de individuos hospitalizados por infecciones del sistema nervioso central, en Córdoba durante el año 2007.

Tanto en Brasil como en Argentina, echovirus 30 ha sido señalado como una de las causas más frecuentes de brotes de meningitis aséptica (Palacios et al. 2002, Dos Santos et al. 2006, 2011; Mistchenko et al. 2006, Lema et al. 2019, Ramalho et al. 2019). A su vez, recientemente se ha reportado un resurgimiento de este virus en Europa, con un aumento de casos de meningitis asépticas en 2018, el cual habría estado causado por la aparición de diferentes linajes del virus, que circularon en dicha región desde al menos el año 2016. Durante el periodo 2016-2018, se constató en Europa la circulación de 6 clados distintos, caracterizada por el recambio rápido por parte de aquellos linajes emergentes más nuevos, y una disminución relativamente rápida de su circulación, lo cual ha sido ampliamente documentado para varios enterovirus (Benschop et al. 2021).

En el estudio de Benschop et al. (2021), el aumento de casos de meningitis aséptica en Europa en 2018, es atribuido al linaje denominado por ellos como G1 (el cual, según nuestro análisis, estaría comprendido en lo que anteriormente se venía denominando como genotipo E. También tendría una gran participación en este resurgimiento, un linaje que denominan G6. Algunas de las secuencias asignadas en el cluster de G6 durante el análisis filogenético realizado por Benschop et al. (2021), habían agrupado en nuestro análisis (Lizasoain et al. 2021a) con secuencias del genotipo B, el cual se consideraba extinto. Estudios adicionales serían necesarios para caracterizar este nuevo clado (G6), del cual aún no ha habido reportes en nuestra región.

Los echovirus 30 detectados por nosotros en Córdoba, agruparon con cepas reportadas a nivel global de los genotipos E y F. Interesantemente, las del genotipo E que detectamos en agua residual en Córdoba durante 2011-2012, mostraron altos porcentajes de identidad nucleotídica y agruparon junto a cepas reportadas previamente a partir del estudio de casos de meningitis aséptica ocurridos en 2011-2012, tanto en Córdoba, como en otras provincias de Argentina (Chaco y Buenos Aires). Incluso, nuestros resultados muestran que, para cuando fueron reportados los casos de meningitis aséptica asociados a echovirus 30 en Córdoba, en mayo de 2012, (que resultarían tipificados como cepas del genotipo E), esta variante habría circulado en la comunidad desde al menos tres meses antes, tal como lo demuestra su detección en agua residual (Lizasoain et al. 2021a, 2021c).

Si bien no se puede asegurar que la detección de una variante en el ambiente, preceda siempre la ocurrencia de brotes o casos esporádicos (Ivanova et al. 2019), al igual que otros estudios (Sedmak et al. 2003, Majumdar & Martin, 2018), el nuestro demuestra que analizando las variantes que están presentes en el agua residual se puede detectar la circulación silenciosa de un virus en la comunidad, antes de que este impacte en la salud de la población. Esto es particularmente útil para la detección de variantes cuya circulación no es endémica en determinada región geográfica.

En este sentido, es que hemos documentado la circulación en Uruguay, del genotipo E de echovirus 30, antes que existan reportes de casos de meningitis asociados al mismo, al igual que lo hemos hecho con el enterovirus A71, sin que existan reportes en el país sobre su incidencia en las AFP (Lizasoain et al. 2021a). Una vigilancia clínica adecuada en Uruguay, podría ayudar a comprender si estas variantes están teniendo algún impacto en la salud de la población, o si lo tendrán en el futuro.

También a partir del estudio de muestras de agua residual colectadas en Córdoba en 2017-2018, evidenciamos la circulación del genotipo F de echovirus 30, el cual no se reportaba en Argentina desde 2007, cuando se lo identificó durante el estudio de casos de meningitis (Lizasoain et al. 2021a). Nuestros análisis también ubicaron dentro del clado del genotipo F, algunas cepas reportadas en Brasil en 2017 (MK570364-MK570366), mostrando que este genotipo, circula nuevamente en nuestra región a partir de, al menos, dos ingresos distintos.

Con respecto a la circulación de enterovirus A71 en nuestra región, si bien un estudio serológico de individuos con parálisis (poliovirus negativos), daba cuenta en 1990 de la amplia circulación de enterovirus A71 en el Brasil (Da Silva et al. 1990), fue recién en 2005 cuando se obtuvo y analizó la secuencia nucleotídica de una

cepa del virus que había causado una AFP en el norte de Brasil en el año 1999 (Castro et al. 2005), en ese entonces se constató la circulación del genogrupo B. Sin embargo, la circulación de este genogrupo en la región sudamericana puede rastrearse hasta el año 1994, a partir del reporte de una cepa colombiana (Brown et al. 1999).

La diversidad de las cepas de enterovirus A71 que circulan a nivel global, ha sido clasificada en distintos genogrupos en base al análisis filogenético del segmento codificante de VP1. Inicialmente se trataba de los genogrupos A, B y C, con adicionales subgenogrupos en B (B0 a B5) y en C (C1 a C5) (Brown et al. 1999, McMinn, 2012; Bessaud et al. 2014). En 2001, se detectaría la circulación de un nuevo genogrupo en India (genogrupo D) (Deshpande et al. 2003), y se han designado nuevos genogrupos a partir del estudio de cepas provenientes de la República Central Africana y de Camerún en 2003 y 2008, respectivamente, (genogrupo E) (Bessaud et al. 2012, Sadeuh-Mba et al. 2013) y de Madagascar en 2004 y 2011 (genogrupo F) (Bessaud et al. 2014). En 2015 se propuso la existencia del genogrupo G a partir del estudio de cepas reportadas en India, en 2008 y 2011 (Saxena et al. 2015).

Se ha visto que estos genogrupos y subgenogrupos circulan con cierta estructuración geográfica y temporal. El genogrupo A, aparentemente se encuentra extinto, ya que sus últimas detecciones sucedieron a fines de la primera década del 2000 (Yu et al. 2010, Zhu et al. 2013). Los subgenogrupos de B y C han circulado conjuntamente en distintas regiones del planeta, así como también unos han desplazado a otros al tornarse predominantes. Por ejemplo, durante los años 80, B2 fue introducido a Estados Unidos, Holanda, Australia y Japón, aunque a inicios de los 90, sería reemplazado por C1. De igual manera, en el 1998 C4 emergió en la región del Pacífico oeste, y causó importantes epidemias en China a partir de 2008. Desde entonces, C4 se dispersó por toda la región, causando importantes epidemias en distintos países, algunas de las cuales estuvieron asociadas a complicaciones graves a nivel del sistema nervioso, incluso llevando al fallecimiento en algunos casos (Puenpa et al. 2019). La predominancia de C4 a nivel de la región Asia-Pacífico, ha llevado a que una cepa inactivada de este subgenogrupo sea utilizada en el diseño de distintas vacunas que han sido licenciadas en China en torno a 2015-2016 (Lei et al. 2020, Li et al. 2021).

Recientemente, se ha evidenciado a EV-A71 como responsable de ~8% de las AFP asociadas a enterovirus en Brasil (periodo 2005-2017), reportando que el subgenogrupo B1 circuló en el país exclusivamente hasta 2014, para ser luego reemplazado por C2 (Sousa et al. 2020).

Si bien Cisterna et al. (2007) documentaron para Argentina (periodo 1991-1998) la circulación de enterovirus A71 como causante de casos de AFP y meningitis aséptica, llegando éste a ocupar el tercer puesto entre los enterovirus más frecuentemente detectados en el año 1993, estas cepas no fueron caracterizadas en su momento ni sus secuencias depositadas en bases de datos públicas, por lo que no fue posible incorporarlas a nuestros análisis.

La detección de cepas EV-A71 C2 a partir de muestras de agua residual de Córdoba y de Uruguay, de 2011 y 2017, describe un rango geográfico de dispersión para este

genogrupo mayor al que se conocía con anterioridad, al ser detectado también en países de la región diferentes a Brasil (Lizasoain et al. 2021a).

Por otro lado, se detectaron dos cepas del subgenogrupo C1 a partir del estudio de las muestras de agua residual colectada en Córdoba en 2017 (Lizasoain et al. 2021a). Si bien en el periodo 2006-2009 habían sido detectadas algunas cepas de este subgenogrupo en nuestra región, a partir del estudio de hisopados nasofaríngeos tomados de individuos con síntomas de influenza en Perú (Huaman et al. 2016), las cepas que detectamos en Córdoba en 2017, pertenecen en realidad a un sub-cluster que ha mostrado ser un linaje emergente dentro de C1 (*C1-like* variante), el cual se ha detectado principalmente a partir de 2015 en diversos países europeos, asociado a casos esporádicos y brotes de desórdenes neurológicos graves, como la meningitis aséptica, encefalitis, o AFP (Böttcher et al. 2016, 2019, Midgley et al. 2017, González-Sanz et al. 2019, Ngangas et al. 2019, Richter et al. 2019).

La detección de cepas *C1-like* variante en nuestra región, reviste importancia, no sólo por las consecuencias que ha tenido en aquellas regiones donde ha circulado, sino también debido a que recientemente se reportó la emergencia de una cepa recombinante originada desde cepas *C1-like* y coxsackievirus A, que no pudo ser efectivamente neutralizada por anticuerpos neutralizantes para C4a (cepa utilizada en las distintas vacunas que existen para prevenir la infección y cuadros clínicos complicados a causa de enterovirus A71) (Zeng et al. 2021). La vigilancia de variantes en distintas regiones del planeta es fundamental, teniendo en cuenta los antecedentes de amplia dispersión de los distintos subgenogrupos.

6.5. Sobre las epidemias de HFMD que tuvieron lugar en Uruguay durante 2018 y 2019, los enterovirus detectados, su relación con cepas detectadas en la región, así como con cepas detectadas en muestras de agua residual analizadas en esta tesis

Esta tesis demuestra que, en Uruguay, son varios los enterovirus responsables de las distintas epidemias de HFMD que han ocurrido en los últimos años (Lizasoain et al. 2020a, 2020b; Lizasoain, 2021). De hecho, hasta donde nuestro conocimiento nos permite afirmar, este estudio constituye el primer intento para establecer los agentes relacionados a los casos de HFMD que ocurren en el país, desde 1973 cuando un equipo de médicos e investigadores reportaron el primer caso de la enfermedad asociándolo con un coxsackievirus del tipo A (Aguirrezabala et al. 1973).

Algunas características principales de ambos brotes que ocurrieron en Uruguay, es que afectaron a un gran número de instituciones educativas y de cuidado de la niñez y la primera infancia, que no se registraron casos graves con complicaciones a nivel del sistema nervioso o sistema respiratorio que requirieran hospitalización, aunque muchos casos tuvieron una presentación atípica de la enfermedad, ello evidenciado por manifestaciones cutáneas en distintas partes del cuerpo, adicionales a las clásicas observadas en las manos, pies y boca. A su vez, al igual que otros reportes de brotes en los que coxsackievirus A6 es el virus predominante asociado a los casos de HFMD (Flett et al. 2012, Ben-Chetrit et al. 2014, Sinclair et al. 2014),

ambos brotes ocurridos en Uruguay tuvieron lugar en meses de otoño-invierno, durante los cuales las temperaturas son sensiblemente inferiores con respecto al resto del año. Ello plantea un esfuerzo adicional para los proveedores de cuidados de salud de Uruguay, los cuales por lo general en los meses de invierno hacen frente a numerosos cuadros respiratorios de diversa etiología que afectan a la población infantil. Ante la emergencia de la HFMD en nuestro país, serán necesarias pautas y directrices para el diagnóstico y tratamiento a nivel clínico de la enfermedad, así como también será necesario diseñar y poner en práctica protocolos para la respuesta ante brotes en instituciones educativas o de cuidado de la niñez y primera infancia.

Los resultados que hemos obtenido, en conjunto con reportes de países de la región, otorgan a coxsackievirus A6 un rol preponderante en la ocurrencia de brotes de HFMD en Sudamérica desde al menos 2015 (Sousa et al. 2018b, Cisterna et al. 2019, Justino et al. 2020, Lizasoain et al. 2020a). A su vez, al igual que lo que se ha registrado durante epidemias de HFMD ocurridas en otras partes del mundo, se evidenció la co-circulación de distintos coxsackievirus del tipo A asociados a esta enfermedad (Lu et al. 2012, Klein & Chong, 2015). Sin embargo, a pesar de que enterovirus A71 es frecuentemente detectado durante el estudio de brotes de HFMD en todo el mundo, no hay estudios en la región sudamericana que lo reporten asociado a casos de esta enfermedad. Nosotros tampoco detectamos EV-A71 durante el estudio de muestras de HFMD tomadas en Salto y Paysandú (Lizasoain et al. 2020a, 2020b; Lizasoain, 2021) aunque previamente detectamos su circulación en Uruguay a partir del estudio de una muestra de agua residual colectada en Salto, apenas 5 meses antes de que se registrara el brote de HFMD en 2018 en dicha ciudad (Lizasoain et al. 2021a).

Sin embargo, un 28,5% de las muestras que se obtuvieron para el estudio del brote de Salto en 2018 y un 31% del brote de Paysandú en 2019, resultó negativo mediante la detección de la RT-PCR con los cebadores pan-enterovirus que utilizamos. Aunque son varias las causas que pueden llevar a un resultado negativo en la técnica de detección del virus, considerando que todas las muestras provenían de individuos con diagnóstico clínico de la enfermedad, existe la posibilidad de que la diversidad de enterovirus asociada a ambos brotes, sea mayor a la aquí descrita. En tal sentido, evaluar dichas muestras mediante un enfoque de metagenómica viral podría ser útil para identificar enterovirus de una manera más sensible en comparación con el método que hemos utilizado, para obtener un conocimiento más amplio sobre los agentes asociados a estos casos (Linsuwanon et al. 2015).

En esta tesis, reportamos la primera detección de coxsackievirus A10 en un caso de HFMD en Sudamérica (Lizasoain et al. 2020b). Si bien fue posible detectar este virus en apenas un individuo afectado durante el brote de Paysandú de 2019, no siempre la presencia de un determinado tipo en una muestra clínica se correlaciona con el cuadro clínico que cursa el individuo desde el cual proviene la muestra (Madeley, 1982; Luchs, 2021), de hecho, la detección de enterovirus es común en muestras de individuos que no cursan cuadro clínico alguno (Witso et al. 2006). Sin embargo, en el caso del coxsackievirus A10 que reportamos, la muestra se obtuvo a partir de un hisopado de las lesiones en piel, por lo que la vinculación con el

cuadro, es probablemente mayor que si fuera obtenida desde hisopado de garganta, o heces, por ejemplo.

Existen 6 linajes genéticos distintos de coxsackievirus A10 (A-F). En Europa se ha documentado la circulación de los linajes B, C y D desde 2003, mientras que en África se han reportado epidemias de HFMD debido al linaje E en 2006 y 2008. Por otro lado, en Asia se ha dado la circulación de los linajes B, D, y E desde 2004. Particularmente en China, el linaje D circuló hasta 2008, para ser luego reemplazado por el linaje F, el cual se subdivide en F1, F2, y F3, siendo estos dos últimos los que han co-circulado en China en los últimos años, mientras que F1 se reportó en España durante un brote de HFMD grave que ocurrió en 2008 y durante un gran brote en Vietnam en 2014. También F3 ha sido detectado en Estados Unidos en 2016, y en Rusia en 2013. El linaje A corresponde a la cepa prototipo “Kowalik”, reportada en Estados Unidos, en 1950. Actualmente, debido a la incidencia que tiene F2 y F3 en China, el linaje F es predominante a nivel mundial (Bian et al. 2019). Nuestro estudio, clasificó la cepa de coxsackievirus A10 detectada a partir de un caso de HFMD que tuvo lugar en Paysandú en junio de 2019, como parte del linaje C, y estimamos que su ingreso al país podría haberse dado en 2017 (95% HPD 2015-2018), con mayor probabilidad desde Grecia (Lizasoain et al. 2020b).

Cuando aquellas cepas de coxsackievirus A10 que detectamos en el agua residual de Uruguay (Lizasoain et al. 2021a) y Argentina (Lizasoain et al. 2021c) fueron integradas al análisis filogenético que habíamos realizado inicialmente para clasificar el CVA10 detectado en el brote de HFMD de Paysandú, evidenciamos que el virus tenía múltiples ingresos a nuestra región, y que, además, diversos linajes habían circulado en ambos países (Figura 15, Lizasoain, 2021).

Si bien constatamos que cepas detectadas en muestras colectadas en distintas ciudades uruguayas y en Córdoba, en 2017, también pertenecían al linaje C, estas probablemente resultaron de eventos introductorios en nuestra región, adicionales al que se describió para la cepa detectada a partir del brote de Paysandú, ya que las distintas secuencias estuvieron dispersas a nivel de distintos subclados dentro de este linaje (Lizasoain, 2021). Interesantemente, una secuencia obtenida a partir del estudio de agua residual colectada en Fray Bentos (Uruguay), en 2011 (Lizasoain et al. 2021a), también agrupó dentro del clado del linaje C, lo que indica una presencia en nuestro país para este linaje, anterior a lo que creíamos a partir del análisis que habíamos realizado previamente en Lizasoain et al. (2020b). La detección del linaje C en Uruguay, en fechas tan tempranas como 2011, podría ser consecuencia de una amplia dispersión del mismo, a partir de los eventos epidémicos que ocurrieron años antes, principalmente en Europa (Blomqvist et al. 2010, Mirand et al. 2012).

Por otro lado, algunas cepas detectadas en el agua residual de distintas ciudades de Uruguay, durante julio y agosto de 2017, agruparon con secuencias del linaje F (Figura 15) constituyendo el primer indicio de introducción en la región sudamericana del linaje epidémico asiático. Desafortunadamente, el fragmento genómico que utilizamos para nuestro análisis filogenético es parcial, y no brinda la suficiente información filogenética para segregar las cepas de F1, F2, y F3 en subclados con un buen soporte estadístico. Sin embargo, las cepas uruguayas

agruparon con una cepa reportada en Estados Unidos en 2016 (KY762310), que había sido catalogada previamente como F3 (Bian et al. 2019).

Los distintos coxsackievirus A16 que circulan globalmente han sido clasificados en distintos clados determinados filogenéticamente. Sin embargo, la denominación de clados se ha vuelto confusa debido a que diversos estudios han propuesto distintos nombres para un mismo linaje, sin estandarizar una nomenclatura que facilite el abordaje de este virus (Mizuta et al. 2013, Hassel et al. 2017).

En nuestro estudio, hemos considerado la existencia de los linajes A y B (este último con una subdivisión en B1a, B1b, B1c, B2, B3) de acuerdo a lo establecido por Hoa-Tran et al. (2020), más un sublinaje sin definir aún. Adicionalmente se consideró el linaje E.

El linaje A comprende la cepa prototipo detectada en 1951 en Sudáfrica denominada “G10”. Por otro lado, los linajes B1 (a, b y c) presentan una circulación principalmente a nivel de China y la región de Asia en general, aunque también hay evidencia de su circulación en Europa (Hoa-Tran et al. 2020). Mientras que el linaje B2 comprende algunas cepas de Japón, China y Malasia, del periodo 1981-2000 (Hoa-Tran et al. 2020), el linaje B3 ha sido llamado también linaje D (Hassel et al. 2017), y fue reportado a partir del estudio de una cepa detectada en Perú en 2009 (Carrión et al. 2016), y también hay evidencia de su circulación principalmente en Francia durante 2011-2014. El linaje E, comprende algunas cepas detectadas en muestras de agua residual colectadas en Pakistán en 2014 y 2015 (Majumdar et al. 2018a).

Todas los coxsackievirus A16 detectados durante el estudio del brote de HFMD ocurrido en Paysandú en 2019, agruparon con cepas del linaje B3 (Figura 16). También agruparon con cepas de este linaje, las distintas cepas de coxsackievirus A16 que detectamos a partir del estudio de agua residual de Córdoba, Buenos Aires y de las distintas ciudades de Uruguay. Se puede decir, con la información de secuencias genéticas disponible hasta el momento, que desde 2009, coxsackievirus A16 ha circulado en la región sudamericana exclusivamente bajo el linaje B3, ya que, además, numerosas secuencias reportadas en Brasil en el periodo 2009-2016 por Sousa et al. (2018b), también agruparon dentro de este clado.

Nuestros resultados indican que este linaje se habría dispersado ampliamente a nivel de la región sudamericana, a partir de su emergencia en Perú en 2009. En Uruguay, el linaje B3 habría tenido al menos dos eventos de introducción, el primero habría dado lugar a la diversidad de cepas de coxsackievirus A16 que detectamos en muestras de agua residual (tanto mediante secuenciación por el método de Sanger como mediante secuenciación por Illumina MiSeq) en 2011-2012 (Lizasoain et al. 2018, 2021a). El segundo habría dado lugar a la circulación de las cepas de CVA16 que fueron detectadas durante el brote de HFMD de Paysandú, en 2019 (Figura 16). Las cepas que se detectaron durante el brote de HFMD en Paysandú, podrían tener su origen en el país a partir de la introducción desde Brasil, lo cual se sostiene en la estrecha relación filogenética con cepas brasileñas reportadas durante 2011-2012 y 2016 por Sousa et al. (2018b).

Un estudio previo analizó de qué manera se dio la transmisión sostenida de cepas del linaje B3 (linaje D) durante 4 años en Francia, y trazó el origen geográfico de estas, localizándolo en Perú (Hassel et al. 2017). Considerando que el linaje B3

habría tenido una amplia dispersión geográfica en Sudamérica, resulta interesante analizar filodinámicamente este linaje para esclarecer, no únicamente si la dispersión a nivel de Europa tiene origen en un único evento de transporte transatlántico del virus, sino también, para poder determinar si el ancestro común más reciente del linaje B3 se localizó efectivamente en Perú, o si en realidad fue en Brasil, considerando que nuestros resultados indican que las cepas reportadas en 2009 en dicho país, pertenecen también a este linaje.

Al igual que con coxsackievirus A16, la nomenclatura y clasificación de la diversidad de cepas coxsackievirus A6 que circulan a nivel global ha variado entre los distintos trabajos publicados. A los efectos de esta discusión, hemos seguido la utilizada en el trabajo de Hoa-Tran et al. (2020), el cual resume la diversidad de cepas de coxsackievirus A6 reportadas hasta el momento en distintos genotipos, los cuales engloban (en su mayoría) distintos sub-genogrupos. El genotipo A lo comprende la cepa prototipo identificada en 1949 en Estados Unidos denominada “Gdula”. El genotipo B se subdivide en sub-genogrupos B1 y en B2 representado por unas pocas cepas reportadas principalmente en China, en 1992 (B1) y entre 2004 y 2009 (B2). Luego, dentro del genotipo C encontramos el subgenogrupo C1 (definido por una cepa reportada en China en 1996, JQ364887) y el subgenogrupo C2 (dos cepas de India, de 2008 y 2010: JN203517 y JX476135 respectivamente). Por último, dentro del genotipo D, encontramos 4 subgenogrupos: el D1 está definido por cepas reportadas en Japón y Australia en 2005-2006, en algunos países europeos en 2008-2010, y Rusia en 2010-2011. El D2 está definido por cepas principalmente reportadas en Japón y en China, entre 2005 y 2013. El genotipo D3 emergió en 2008 asociado a un brote de HFMD en Finlandia (Osterback et al. 2009), y desde 2010 es el predominante a nivel global (Song et al. 2017), destacándose un gran número de subclados, consecuencia de una gran diversidad de variantes que circulan principalmente en China, pero que también se han dispersado a nivel global. Su carácter pandémico al parecer podría estar asociado a una mayor capacidad de transmisión, infectividad y virulencia (Song et al. 2017). Un cuarto subgenogrupo, denominado D4, comprende cepas reportadas en Vietnam en 2011-2012, en Rusia en 2010, y en Taiwan y China en 2007-2008 (Hoa-Tran et al. 2020). A excepción de unas pocas cepas que fueron detectadas a partir del estudio de muestras provenientes de gastroenteritis en Brasil en 2010 (Machado et al 2020), las cuales agruparon en nuestro análisis con cepas del subgenogrupo C1, y de algunas cepas obtenidas en el marco de esta tesis a partir del estudio de muestras de agua residual colectada en Córdoba en 2011, el resto de las secuencias de coxsackievirus A6 de la región latinoamericana, pertenecen al subgenogrupo D3 y han sido detectadas a partir del 2011 (Figura 17, ANEXO 6). Interesantemente, la gran mayoría de estas cepas, proviene del estudio de casos de HFMD que se han reportado en nuestra región desde entonces. Previo a la obtención de nuestros resultados, Cisterna et al. (2019) ya habían reportado la presencia en nuestra región del linaje epidémico mundial a raíz del estudio de brotes de HFMD que ocurrieron en las provincias de Chubut y San Luis en 2015 (en ese entonces haciendo referencia al mismo como linaje E2, clasificación que nosotros no hemos considerado aquí). En el brote de Chubut algunos casos fueron clasificados como atípicos, ya que se registraron lesiones eruptivas a nivel de los pliegues de las

grandes articulaciones, mejillas, región perianal, e incluso a nivel de todo el cuerpo. Varios pacientes manifestaron onicomadesis, lo cual ha sido reportado como una manifestación tardía de la infección por coxsackievirus A6. Por otro lado, todos los casos de San Luis fueron considerados atípicos. Si bien no realizamos un seguimiento de manera sistemática de los individuos desde los cuales se colectó muestra para esta tesis, se tuvo conocimiento acerca de el desarrollo de onicomadesis hacia el final del cuadro, o a unas semanas de haberlo resuelto. Sin embargo, esta información es meramente anecdótica ya que no fue obtenida apropiadamente para cada caso, sin que sea posible siquiera relacionarla con la presencia de alguno de los enterovirus que detectamos durante dicho brote.

En nuestro análisis filogenético, las cepas detectadas en 2015 en Chubut y San Luis (Argentina) por Cisterna et al. (2019) agruparon en un mismo subclado junto a cepas que circularon en aguas residuales de Córdoba en 2017 y de Uruguay en 2018, y con cepas que habrían sido responsables de cuadros de HFMD en Brasil en 2016 (Sousa et al. 2018b) (Figura 17, ANEXO 6).

Además de este subclado, la evidencia de una amplia dispersión regional de coxsackievirus A6, está dada también por la agrupación de secuencias de cepas que fueron reportadas como causantes de casos atípicos esporádicos en Argentina y en Brasil en 2018 (Sapia et al. 2020, de Sousa et al. 2021), junto a secuencias detectadas por nosotros tanto durante el estudio de muestras de agua residual de Córdoba colectadas en 2017-2018, como durante el estudio de brotes de HFMD ocurridos en Salto y Paysandú en 2018 y 2019, respectivamente, y por una secuencia venezolana de 2018 disponible en genbank pero sin fuente conocida (MK652140) (Figura 17, ANEXO 6).

Más allá de estos dos subclados del subgenogrupo D3 en los cuales encontramos secuencias de coxsackievirus A6 de distintas locaciones geográficas de la región sudamericana, en un tercer subclado, encontramos las secuencias de algunas de las cepas reportadas por nosotros durante el brote de HFMD ocurrido en Paysandú en 2019, conjuntamente con secuencias de cepas detectadas en muestras de agua residual de Uruguay colectadas en 2017-2018. Dichas secuencias de 2019, son la evidencia más reciente de la presencia del virus en nuestra región, y al igual que lo que se observó en el subclado que describimos anteriormente que contenía algunas secuencias también de los brotes de HFMD ocurridos en Uruguay en 2018 y 2019, nuestro análisis demuestra que variantes altamente relacionadas con aquellas que causaron los casos clínicos de HFMD circularon en el agua residual, al menos 1 a 2 años antes de que se reportaran dichos casos.

Un resultado interesante a destacar es que, así como durante 2018, se reportaron casos esporádicos atípicos de HFMD, tanto en Brasil como en Argentina, y los mismos estuvieron asociados a cepas estrechamente relacionadas a nivel genético, en el brote de Paysandú de 2019 se evidenció la circulación de cepas de CVA6-D3 pertenecientes a subclados distantes, entre las cuales se calculó 10% de diferencias nucleotídicas (no mostrado), lo cual se corresponde con la co-circulación de distintas variantes genéticas en un mismo evento epidémico. Debido al bajo número de casos que hemos estudiado, no se realizaron estudios comparativos con soporte estadístico para determinar si existieron diferencias a nivel clínico entre los casos causados por cepas pertenecientes a uno u otro clado. Es interesante también

destacar, que hubo co-circulación de cepas de ambos subclados, apenas en uno de los 20 centros educativos en los que se colectaron muestras de individuos afectados por HFMD en Paysandú en 2019. La co-circulación de distintas variantes en un mismo brote plantea la importancia de llegar a caracterizar en profundidad los distintos eventos epidémicos que ocurren en nuestros países. En el caso del brote de HFMD que afectó a Paysandú en 2019, la diversidad de enterovirus no sólo se evidenció mediante la detección de tres virus distintos: CVA6, CVA10 y CVA16, sino también por la co-circulación de distintas variantes genéticas de un mismo virus, sin que existiera link epidemiológico alguno entre individuos afectados. Esto último, aunque lejos está de ser novedoso (ya que incluso en el reporte inicial de la asociación entre CVA6 y HFMD durante el brote de Finlandia también se documentó la circulación de más de una variante durante un mismo evento epidémico como resultado de distintas introducciones del virus al país) es una fundamentación de lo importante que es la vigilancia de este patógeno ante su carácter emergente en nuestra región. La epidemiología molecular nos será útil para entender diferencias a nivel genético en el conjunto de cepas que circulan durante una epidemia, obteniendo una visión complementaria a la obtenida exclusivamente desde la clínica médica o el diagnóstico.

7. CONCLUSIONES

- En esta tesis se logró implementar en nuestro laboratorio un método para la secuenciación profunda de productos de PCR obtenidos con cebadores dirigidos a una región informativa en el genoma de enterovirus humanos. Dicho método fue directamente aplicado al ARN viral extraído desde concentrados de agua residual obtenidos por precipitación con PEG, ultracentrifugación y filtración en membrana cargada electronegativamente. Aquellas muestras que fueron concentradas por precipitación con PEG, mostraron una mejor performance en término de número de tipos de enterovirus detectados por muestra.
- Mediante un enfoque de *wastewater-based epidemiology* utilizando muestras de agua residual de Córdoba y Buenos Aires (Argentina) y de distintas ciudades de Uruguay, se reportó la circulación de 47 enterovirus humanos distintos de las especies A, B y C. No se detectaron miembros de la especie D.
- El análisis filogenético en profundidad de algunos enterovirus de interés, permitió reportar la circulación de los subgenogrupos C1 y C2 de enterovirus A71 en Argentina, y de C2 en Uruguay. Específicamente se detectó la circulación de la variante emergente de tipo C1 mediante el estudio de muestras colectadas en Córdoba en 2017. La circulación de dicha variante en nuestra región plantea preocupación considerando su rol asociado a cuadros neurológicos graves en Europa, y a la posibilidad de no ser neutralizada por las vacunas contra enterovirus A71 que se han licenciado hasta el momento. Adicionalmente, se confirmó la circulación de los genotipos E y F de echovirus 30 en Argentina, y se reportó por primera vez la circulación de este virus en Uruguay mediante la detección del genotipo E.
- Se detectó la presencia de poliovirus (relacionada a la vacunación con OPV), en 6 de las 32 muestras de agua residual de Córdoba que fueron analizadas mediante *next-generation sequencing* de amplicon. No hubo aislamiento de poliovirus en muestras de agua residual colectadas en Uruguay en 2011-2012, ni se detectó el virus en alguna de las muestras colectadas en Uruguay o en Buenos Aires, cuando estas fueron ensayadas mediante *next-generation sequencing* de amplicon.
- Este estudio significa para varios de los enterovirus humanos aquí reportados, la primera evidencia de circulación en la región sudamericana, y constituye por sí mismo un importante aporte al incremento de secuencias genéticas disponibles en bases de datos de acceso público.
- Por primera vez en Uruguay se tipificaron los casos reportados durante epidemias de HFMD, y se reunió información acerca del contexto epidemológico en que las mismas ocurrieron.

- En el estudio de casos de HFMD reportados durante epidemias ocurridas en Salto y Paysandú (Uruguay), coxsackievirus A6 mostró tener un rol predominante, seguido por coxsackievirus A16 y coxsackievirus A10.
- Se reportó la circulación de coxsackievirus A6 (linaje D3), A10 (linaje C) y A16 (linaje B3), asociados a casos de HFMD en epidemias que tuvieron lugar en Uruguay en 2018 y 2019. Además, se evidenció la circulación previa de estos linajes en aguas residuales de Uruguay y Argentina, así como también se encontró en éstas, linajes adicionales a los reportados a partir del estudio de casos de HFMD (linaje D1 de coxsackievirus A6, y linaje F de coxsackievirus A10).

8. PERSPECTIVAS

Los resultados que se presentan en esta tesis, corresponden al estudio de muestras obtenidas en periodos acotados, en ciudades de Uruguay y de Argentina. Sin embargo, la posibilidad de conocer patrones de circulación para los diferentes enterovirus, más allá de los periodos abarcados en esta tesis, debería explorarse desde un plan de monitoreo realizado de manera continua, estratégicamente diseñado a los efectos de generar información de manera periódica acerca de la diversidad de los enterovirus que circulan en nuestras poblaciones.

En tal sentido, durante el desarrollo de esta tesis, se han generado capacidades a distintos niveles que posibilitan y potencian el diseño y ejecución de un plan de monitoreo de estas características: formación de recursos humanos, puesta a punto de metodologías específicas para el estudio de enterovirus, y establecimiento de colaboraciones académicas y de trabajo en conjunto a nivel regional. A su vez, luego de varios años de involucramiento en este proyecto de tesis, se logró un aprendizaje que sin lugar a dudas fortalecerá las actividades de vigilancia e investigación que se desarrollen a futuro desde nuestro grupo en torno a los enterovirus.

Todo esto se potencia con la reciente construcción y certificación en nuestra Universidad de la República, en Salto, del primer laboratorio de bioseguridad nivel III con el que cuenta Uruguay, el cual permitirá profundizar en el estudio de diversos patógenos que estén presentes tanto en las muestras clínicas como ambientales con las que trabajemos, siguiendo la normativa y las recomendaciones adecuadas a tales efectos.

Por lo tanto, una perspectiva que nos hemos propuesto en el corto plazo es la **implementación en Uruguay de un programa sostenido en el tiempo de wastewater based-epidemiology para enterovirus, mediante el monitoreo mensual de agua residual colectada en sitios de interés distribuidos por todo el territorio nacional, y su análisis mediante secuenciación masiva de amplicón.**

Conjuntamente nos hemos planteado:

- Implementar otros métodos ya publicados de *next-generation sequencing* de amplicón y comparar sus performances con la obtenida mediante el método empleado por nosotros en esta tesis durante el estudio de muestras de agua residual.
- Analizar la influencia de diferentes métodos de concentración de agua residual en la diversidad de enterovirus descripta en una muestra dada.
- Estandarizar en el laboratorio un método para la amplificación y secuenciación mediante *next-generation sequencing* de la región completa codificante de VP1 de poliovirus.

- Estandarizar en el laboratorio distintos métodos de aislamiento de enterovirus en cultivo celular, posibilitando profundizar en el estudio de determinados tipos como el enterovirus D68, el enterovirus A71, el coxsackievirus A24v, entre otros, cuando sean detectados durante el monitoreo.

Otras perspectivas que involucran la colaboración con nuevos grupos de investigación, así como con aquellos con los cuales ya hemos establecido vínculos académicos en el marco de esta tesis, son:

- La estandarización de un abordaje metodológico común entre diversos grupos de la región sudamericana, que nos permita realizar un monitoreo en conjunto de agua residual con la finalidad de explorar la diversidad de enterovirus mediante *next-generation sequencing* en las principales ciudades de la región.
- Estudiar retrospectivamente aquellas colecciones de concentrados de agua residual, que poseen distintos grupos de investigación con los cuales hemos colaborado durante esta tesis, con la finalidad de profundizar el conocimiento sobre la circulación de enterovirus en la región sudamericana.

Además, durante el desarrollo de esta tesis, se generaron distintos resultados, algunos de los cuales podrían ser objeto de análisis adicionales, los cuales detallamos a continuación:

- Aislamiento en células RD y L20B de aquellas muestras en las que se detectó poliovirus, y posterior caracterización genética de los virus aislados. Secuenciación de genomas completos de los poliovirus detectados. Estudio de posibles recombinantes.
- Aislamiento y secuenciación de genomas completos de cepas de interés detectadas a partir de estudio de muestras de agua residual durante esta tesis.
- Análisis filogenéticos de algunos enterovirus que, si bien fueron reportados durante esta tesis, la comparación con cepas reportadas globalmente y el estudio de las relaciones evolutivas con las mismas, permanecen pendientes.
- Análisis de *unpaired reads* que no ensamblaron, y de *reads* que fueron descartados durante el proceso de filtrado por calidad por poseer abundancia <2.

Más allá del abordaje de virología ambiental, esta tesis también realizó la caracterización de enterovirus responsables de casos de manos-pies-boca

reportados durante epidemias que tuvieron lugar en Salto y en Paysandú en 2018 y 2019, respectivamente. Algunas de las perspectivas con respecto a los resultados obtenidos son:

- Intentar detectar enterovirus a partir de las muestras clínicas que fueron negativas en esta tesis (a pesar de provenir de pacientes clínicamente diagnosticados con HFMD), mediante la utilización de métodos adicionales a los empleados aquí (otras regiones genómicas blanco, o incluso otras combinaciones de cebadores para la misma región que ya se intentó amplificar).
- Amplificar genomas completos de los coxsackievirus A6 detectados en Salto en 2018 y en Paysandú en 2019 a partir de los casos de HFMD, y evaluar la presencia de posibles recombinantes.
- Realizar estudios filodinámicos incluyendo cepas sudamericanas de coxsackievirus A16 para describir la forma en que este virus se ha dispersado en la región.
- Estandarizar una metodología de detección y cuantificación de enterovirus para ser aplicada durante el estudio de superficies y objetos con los cuales los niños tienen contacto en los centros educativos afectados por los brotes de HFMD (potencial uso en la evaluación de procesos de desinfección de centros educativos durante brotes).
- Trabajar en pos de un programa de vigilancia y estudio de brotes de HFMD ocurridos en centros educativos y de cuidado de la primera infancia de Uruguay, en articulación con actores de los sectores de la educación y de la salud pública.

Por otro lado, y en lo que respecta al abordaje de casos clínicos causados por enterovirus, también nos hemos propuesto:

- Desarrollar y estandarizar en nuestro laboratorio, métodos moleculares para el *screening* y tipificación de enterovirus a partir de muestras de líquidos cefalorraquídeos.
- Estudiar la epidemiología molecular de los enterovirus humanos causantes de cuadros de meningitis aséptica, encefalitis, y meningoencefalitis en Uruguay.

9. BIBLIOGRAFÍA

- Adeniji JA, Faleye TO. Isolation and identification of enteroviruses from sewage and sewage-contaminated water in Lagos, Nigeria. *Food Environ Virol.* 2014 Jun;6(2):75-86. doi: 10.1007/s12560-014-9137-5.
- Aguirrezabala MP, Somma MP, Russi J, Campione J, Hortal M, Tosi HC. Maculopapular vesicular disease of hand, foot and mouth. First national observation. *Arch Pediatr Urug.* 1973; 44:111–113.
- Alfaro-Murillo JA, Ávila-Agüero ML, Fitzpatrick MC, Crystal CJ, Falleiros-Arlant LH, Galvani AP. The case for replacing live oral polio vaccine with inactivated vaccine in the Americas. *Lancet.* 2020 Apr 4;395(10230):1163-1166. doi: 10.1016/S0140-6736(20)30213-0.
- Alleman MM, Jorba J, Greene SA, Diop OM, Iber J, Tallis G, Goel A, Wiesen E, Wassilak S, & Burns CC. Update on Vaccine-Derived Poliovirus Outbreaks - Worldwide, July 2019-February 2020. *MMWR. Morbidity and mortality weekly report.* 2020, 69(16):489–495. doi: 10.15585/mmwr.mm6916a1.
- Alsop J, Flewett TH, Foster JR. "Hand-foot-and-mouth disease" in Birmingham in 1959. *Br Med J.* 1960 Dec 10;2(5214):1708-11. doi: 10.1136/bmj.2.5214.1708.
- Amdioune H, Faouzi A, Fariat N, Hassar M, Soukri A, Nourilil J. Detection and molecular identification of human adenoviruses and enteroviruses in wastewater from Morocco. *Lett Appl Microbiol.* 2012 Apr;54(4):359-66. doi: 10.1111/j.1472-765X.2012.03220.x.
- Anisimova M, Gascuel O. Approximate likelihood-ratio test for branches: A fast, accurate, and powerful alternative. *Syst Biol.* 2006 Aug;55(4):539-52. doi: 10.1080/10635150600755453.
- Apostol LN, Imagawa T, Suzuki A, Masago Y, Lupisan S, Olveda R, Saito M, Omura T, Oshitani H. Genetic diversity and molecular characterization of enteroviruses from sewage-polluted urban and rural rivers in the Philippines. *Virus Genes.* 2012 Oct;45(2):207-17. doi: 10.1007/s11262-012-0776-z.
- Arola A, Santti J, Ruuskanen O, Halonen P, & Hyypiä T. Identification of enteroviruses in clinical specimens by competitive PCR followed by genetic typing using sequence analysis. *J Clin Microbiol.* 1996, 34(2):313–318. doi: 10.1128/jcm.34.2.313-318.1996.
- Aswathyraj S, Arunkumar G, Alidjinou EK, Hober D. Hand, foot and mouth disease (HFMD): emerging epidemiology and the need for a vaccine strategy. *Med Microbiol Immunol.* 2016 Oct;205(5):397-407. doi: 10.1007/s00430-016-0465-y.
- Ayukekbong J, Kabayiza JC, Lindh M, Nkomo-Akenji T, Tah F, Bergström T, Norder H. Shift of Enterovirus species among children in Cameroon--identification of a new enterovirus, EV-A119. *J Clin Virol.* 2013 Sep;58(1):227-32. doi: 10.1016/j.jcv.2013.07.005.
- Baboonian C, Davies MJ, Booth JC, McKenna WJ. Coxsackie B viruses and human heart disease. *Curr Top Microbiol Immunol.* 1997, 223:31-52. doi: 10.1007/978-3-642-60687-8_3.
- Baggen J, Hurdiss DL, Zocher G, Mistry N, Roberts RW, Slager JJ, Guo H, van Vliet ALW, Wahedi M, Benschop K, Duizer E, de Haan CAM, de Vries E, Casasnovas JM, de Groot RJ, Arnberg N, Stehle T, Ranson NA, Thibaut HJ, van Kuppeveld FJM. Role of enhanced receptor engagement in the evolution of a pandemic acute hemorrhagic conjunctivitis virus. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2018b Jan 9;115(2):397-402. doi: 10.1073/pnas.1713284115.
- Baggen J, Thibaut HJ, Strating JRPM, van Kuppeveld FJM. The life cycle of non-polio enteroviruses and how to target it. *Nat Rev Microbiol.* 2018a Jun;16(6):368-381. doi: 10.1038/s41579-018-0005-4. Erratum in: *Nat Rev Microbiol.* 2018 May 3.
- Baicus A, Joffret ML, Bessaud M, Delpeyroux F, Oprisan G. Reinforced poliovirus and enterovirus surveillance in Romania, 2015-2016. *Arch Virol.* 2020 Nov;165(11):2627-2632. doi: 10.1007/s00705-020-04772-7.
- Bailly JL, Mirand A, Henquell C, Archimbaud C, Chambon M, Charbonné F, Traoré O, Peigue-Lafeuille H. Phylogeography of circulating populations of human echovirus 30 over 50 years: nucleotide polymorphism and signature of purifying selection in the VP1 capsid protein gene. *Infect Genet Evol.* 2009 Jul;9(4):699-708. doi: 10.1016/j.meegid.2008.04.009.
- Baltimore D. Expression of animal virus genomes. *Bacteriol Rev.* 1971, 35(3):235–241. doi: 10.1128/br.35.3.235-241.1971.
- Battistone A, Buttinelli G, Bonomo P, Fiore S, Amato C, Mercurio P, Cicala A, Simeoni J, Foppa A, Triassi M, Pennino F, Fiore L. Detection of Enteroviruses in Influent and Effluent Flow Samples from Wastewater Treatment Plants in Italy. *Food Environ Virol.* 2014a Mar;6(1):13-22. doi: 10.1007/s12560-013-9132-2.
- Battistone A, Buttinelli G, Fiore S, Amato C, Bonomo P, Patti AM, Vulcano A, Barbi M, Binda S, Pellegrinelli L, Tanzi ML, Affanni P, Castiglia P, Germinario C, Mercurio P, Cicala A, Triassi M, Pennino F, Fiore L. Sporadic isolation of sabin-like polioviruses and high-level detection of non-polio enteroviruses during sewage surveillance in seven Italian cities, after several years of inactivated poliovirus vaccination. *Appl Environ Microbiol.* 2014b Aug;80(15):4491-501. doi: 10.1128/AEM.00108-14.
- Begier EM, Oberste MS, Landry ML, Brennan T, Mlynarski D, Mshar PA, Frenette K, Rabatsky-Ehr T, Purviance K, Nepaul A, Nix WA, Pallansch MA, Ferguson D, Cartter ML, Hadler JL. An outbreak of concurrent echovirus 30 and coxsackievirus A1 infections associated with sea swimming among a group of travelers to Mexico. *Clin Infect Dis.* 2008 Sep 1;47(5):616-23. doi: 10.1086/590562.

- Ben-Chetrit E, Wiener-Well Y, Shulman LM, Cohen MJ, Elinav H, Sofer D, Feldman I, Marva E, Wolf DG. Coxsackievirus A6-related hand foot and mouth disease: skin manifestations in a cluster of adult patients. *J Clin Virol*. 2014 Mar;59(3):201-3. doi: 10.1016/j.jcv.2013.12.012.
- Benschop KSM, Broberg EK, Hodcroft E, Schmitz D, Albert J, Baicus A, Bailly JL, Baldvinsdottir G, Berginc N, Blomqvist S, Böttcher S, Brytting M, Bujaki E, Cabrerizo M, Celma C, Cinek O, Claas ECJ, Cremer J, Dean J, Dembinski JL, Demchyshyna I, Diedrich S, Dudman S, Dunning J, Dyrda R, Emmanouil M, Farkas A, De Gascun C, Fournier G, Georgieva I, Gonzalez-Sanz R, van Hooydonk-Elving J, Jääskeläinen AJ, Jancauskaite R, Keeren K, Fischer TK, Krokstad S, Nikolaeva-Glomb L, Novakova L, Midgley SE, Mirand A, Molenkamp R, Morley U, Mossong J, Muralyte S, Murk JL, Nguyen T, Nordbø SA, Österback R, Pas S, Pellegrinelli L, Pogka V, Prochazka B, Rainetova P, Van Ranst M, Roorda L, Schuffenecker I, Schuurman R, Stoyanova A, Templeton K, Verweij JJ, Voulgari-Kokota A, Vuorinen T, Wollants E, Wolthers KC, Zakikhany K, Neher R, Harvala H, Simmonds P. Molecular Epidemiology and Evolutionary Trajectory of Emerging Echovirus 30, Europe. *Emerg Infect Dis*. 2021 Jun;27(6):1616-1626. doi: 10.3201/eid2706.203096.
- Benschop KSM, van der Avoort HG, Jusic E, Vennema H, van Binnendijk R, Duizer E. Polio and Measles Down the Drain: Environmental Enterovirus Surveillance in the Netherlands, 2005 to 2015. *Appl Environ Microbiol*. 2017 Jun 16;83(13):e00558-17. doi: 10.1128/AEM.00558-17.
- Bessaud M, Delpeyroux F. Enteroviruses-the famous unknowns. *Lancet Infect Dis*. 2020 Mar;20(3):268-269. doi: 10.1016/S1473-3099(19)30636-X.
- Bessaud M, Pillet S, Ibrahim W, Joffret ML, Pozzetto B, Delpeyroux F, Gouandjika-Vasilache I. Molecular characterization of human enteroviruses in the Central African Republic: uncovering wide diversity and identification of a new human enterovirus A71 genogroup. *J Clin Microbiol*. 2012 May;50(5):1650-8. doi: 10.1128/JCM.06657-11.
- Bessaud M, Razafindratsimandresy R, Nougairède A, Joffret ML, Deshpande JM, Dubot-Pérès A, Héraud JM, de Lamballerie X, Delpeyroux F, Bailly JL. Molecular comparison and evolutionary analyses of VP1 nucleotide sequences of new African human enterovirus 71 isolates reveal a wide genetic diversity. *PLoS One*. 2014 Mar 5;9(3):e90624. doi: 10.1371/journal.pone.0090624.
- Bessaud M, Sadeuh-Mba SA, Joffret ML, Razafindratsimandresy R, Polston P, Volle R, Rakoto-Andrianarivelo M, Blondel B, Njouom R, Delpeyroux F. Whole Genome Sequencing of Enterovirus species C Isolates by High-Throughput Sequencing: Development of Generic Primers. *Front Microbiol*. 2016 Aug 26;7:1294. doi: 10.3389/fmicb.2016.01294.
- Bian L, Gao F, Mao Q, Sun S, Wu X, Liu S, Yang X, Liang Z. Hand, foot, and mouth disease associated with coxsackievirus A10: more serious than it seems. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2019 Apr;17(4):233-242. doi: 10.1080/14787210.2019.1585242.
- Bisseux M, Colombet J, Mirand A, Roque-Afonso AM, Abravanel F, Izopet J, Archimbaud C, Peigue-Lafeuille H, Debroas D, Bailly JL, Henquell C. Monitoring human enteric viruses in wastewater and relevance to infections encountered in the clinical setting: a one-year experiment in central France, 2014 to 2015. *Euro Surveill*. 2018 Feb;23(7):17-00237. doi: 10.2807/1560-7917.ES.2018.23.7.17-00237.
- Bisseux M, Debroas D, Mirand A, Archimbaud C, Peigue-Lafeuille H, Bailly JL, Henquell C. Monitoring of enterovirus diversity in wastewater by ultra-deep sequencing: An effective complementary tool for clinical enterovirus surveillance. *Water Res*. 2020 Feb 1;169:115246. doi: 10.1016/j.watres.2019.115246.
- Blomqvist S, Klemola P, Kajjalainen S, Paananen A, Simonen ML, Vuorinen T, Roivainen M. Co-circulation of coxsackieviruses A6 and A10 in hand, foot and mouth disease outbreak in Finland. *J Clin Virol*. 2010 May;48(1):49-54. doi: 10.1016/j.jcv.2010.02.002.
- Bosch A, Guix S, Sano D, Pintó RM. New tools for the study and direct surveillance of viral pathogens in water. *Curr Opin Biotechnol*. 2008 Jun;19(3):295-301. doi: 10.1016/j.copbio.2008.04.006.
- Böttcher S, Diedrich S, Keeren K; The Laboratory Network For Enterovirus Diagnostic LaNED. Increased detection of enterovirus A71 infections, Germany, 2019. *Euro Surveill*. 2019 Sep;24(39):1900556. doi: 10.2807/1560-7917.ES.2019.24.39.1900556.
- Böttcher S, Obermeier PE, Neubauer K, Diedrich S; Laboratory Network for Enterovirus Diagnostics. Recombinant Enterovirus A71 Subgenogroup C1 Strains, Germany, 2015. *Emerg Infect Dis*. 2016 Oct;22(10):1843-1846. doi: 10.3201/eid2210.160357.
- Brinkman NE, Fout GS, Keely SP. Retrospective Surveillance of Wastewater To Examine Seasonal Dynamics of Enterovirus Infections. *mSphere*. 2017 Jun 14;2(3):e00099-17. doi: 10.1128/mSphere.00099-17.
- Broccolo F, Drago F, Ciccarese G, Genoni A, Puggioni A, Rosa GM, Parodi A, Manukyan H, Laassri M, Chumakov K, Toniolo A. Severe atypical hand-foot-and-mouth disease in adults due to coxsackievirus A6: Clinical presentation and phylogenesis of CV-A6 strains. *J Clin Virol*. 2019 Jan;110:1-6. doi: 10.1016/j.jcv.2018.11.003.
- Brouwer L, Benschop KSM, Nguyen D, Kamau E, Pajkrt D, Simmonds P, Wolthers KC. Recombination Analysis of Non-Poliovirus Members of the Enterovirus C Species; Restriction of Recombination Events to Members of the Same 3DPol Cluster. *Viruses*. 2020 Jun 30;12(7):706. doi: 10.3390/v12070706.
- Brouwer L, Moreni G, Wolthers KC, Pajkrt D. World-Wide Prevalence and Genotype Distribution of Enteroviruses. *Viruses*. 2021 Mar 8;13(3):434. doi: 10.3390/v13030434.

- Brown B, Oberste MS, Maher K, Pallansch MA. Complete genomic sequencing shows that polioviruses and members of human enterovirus species C are closely related in the noncapsid coding region. *J Virol*. 2003 Aug;77(16):8973-84. doi: 10.1128/jvi.77.16.8973-8984.2003.
- Brown BA, Maher K, Flemister MR, Naraghi-Arani P, Uddin M, Oberste MS, Pallansch MA. Resolving ambiguities in genetic typing of human enterovirus species C clinical isolates and identification of enterovirus 96, 99 and 102. *J Gen Virol*. 2009 Jul;90(Pt 7):1713-1723. doi: 10.1099/vir.0.008540-0.
- Brown BA, Oberste MS, Alexander JP Jr, Kennett ML, Pallansch MA. Molecular epidemiology and evolution of enterovirus 71 strains isolated from 1970 to 1998. *J Virol*. 1999 Dec;73(12):9969-75. doi: 10.1128/JVI.73.12.9969-9975.1999. Erratum in: *J Virol*. 2000 Dec;74(24):12003. PMID: 10559310; PMCID: PMC113047.
- Brown DM, Zhang Y, Scheuermann RH. Epidemiology and Sequence-Based Evolutionary Analysis of Circulating Non-Polio Enteroviruses. *Microorganisms*. 2020 Nov 25;8(12):1856. doi: 10.3390/microorganisms8121856.
- Bubba L, Broberg EK, Jasir A, Simmonds P, Harvala H, Enterovirus study collaborators. Circulation of non-polio enteroviruses in 24 EU and EEA countries between 2015 and 2017: a retrospective surveillance study. *Lancet Infect Dis*. 2020 Mar;20(3):350-361. doi: 10.1016/S1473-3099(19)30566-3.
- Buchta D, Füzik T, Hrebík D, Levčanský Y, Sukeník L, Mukhamedova L, Moravcová J, Vácha R, Plevka P. Enterovirus particles expel capsid pentamers to enable genome release. *Nat Commun*. 2019 Mar 8;10(1):1138. doi: 10.1038/s41467-019-09132-x.
- Burns CC, Diop OM, Sutter RW, Kew OM. Vaccine-derived polioviruses. *J Infect Dis*. 2014 Nov 1;210 Suppl 1:S283-93. doi: 10.1093/infdis/jiu295.
- Carballo CM, Erro MG, Sordelli N, Vazquez G, Mistchenko AS, Cejas C, Rodríguez M, Cisterna DM, Freire MC, Contrini MM, Lopez EL. Acute Flaccid Myelitis Associated with Enterovirus D68 in Children, Argentina, 2016. *Emerg Infect Dis*. 2019 Mar;25(3):573-576. doi: 10.3201/eid2503.170897.
- Carney S, Brown D, Siqueira MM, Dias JP, da Silva EE. Enterovirus D68 detected in children with severe acute respiratory illness in Brazil. *Emerg Microbes Infect*. 2015 Oct;4(10):e66. doi: 10.1038/emi.2015.66.
- Carrion G, Huaman JL, Silva M, Ampuero JS, Paz I, Ocaña VR, Laguna-Torres VA, Hontz RD. Molecular epidemiology of coxsackievirus A16 strains from four sentinel surveillance sites in Peru. *Int J Infect Dis*. 2016 Nov;52:83-85. doi: 10.1016/j.ijid.2016.10.003.
- Casemiro KM, Burlandy FM, Barbosa MR, Chen Q, Jorba J, Hachich EM, Sato MI, Burns CC, da Silva EE. Molecular and Phenotypic Characterization of a Highly Evolved Type 2 Vaccine-Derived Poliovirus Isolated from Seawater in Brazil, 2014. *PLoS One*. 2016 Mar 28;11(3):e0152251. doi: 10.1371/journal.pone.0152251.
- Castro CM, Cruz AC, Silva EE, Gomes Mde L. Molecular and seroepidemiologic studies of Enterovirus 71 infection in the State of Para, Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2005 Mar-Apr;47(2):65-71. doi: 10.1590/s0036-46652005000200002.
- Centers for Disease Control and Prevention (2021a). Non-Polio Enterovirus. Transmission. Disponible desde: <https://www.cdc.gov/non-polio-enterovirus/about/transmission.html>
- Centers for Disease Control and Prevention (2021b). Global Immunization. Our Progress Against Polio. Disponible desde: <https://www.cdc.gov/polio/progress/index.htm>
- Centers for Disease Control and Prevention (2021c). Hand, Foot, and Mouth Disease (HFMD). Disponible desde: <https://www.cdc.gov/hand-foot-mouth/index.html>
- Centers for Disease Control and Prevention. Update on vaccine-derived polioviruses--worldwide, January 2008-June 2009. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. 2009 Sep 18;58(36):1002-6. PMID: 19763076.
- Centers for Disease Control and Prevention. Update: Outbreak of poliomyelitis--Dominican Republic and Haiti, 2000-2001. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. 2001 Oct 5;50(39):855-6. PMID: 11665846.
- Chacón I. (2012) Desarrollo de una metodología basada en biología molecular para la rápida detección de enterovirus en muestras clínicas. Tesis de grado. Licenciatura en Ciencias Biológicas. Opción Biología Celular y Molecular. Facultad de Ciencias. Universidad de la República. Montevideo-Uruguay.
- Chang LY, Huang LM, Gau SS, Wu YY, Hsia SH, Fan TY, Lin KL, Huang YC, Lu CY, Lin TY. Neurodevelopment and cognition in children after enterovirus 71 infection. *N Engl J Med*. 2007 Mar 22;356(12):1226-34. doi: 10.1056/NEJMoa065954.
- Chen CH, Hsu BM, Wan MT. Molecular detection and prevalence of enterovirus within environmental water in Taiwan. *J Appl Microbiol*. 2008 Mar;104(3):817-23. doi: 10.1111/j.1365-2672.2007.03598.x.
- Chen L, Xu SJ, Yao XJ, Yang H, Zhang HL, Meng J, Zeng HR, Huang XH, Zhang RL, He YQ. Molecular epidemiology of enteroviruses associated with severe hand, foot and mouth disease in Shenzhen, China, 2014-2018. *Arch Virol*. 2020 Oct;165(10):2213-2227. doi: 10.1007/s00705-020-04734-z.
- Chen W, Weng YW, He WX, Zhu Y, Yu TT, Xie JF, Zheng KC, Yan YS, Zhang YJ, Zhang WC. RT-nPCR Assays for Amplification and Sequencing of VP1 Genes in Human Enterovirus A-D from Clinical Specimens. *Biomed Environ Sci*. 2020 Nov 20;33(11):829-838. doi: 10.3967/bes2020.113.
- Chen W, Weng YW, Zhang YJ, He WX, Zhu Y, Yu TT, Xie JF, Zheng KC, Yan YS, Zhang WC. Molecular Epidemiology of Coxsackievirus B1-5 Associated with HFMD in Fujian Province, China, 2011-2016. *Biomed Environ Sci*. 2019 Aug;32(8):633-638. doi: 10.3967/bes2019.082.

- Chitambar S, Gopalkrishna V, Chhabra P, Patil P, Verma H, Lahon A, Arora R, Tatte V, Ranshing S, Dhale G, Kolhapure R, Tikute S, Kulkarni J, Bhardwaj R, Akarte S, Pawar S. Diversity in the enteric viruses detected in outbreaks of gastroenteritis from Mumbai, Western India. *Int J Environ Res Public Health*. 2012 Mar;9(3):895-915. doi: 10.3390/ijerph9030895.
- Chong CY, Chan KP, Shah VA, Ng WY, Lau G, Teo TE, Lai SH, Ling AE. Hand, foot and mouth disease in Singapore: a comparison of fatal and non-fatal cases. *Acta Paediatr*. 2003 Oct;92(10):1163-9. PMID: 14632332.
- Christovão Dde A, Iaria ST, Candeias JA. Condições sanitárias das águas de irrigação de hortas do município de São Paulo. II. Isolamento de vírus entéricos. *Rev Saude Publica*. 1967 Jun;1(1):12-7. doi: 10.1590/s0034-89101967000100003.
- Cisterna D, Lema C, Riviello Lopez G, Freyre L, Martinez L, Torres C, Mbayed V, Freire MC. Detección y caracterización de Enterovirus y Hepatitis A en el Riachuelo y Río de la Plata. IX Congreso Argentino de Virología. *Rev Argent Microbiol*. 2008, Supl. 1.
- Cisterna DM, Lema CL, Martinez LM, Verón E, Contarino LP, Acosta D, Freire MC. Atypical hand, foot, and mouth disease caused by Coxsackievirus A6 in Argentina in 2015. *Rev Argent Microbiol*. 2019 Apr-Jun;51(2):140-143. doi: 10.1016/j.ram.2018.05.003.
- Cisterna DM, Palacios G, Rivero K, Girard D, Lema C, Freire MC. Epidemiologia de los enterovirus asociados a enfermedades neurológicas. *Medicina (B Aires)*. 2007;67(2):113-9. PMID: 17593593.
- Committee on the ECHO Viruses. ENTERIC cytopathogenic human orphan (ECHO) viruses. *Science*. 1955 Dec 16;122(3181):1187-8. PMID: 13274079.
- Compagnoli Carmona RC, Caetano Machado B, Aparecida de Sousa C, Vieira HR, Moraes Alves MR, Farias de Souza KA, de Souza Gregório D, Costa Vilanova B, Sampaio Tavares Timenetsky MDC. Distribution of species enterovirus B in patients with central nervous system infections in São Paulo State, Brazil. *J Med Virol*. 2020 Jun 3. doi: 10.1002/jmv.26131.
- Connell C, Tong HI, Wang Z, Allmann E, Lu Y. New approaches for enhanced detection of enteroviruses from Hawaiian environmental waters. *PLoS One*. 2012;7(5):e32442. doi: 10.1371/journal.pone.0032442.
- Cristanziano VD, Böttcher S, Diedrich S, Timmen-Wego M, Knops E, Lübke N, Kaiser R, Pfister H, Kaboré Y, D'Alfonso R. Detection and characterization of enteroviruses and parechoviruses in healthy people living in the South of Côte d'Ivoire. *J Clin Virol*. 2015 Oct;71:40-3. doi: 10.1016/j.jcv.2015.08.004. Erratum in: *J Clin Virol*. 2015 Nov;72:153.
- da Silva EE, Fillipis AM, Schatzmayr HG, Cortes LC. Evidence of enterovirus 71 infections in Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1990 Jan-Mar;85(1):131-2. doi: 10.1590/s0074-02761990000100025.
- da Silva EE, Winkler MT, Pallansch MA. Role of enterovirus 71 in acute flaccid paralysis after the eradication of poliovirus in Brazil. *Emerg Infect Dis*. 1996 Jul-Sep;2(3):231-3. doi: 10.3201/eid0203.960312.
- Dai W, Zhang C, Zhang X, Xiong P, Liu Q, Gong S, Geng L, Zhou D, Huang Z. A virus-like particle vaccine confers protection against enterovirus D68 lethal challenge in mice. *Vaccine*. 2018 Jan 29;36(5):653-659. doi: 10.1016/j.vaccine.2017.12.057.
- Dalldorf G, Sickles GM. An Unidentified, Filtrable Agent Isolated From the Feces of Children With Paralysis. *Science*. 1948 Jul 16;108(2794):61-2. doi: 10.1126/science.108.2794.61.
- Dayan GH, Rodríguez R, Vinjé J, Váscónez N, Cáceres V, Gregoricus N, Sobsey M, Landaverde M. Assessment of areas at increased risk for poliovirus circulation in Ecuador. *Epidemiol Infect*. 2004 Oct;132(5):787-95. doi: 10.1017/s0950268804002626.
- de Oliveira Pereira JS, da Silva LR, de Meireles Nunes A, de Souza Oliveira S, da Costa EV, da Silva EE. Environmental Surveillance of Polioviruses in Rio de Janeiro, Brazil, in Support to the Activities of Global Polio Eradication Initiative. *Food Environ Virol*. 2016 Mar;8(1):27-33. doi: 10.1007/s12560-015-9221-5.
- de Quadros CA, Hersh BS, Olivé JM, Andrus JK, da Silveira CM, Carrasco PA. Eradication of wild poliovirus from the Americas: acute flaccid paralysis surveillance, 1988-1995. *J Infect Dis*. 1997 Feb;175 Suppl 1:S37-42. doi: 10.1093/infdis/175.supplement_1.s37.
- de Sousa IP Jr, Giamberardino HI, Raboni SM, Debur MC, de Lourdes Aguiar Oliveira M, Burlandy FM, da Silva EE. Simultaneous enterovirus EV-D68 and CVA6 infections causing acute respiratory distress syndrome and hand, foot and mouth disease. *Virol J*. 2021 Apr 30;18(1):88. doi: 10.1186/s12985-021-01560-w.
- Deshpande JM, Nadkarni SS, Francis PP. Enterovirus 71 isolated from a case of acute flaccid paralysis in India represents a new genotype. *Current Science*. 2003;84(10):1350-1353. <http://www.jstor.org/stable/24108469>.
- Diop OM, Burns CC, Wassilak SG, Kew OM; Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Update on vaccine-derived polioviruses - worldwide, July 2012-December 2013. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. 2014 Mar 21;63(11):242-8. PMID: 24647401; PMCID: PMC4584635.
- Diop OM, Kew OM, de Gourville EM, Pallansch MA. The Global Polio Laboratory Network as a Platform for the Viral Vaccine-Preventable and Emerging Diseases Laboratory Networks. *J Infect Dis*. 2017 Jul 1;216(suppl_1):S299-S307. doi: 10.1093/infdis/jix092.
- Domingo E, Sheldon J, Perales C. Viral quasispecies evolution. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2012 Jun;76(2):159-216. doi: 10.1128/MMBR.05023-11.
- Dos Santos GP, da Costa EV, Tavares FN, da Costa LJ, da Silva EE. Genetic diversity of Echovirus 30 involved in aseptic meningitis cases in Brazil (1998-2008). *J Med Virol*. 2011 Dec;83(12):2164-71. doi: 10.1002/jmv.22235.

- Dos Santos GP, Skraba I, Oliveira D, Lima AA, de Melo MM, Kmetzsch CI, da Costa EV, da Silva EE. Enterovirus meningitis in Brazil, 1998-2003. *J Med Virol*. 2006 Jan;78(1):98-104. doi: 10.1002/jmv.20509.
- Dotzauer A, Kraemer L. Innate and adaptive immune responses against picornaviruses and their counteractions: An overview. *World J Virol*. 2012, 1:91-107. doi: 10.5501/wjv.v1.i3.91.
- Dutkiewicz M, Stachowiak A, Swiatkowska A, Ciesiolka J. Structure and function of RNA elements present in enteroviral genomes. *Acta Biochim Pol*. 2016;63(4):623-630. doi: 10.18388/abp.2016_1337.
- Elrick MJ, Pekosz A, Duggal P. Enterovirus D68 molecular and cellular biology and pathogenesis. *J Biol Chem*. 2021 Jan-Jun;296:100317. doi: 10.1016/j.jbc.2021.100317. Erratum in: *J Biol Chem*. 2021 Jan-Jun;296:100587.
- Esposito S, Principi N. Hand, foot and mouth disease: current knowledge on clinical manifestations, epidemiology, aetiology and prevention. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2018 Mar;37(3):391-398. doi: 10.1007/s10096-018-3206-x.
- Esteves-Jaramillo A, Estívariz CF, Peñaranda S, Richardson VL, Reyna J, Coronel DL, Carrión V, Landaverde JM, Wassilak SG, Pérez-Sánchez EE, López-Martínez I, Burns CC, Pallansch MA. Detection of vaccine-derived polioviruses in Mexico using environmental surveillance. *J Infect Dis*. 2014 Nov 1;210 Suppl 1:S315-23. doi: 10.1093/infdis/jiu183.
- Faleye TO, Adeniji JA. Enterovirus Species B Bias of RD Cell Line and Its Influence on Enterovirus Diversity Landscape. *Food Environ Virol*. 2015 Dec;7(4):390-402. doi: 10.1007/s12560-015-9215-3.
- Faleye TO, Adewumi MO, Adeniji JA. Defining the Enterovirus Diversity Landscape of a Fecal Sample: A Methodological Challenge? *Viruses*. 2016 Jan 12;8(1):18. doi: 10.3390/v8010018.
- Falleiros-Arlant LH, Ayala SEG, Domingues C, Brea J, Colsa-Ranero A. Current status of poliomyelitis in Latin America. *Rev Chilena Infectol*. 2020 Dec;37(6):701-709. doi: 10.4067/S0716-10182020000600701.
- Fang Y, Wang S, Zhang L, Guo Z, Huang Z, Tu C, Zhu BP. Risk factors of severe hand, foot and mouth disease: a meta-analysis. *Scand J Infect Dis*. 2014 Jul;46(7):515-22. doi: 10.3109/00365548.2014.907929.
- Farías A, Cabrerizo M, Ré V, Glatstein N, Pisano B, Spinsanti L, Contigiani MS. Molecular identification of human enteroviruses in children with neurological infections from the central region of Argentina. *Arch Virol*. 2011 Jan;156(1):129-33. doi: 10.1007/s00705-010-0828-4.
- Farías AA, Mojsiejczuk LN, Flores FS, Aguilar JJ, Prez VE, Masachessi G, Nates SV. Environmental Surveillance of Human Enteroviruses in Córdoba City, Argentina: Prevalence and Detection of Serotypes from 2009 to 2014. *Food Environ Virol*. 2019 Jun;11(2):198-203. doi: 10.1007/s12560-019-09379-z.
- Farías AA, Mojsiejczuk LN, Pisano MB, Flores FS, Aguilar JJ, Jean AN, Yanes LA, Masachessi G, Prez VE, Isa MB, Campos RH, Ré VE, Nates SV. Environmental Surveillance of Enteroviruses in Central Argentina: First Detection and Evolutionary Analyses of E14. *Food Environ Virol*. 2018 Mar;10(1):121-126. doi: 10.1007/s12560-017-9318-0.
- Fernandez-Cassi X, Timoneda N, Martínez-Puchol S, Rusiñol M, Rodríguez-Manzano J, Figuerola N, Bofill-Mas S, Abril JF, Girones R. Metagenomics for the study of viruses in urban sewage as a tool for public health surveillance. *Sci Total Environ*. 2018 Mar 15;618:870-880. doi: 10.1016/j.scitotenv.2017.08.249.
- Ferreira JE, Ferreira SC, Almeida-Neto C, Nishiya AS, Alencar CS, Gouveia GR, Caiaffa-Filho H, Gomes H, de Macedo Santos RT, Witkin SS, Mendrone-Junior A, Sabino EC. Molecular characterization of viruses associated with encephalitis in São Paulo, Brazil. *PLoS One*. 2019 Jan 14;14(1):e0209993. doi: 10.1371/journal.pone.0209993.
- Ferrer-Orta C, Ferrero D, Verdaguer N. RNA-Dependent RNA Polymerases of Picornaviruses: From the Structure to Regulatory Mechanisms. *Viruses*. 2015, 7(8), 4438–4460. doi: 10.3390/v7082829.
- Flett K, Youngster I, Huang J, McAdam A, Sandora TJ, Rennick M, Smole S, Rogers SL, Nix WA, Oberste MS, Gellis S, Ahmed AA. Hand, foot, and mouth disease caused by coxsackievirus a6. *Emerg Infect Dis*. 2012 Oct;18(10):1702-4. doi: 10.3201/eid1810.120813.
- Flewett TH, Warin RP, Clarke SK. 'Hand, foot, and mouth disease' associated with Coxsackie A5 virus. *J Clin Pathol*. 1963 Jan;16(1):53-5. doi: 10.1136/jcp.16.1.53.
- Freire MC, Cisterna DM, Rivero K, Palacios GF, Casas I, Tenorio A, Gómez JA. Análisis de un brote de meningitis viral en la provincia de Tucumán, Argentina. *Rev Panam Salud Publica*. 2003 Apr;13(4):246-51. doi: 10.1590/s1020-49892003000300007. Erratum in: *Rev Panam Salud Publica*. 2003 Jul;14(1):24.
- Friedrich F, Da-Silva EF, Schatzmayr HG. Type 2 poliovirus recombinants isolated from vaccine-associated cases and from healthy contacts in Brazil. *Acta Virol*. 1996 Feb;40(1):27-33. PMID: 8886095.
- Friedrich F, Filippis AM, Ferreira FC, Schatzmayr HG, Da Silva EE. Genomic characterization of type 1 Sabin-related polioviruses isolated in Brazil. *Acta Virol*. 1995a Feb;39(1):23-9. PMID: 7572466.
- Friedrich F, Filippis AM, Ferreira FC, Schatzmayr HG, Da-Silva EE. Genomic characterization of type 2 polioviruses isolated from vaccine-associated cases in Brazil. *Braz J Med Biol Res*. 1995b Jul;28(7):733-42. PMID: 8580863.
- Furtak V, Roivainen M, Mirochnichenko O, Zagorodnyaya T, Laassri M, Zaidi SZ, Rehman L, Alam MM, Chizhikov V, Chumakov K. Environmental surveillance of viruses by tangential flow filtration and metagenomic reconstruction. *Euro Surveill*. 2016 Apr 14;21(15). doi: 10.2807/1560-7917.ES.2016.21.15.30193. Erratum in: *Euro Surveill*. 2016 May 12;21(19). PMID: 27105043.
- Garon J, Seib K, Orenstein WA, Ramirez Gonzalez A, Chang Blanc D, Zaffran M, Patel M. Polio endgame: the global switch from tOPV to bOPV. *Expert Rev Vaccines*. 2016 Jun;15(6):693-708. doi: 10.1586/14760584.2016.1140041.

- Garon JR, Cochi SL, Orenstein WA. The Challenge of Global Poliomyelitis Eradication. *Infect Dis Clin North Am*. 2015 Dec;29(4):651-65. doi: 10.1016/j.idc.2015.07.003.
- Gauntt CJ. Roles of the humoral response in coxsackievirus B-induced disease. *Curr Top Microbiol Immunol*. 1997;223:259-82. doi: 10.1007/978-3-642-60687-8_12.
- Global Commission for the Certification of Poliomyelitis Eradication (2015) 14th meeting of the Global Commission for the Certification of Poliomyelitis Eradication (GCC). Geneva: World Health Organization. Disponible desde: <http://polioeradication.org/wp-content/uploads/2016/07/1Report.pdf>
- Global Polio Eradication Initiative (2015) Guidelines on environmental surveillance for detection of polioviruses. Working draft - March 2015. Disponible desde: https://polioeradication.org/wp-content/uploads/2016/07/GPLN_GuidelinesES_April2015.pdf
- Gonzalez G, Carr MJ, Kobayashi M, Hanaoka N, Fujimoto T. Enterovirus-Associated Hand-Foot and Mouth Disease and Neurological Complications in Japan and the Rest of the World. *Int J Mol Sci*. 2019 Oct 20;20(20):5201. doi: 10.3390/ijms20205201.
- González MM, Fonseca MC, Rodríguez CA, Giraldo AM, Vila JJ, Castaño JC, Padilla L, Sarmiento L. Environmental Surveillance of Polioviruses in Armenia, Colombia before Trivalent Oral Polio Vaccine Cessation. *Viruses*. 2019 Aug 23;11(9):775. doi: 10.3390/v11090775.
- González MM, Sarmiento L, Rey-Benito GJ, Padilla L, Giraldo AM, Castaño JC. Ausencia de circulación de poliovirus en departamentos colombianos con coberturas vacunales inferiores a 80%. *Rev Panam Salud Publica*. 2012 Aug;32(2):156-60. doi: 10.1590/s1020-49892012000800011.
- González-Sanz R, Casas-Alba D, Launes C, Muñoz-Almagro C, Ruiz-García MM, Alonso M, González-Abad MJ, Megías G, Rabella N, Del Cuerpo M, Gozalo-Margüello M, González-Praetorius A, Martínez-Sapiña A, Goyanes-Galán MJ, Romero MP, Calvo C, Antón A, Imaz M, Aranzamendi M, Hernández-Rodríguez Á, Moreno-Docón A, Rey-Cao S, Navascués A, Otero A, Cabrerizo M. Molecular epidemiology of an enterovirus A71 outbreak associated with severe neurological disease, Spain, 2016. *Euro Surveill*. 2019 Feb;24(7):1800089. doi: 10.2807/1560-7917.ES.2019.24.7.1800089.
- Grenón SL, Robledo ML, von Specht MH, Cisterna DM, Lema CL, Freire MC. Brote epidémico de meningitis viral causado por echovirus tipo 4 en la provincia de Misiones. *Rev Argent Microbiol*. 2008 Jan-Mar;40(1):41-6. PMID: 18669052.
- Hachich EM, Galvani AT, Padula JA, Stoppe NC, Garcia SC, Bonanno VM, Barbosa MR, Sato MI. Pathogenic parasites and enteroviruses in wastewater: support for a regulation on water reuse. *Water Sci Technol*. 2013;67(7):1512-8. doi: 10.2166/wst.2013.019.
- Haramoto E, Katayama H, Utagawa E, Ohgaki S. Recovery of human norovirus from water by virus concentration methods. *J Virol Methods*. 2009 Sep;160(1-2):206-9. doi: 10.1016/j.jviromet.2009.05.002.
- Harris KG, Coyne CB. Death waits for no man--does it wait for a virus? How enteroviruses induce and control cell death. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2014 Oct;25(5):587-96. doi: 10.1016/j.cytogfr.2014.08.002.
- Harvala H, Broberg E, Benschop K, Berginc N, Ladhani S, Susi P, Christiansen C, McKenna J, Allen D, Makiello P, McAllister G, Carmen M, Zakikhany K, Dyrda R, Nielsen X, Madsen T, Paul J, Moore C, von Eije K, Piralla A, Carlier M, Vanoverschelde L, Poelman R, Anton A, López-Labrador FX, Pellegrinelli L, Keeren K, Maier M, Cassidy H, Derdas S, Savolainen-Kopra C, Diedrich S, Nordbø S, Buesa J, Bailly JL, Baldanti F, MacAdam A, Mirand A, Dudman S, Schuffenecker I, Kadambari S, Neyts J, Griffiths MJ, Richter J, Margaretto C, Govind S, Morley U, Adams O, Krokstad S, Dean J, Pons-Salort M, Prochazka B, Cabrerizo M, Majumdar M, Nebbia G, Wiewel M, Cottrell S, Coyle P, Martin J, Moore C, Midgley S, Horby P, Wolthers K, Simmonds P, Niesters H, Fischer TK. Recommendations for enterovirus diagnostics and characterisation within and beyond Europe. *J Clin Virol*. 2018 Apr;101:11-17. doi: 10.1016/j.jcv.2018.01.008.
- Harvala H, Calvert J, Van Nguyen D, Clasper L, Gadsby N, Molyneaux P, Templeton K, McWilliams Leitch C, Simmonds P. Comparison of diagnostic clinical samples and environmental sampling for enterovirus and parechovirus surveillance in Scotland, 2010 to 2012. *Euro Surveill*. 2014 Apr 17;19(15):20772. doi: 10.2807/1560-7917.es2014.19.15.20772.
- Hassel C, Mirand A, Farkas A, Diedrich S, Huemer HP, Peigue-Lafeuille H, Archimbaud C, Henquell C, Bailly JL; HFMD French Study Network. Phylogeography of Coxsackievirus A16 Reveals Global Transmission Pathways and Recent Emergence and Spread of a Recombinant Genogroup. *J Virol*. 2017 Aug 24;91(18):e00630-17. doi: 10.1128/JVI.00630-17.
- Hernández E. (2014) Tipificación de enterovirus no polio comunitarios causantes de neuvirosis en niños uruguayos. Tesina de grado. Licenciatura en Bioquímica. Facultad de Ciencias. Universidad de la República. Montevideo-Uruguay.
- Hidalgo S, García Erro M, Cisterna D, Freire MC. Paralytic poliomyelitis caused by a vaccine-derived polio virus in an antibody-deficient Argentinean child. *Pediatr Infect Dis J*. 2003 Jun;22(6):570-2. PMID: 12828159.
- Hixon AM, Frost J, Rudy MJ, Messacar K, Clarke P, Tyler KL. Understanding Enterovirus D68-Induced Neurologic Disease: A Basic Science Review. *Viruses*. 2019 Sep 4;11(9):821. doi: 10.3390/v11090821.
- Hjelmsø MH, Hellmér M, Fernandez-Cassi X, Timoneda N, Lukjancenko O, Seidel M, Elsässer D, Aarestrup FM, Löfström C, Bofill-Mas S, Abril JF, Girones R, Schultz AC. Evaluation of Methods for the Concentration and Extraction of

- Viruses from Sewage in the Context of Metagenomic Sequencing. *PLoS One*. 2017 Jan 18;12(1):e0170199. doi: 10.1371/journal.pone.0170199.
- Hoa-Tran TN, Dao ATH, Nguyen AT, Kataoka C, Takemura T, Pham CH, Vu HM, Hong TTT, Ha NTV, Duong TN, Thanh NTH, Shimizu H. Coxsackieviruses A6 and A16 associated with hand, foot, and mouth disease in Vietnam, 2008-2017: Essential information for rational vaccine design. *Vaccine*. 2020 Dec 14;38(52):8273-8285. doi: 10.1016/j.vaccine.2020.11.031.
- Holm-Hansen CC, Midgley SE, Fischer TK. Global emergence of enterovirus D68: a systematic review. *Lancet Infect Dis*. 2016 May;16(5):e64-e75. doi: 10.1016/S1473-3099(15)00543-5.
- Hongyan G, Chengjie M, Qiaozhi Y, Wenhao H, Juan L, Lin P, Yanli X, Hongshan W, Xingwang L. Hand, foot and mouth disease caused by coxsackievirus A6, Beijing, 2013. *Pediatr Infect Dis J*. 2014 Dec;33(12):1302-3. doi: 10.1097/INF.0000000000000467.
- Horner LM, Poulter MD, Brenton JN, Turner RB. Acute Flaccid Paralysis Associated with Novel Enterovirus C105. *Emerg Infect Dis*. 2015 Oct;21(10):1858-60. doi: 10.3201/eid2110.150759.
- Horsten HH, Kemp M, Fischer TK, Lindahl KH, Bygum A. Atypical Hand, Foot, and Mouth Disease Caused by Coxsackievirus A6 in Denmark: A Diagnostic Mimicker. *Acta Derm Venereol*. 2018 Mar 13;98(3):350-354. doi: 10.2340/00015555-2853.
- Hovi T, Roivainen M, Blomqvist S: Enteroviruses with special reference to poliovirus and poliomyelitis eradication. In *Human Viruses in Water*. Edited by Bosch A. The Netherlands: Amsterdam; 2007:69-89.
- Hovi T, Shulman LM, van der Avoort H, Deshpande J, Roivainen M, DE Gourville EM. Role of environmental poliovirus surveillance in global polio eradication and beyond. *Epidemiol Infect*. 2012 Jan;140(1):1-13. doi: 10.1017/S095026881000316X.
- Hsu BM, Chen CH, Wan MT. Prevalence of enteroviruses in hot spring recreation areas of Taiwan. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2008 Mar;52(2):253-9. doi: 10.1111/j.1574-695X.2008.00379.x.
- Hu Y, Musharrafieh R, Zheng M, Wang J. Enterovirus D68 Antivirals: Past, Present, and Future. *ACS Infect Dis*. 2020 Jul 10;6(7):1572-1586. doi: 10.1021/acsinfecdis.0c00120.
- Huaman JL, Carrion G, Ampuero JS, Gomez J, Ocaña V, Paz I, Gomez E, Chavez E, Sarmiento F, Pozo E, Laguna-Torres VA, Halsey ES. Non-rhinovirus enteroviruses associated with respiratory infections in Peru (2005-2010). *Virol J*. 2014 Sep 22;11:169. doi: 10.1186/1743-422X-11-169.
- Huaman JL, Carrion G, Ampuero JS, Ocaña V, Laguna-Torres VA, Hontz RD. Enterovirus-71 genotype C isolated in Peru between 2006 and 2009. *J Clin Virol*. 2016 Dec;85:40-43. doi: 10.1016/j.jcv.2016.10.023.
- Huang MC, Wang SM, Hsu YW, Lin HC, Chi CY, Liu CC. Long-term cognitive and motor deficits after enterovirus 71 brainstem encephalitis in children. *Pediatrics*. 2006 Dec;118(6):e1785-8. doi: 10.1542/peds.2006-1547.
- Huang SC, Hsu YW, Wang HC, Huang SW, Kiang D, Tsai HP, Wang SM, Liu CC, Lin KH, Su IJ, Wang JR. Appearance of intratypic recombination of enterovirus 71 in Taiwan from 2002 to 2005. *Virus Res*. 2008 Feb;131(2):250-9. doi: 10.1016/j.virusres.2007.10.002.
- Huang WC, Huang LM, Lu CY, Cheng AL, Chang LY. Atypical hand-foot-mouth disease in children: a hospital-based prospective cohort study. *Virol J*. 2013 Jun 24;10:209. doi: 10.1186/1743-422X-10-209.
- Huang Y, Zhou Y, Lu H, Yang H, Feng Q, Dai Y, Chen L, Yu S, Yao X, Zhang H, Jiang M, Wang Y, Han N, Hu G, He Y. Characterization of severe hand, foot, and mouth disease in Shenzhen, China, 2009-2013. *J Med Virol*. 2015 Sep;87(9):1471-9. doi: 10.1002/jmv.24200.
- Huber S, Ramsingh AI. Coxsackievirus-induced pancreatitis. *Viral Immunol*. 2004;17(3):358-69. doi: 10.1089/vim.2004.17.358.
- Hyypiä T, Hovi T, Knowles NJ, Stanway G. Classification of enteroviruses based on molecular and biological properties. *J Gen Virol*. 1997 Jan;78 (Pt 1):1-11. doi: 10.1099/0022-1317-78-1-1.
- Instituto Nacional de Estadística y Censos de la República Argentina (2021). Censo Nacional de Población, Hogares y Viviendas. Disponible desde: <https://www.indec.gob.ar/indec/web/Nivel4-Tema-2-41-135>
- Irani DN. Aseptic meningitis and viral myelitis. *Neurol Clin*. 2008, 26, 635–655, pp. vii–viii.
- Iturriza-Gómara M, Megson B, Gray J. Molecular detection and characterization of human enteroviruses directly from clinical samples using RT-PCR and DNA sequencing. *J Med Virol*. 2006 Feb;78(2):243-53. doi: 10.1002/jmv.20533.
- Ivanova OE, Yarmolskaya MS, Ereemeeva TP, Babkina GM, Baykova OY, Akhmadishina LV, Krasota AY, Kozlovskaya LI, & Lukashev AN. Environmental Surveillance for Poliovirus and Other Enteroviruses: Long-Term Experience in Moscow, Russian Federation, 2004–2017. *Viruses*. 2019, 11(5), 424. doi: 10.3390/v11050424.
- Jack I, Chenoweth RA. Herpangina: ulcerative pharyngitis with the isolation of Coxsackie virus. *Med J Aust*. 1958 May 31;45(22):741-2. doi: 10.5694/j.1326-5377.1958.tb86760.x.
- Joffret ML, Polston PM, Razafindratsimandresy R, Bessaud M, Heraud JM, & Delpeyroux F. Whole Genome Sequencing of Enteroviruses Species A to D by High-Throughput Sequencing: Application for Viral Mixtures. *Front Microbiol*. 2018, 9, 2339. doi: 10.3389/fmicb.2018.02339.
- Justino MCA, da S Mesquita D, Souza MF, Farias FP, Dos S Alves JC, Ferreira JL, Lopes DP, Tavares FN. Atypical hand-foot-mouth disease in Belém, Amazon region, northern Brazil, with detection of coxsackievirus A6. *J Clin Virol*. 2020 May;126:104307. doi: 10.1016/j.jcv.2020.104307.

- Kanbayashi D, Kaida A, Yamamoto SP, Hirai Y, Kubo H, Fujimori R, Hakui N, Hirokawa H, Iritani N. Impact of Cocksackievirus A6 emergence on hand, foot, and mouth disease epidemic in Osaka City, Japan. *J Med Virol*. 2017 Dec;89(12):2116-2121. doi: 10.1002/jmv.24905.
- Kapusinszky B, Szomor KN, Farkas A, Takács M, Berencsi G. Detection of non-polio enteroviruses in Hungary 2000-2008 and molecular epidemiology of enterovirus 71, coxsackievirus A16, and echovirus 30. *Virus Genes*. 2010 Apr;40(2):163-73. doi: 10.1007/s11262-009-0440-4.
- Katayama H, Shimasaki A, Ohgaki S. Development of a virus concentration method and its application to detection of enterovirus and norwalk virus from coastal seawater. *Appl Environ Microbiol*. 2002 Mar;68(3):1033-9. doi: 10.1128/AEM.68.3.1033-1039.2002.
- Katoh K, Rozewicki J, Yamada KD. MAFFT online service: multiple sequence alignment, interactive sequence choice and visualization. *Brief Bioinform*. 2019 Jul 19;20(4):1160-1166. doi: 10.1093/bib/bbx108.
- Kew O, Pallansch M. Breaking the Last Chains of Poliovirus Transmission: Progress and Challenges in Global Polio Eradication. *Annu Rev Virol*. 2018 Sep 29;5(1):427-451. doi: 10.1146/annurev-virology-101416-041749.
- Kew OM, Cochi SL, Jafari HS, Wassilak SG, Mast EE, Diop OM, Tangermann RH, Armstrong GL, Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Possible eradication of wild poliovirus type 3--worldwide, 2012. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. 2014 Nov 14;63(45):1031-3. PMID: 25393222; PMCID: PMC5779498.
- Kew OM, Sutter RW, de Gourville EM, Dowdle WR, Pallansch MA. Vaccine-derived polioviruses and the endgame strategy for global polio eradication. *Annu Rev Microbiol*. 2005;59:587-635. doi: 10.1146/annurev.micro.58.030603.123625.
- Khetsuriani N, Lamonte-Fowlkes A, Oberste S, Pallansch MA; Centers for Disease Control and Prevention. Enterovirus surveillance--United States, 1970-2005. *MMWR Surveill Summ*. 2006 Sep 15;55(8):1-20. PMID: 16971890.
- Kilpatrick DR, Ching K, Iber J, Chen Q, Yang SJ, De L, Williams AJ, Mandelbaum M, Sun H, Oberste MS, Kew OM. Identification of vaccine-derived polioviruses using dual-stage real-time RT-PCR. *J Virol Methods*. 2014 Mar;197:25-8. doi: 10.1016/j.jviromet.2013.11.017.
- Kilpatrick DR, Iber JC, Chen Q, Ching K, Yang SJ, De L, Mandelbaum MD, Emery B, Campagnoli R, Burns CC, Kew O. Poliovirus serotype-specific VP1 sequencing primers. *J Virol Methods*. 2011 Jun;174(1-2):128-30. doi: 10.1016/j.jviromet.2011.03.020.
- Kilpatrick DR, Yang CF, Ching K, Vincent A, Iber J, Campagnoli R, Mandelbaum M, De L, Yang SJ, Nix A, Kew OM. Rapid group-, serotype-, and vaccine strain-specific identification of poliovirus isolates by real-time reverse transcription-PCR using degenerate primers and probes containing deoxyinosine residues. *J Clin Microbiol*. 2009 Jun;47(6):1939-41. doi: 10.1128/JCM.00702-09.
- Kim S, Bae KS, Kim JH, Kang JH, Choi UY. Seroprevalence of Neutralizing Antibodies Against Candidate Serotypes of Enterovirus Vaccines Among Korean Children. *Viral Immunol*. 2021 Mar;34(2):62-67. doi: 10.1089/vim.2020.0073.
- Kim Y, Aw TG, Teal TK, Rose JB. Metagenomic Investigation of Viral Communities in Ballast Water. *Environ Sci Technol*. 2015 Jul 21;49(14):8396-407. doi: 10.1021/acs.est.5b01633.
- Kimmis BD, Downing C, Tying S. Hand-foot-and-mouth disease caused by coxsackievirus A6 on the rise. *Cutis*. 2018 Nov;102(5):353-356. PMID: 30566537.
- Kiulia NM, Gonzalez R, Thompson H, Aw TG, Rose JB. Quantification and Trends of Rotavirus and Enterovirus in Untreated Sewage Using Reverse Transcription Droplet Digital PCR. *Food Environ Virol*. 2021 Jun;13(2):154-169. doi: 10.1007/s12560-020-09455-9.
- Klein M, Chong P. Is a multivalent hand, foot, and mouth disease vaccine feasible? *Hum Vaccin Immunother*. 2015;11(11):2688-704. doi: 10.1080/21645515.2015.1049780.
- Kmetzsch CI, Balkie EM, Monteiro A, Costa EV, dos Santos GP, da Silva EE. Echovirus 13 aseptic meningitis, Brazil. *Emerg Infect Dis*. 2006 Aug;12(8):1289-90. doi: 10.3201/eid1708.051317.
- Kobayashi K, Koike S. Cellular receptors for enterovirus A71. *J Biomed Sci*. 2020 Jan 10;27(1):23. doi: 10.1186/s12929-020-0615-9.
- Koskiniemi M, Rautonen J, Lehtokoski-Lehtiniemi E, Vaheri A. Epidemiology of encephalitis in children: a 20-year survey. *Ann Neurol*. 1991 May;29(5):492-7. doi: 10.1002/ana.410290508.
- Kumthip K, Khamrin P, Ushijima H, Maneekarn N. Multiple enterovirus genotypes circulating in children hospitalized with acute gastroenteritis in Thailand. *Infect Genet Evol*. 2017 Nov;55:324-331. doi: 10.1016/j.meegid.2017.10.002.
- Kyriakopoulou Z, Pliaka V, Amoutzias GD, Markoulatos P. Recombination among human non-polio enteroviruses: implications for epidemiology and evolution. *Virus Genes*. 2015 Apr;50(2):177-88. doi: 10.1007/s11262-014-1152-y.
- La Rosa G, Fratini M, della Libera S, Iaconelli M, Muscillo M. Emerging and potentially emerging viruses in water environments. *Ann Ist Super Sanita*. 2012;48(4):397-406. doi: 10.4415/ANN_12_04_07.
- La Rosa G, Pourshaban M, Iaconelli M, Muscillo M. Quantitative real-time PCR of enteric viruses in influent and effluent samples from wastewater treatment plants in Italy. *Ann Ist Super Sanita*. 2010;46(3):266-73. doi: 10.4415/ANN_10_03_07.
- Lai JK, Sam IC, Chan YF. The Autophagic Machinery in Enterovirus Infection. *Viruses*. 2016 Jan 27;8(2):32. doi: 10.3390/v8020032.

- Leguizamón R, Guillén MC, Gómez G, & Bogado MEV. Meningitis en el Hospital Nacional: VI muestra nacional de epidemiología. *Rev Nac (Itauguá)*. 2017, 9(1), 61-77. doi: 10.18004/rdn2017.0009.01.061-077.
- Lei D, Griffiths E, Martin J. WHO working group meeting to develop WHO Recommendations to assure the quality, safety and efficacy of enterovirus 71 vaccines. *Vaccine*. 2020 Jul 6;38(32):4917-4923. doi: 10.1016/j.vaccine.2020.05.001.
- Lema C, Torres C, Van der Sanden S, Cisterna D, Freire MC, Gómez RM. Global phylodynamics of Echovirus 30 revealed differential behavior among viral lineages. *Virology*. 2019 May;531:79-92. doi: 10.1016/j.virol.2019.02.012.
- Li J, Pan H, Wang X, Zhu Q, Ge Y, Cai J, Li Y, Xia A, Hu J, Zeng M. Epidemiological surveillance of hand, foot and mouth disease in Shanghai in 2014-2016, prior to the introduction of the enterovirus 71 vaccine. *Emerg Microbes Infect*. 2018 Mar 21;7(1):37. doi: 10.1038/s41426-018-0035-z.
- Li JL, Yuan J, Yang F, Wu ZQ, Hu YF, Xue Y, Zhou BP, Jin Q. Epidemic characteristics of hand, foot, and mouth disease in southern China, 2013: coxsackievirus A6 has emerged as the predominant causative agent. *J Infect*. 2014 Sep;69(3):299-303. doi: 10.1016/j.jinf.2014.04.001.
- Li M, Zhang T, Gong C, Li A, Luo M, Dong M, Huang F. Human Enterovirus C105, China, 2017. *Emerg Infect Dis*. 2019 Jul;25(7):1414-1416. doi: 10.3201/eid2507.180874.
- Li ML, Shih SR, Tolbert BS, Brewer G. Enterovirus A71 Vaccines. *Vaccines (Basel)*. 2021 Feb 27;9(3):199. doi: 10.3390/vaccines9030199.
- Li W, Godzik A. Cd-hit: a fast program for clustering and comparing large sets of protein or nucleotide sequences. *Bioinformatics*. 2006 Jul 1;22(13):1658-9. doi: 10.1093/bioinformatics/btl158.
- Linsuwanon P, Poovorawan Y, Li L, Deng X, Vongpunsawad S, Delwart E. The Fecal Virome of Children with Hand, Foot, and Mouth Disease that Tested PCR Negative for Pathogenic Enteroviruses. *PLoS One*. 2015 Aug 19;10(8):e0135573. doi: 10.1371/journal.pone.0135573.
- Liu N, Xie J, Qiu X, Jia L, Wu Z, Ma Y, Wang Z, Li P, Ren X, Hao R, Wang L, Wang Y, Qiu S, Song H. An atypical winter outbreak of hand, foot, and mouth disease associated with human enterovirus 71, 2010. *BMC Infect Dis*. 2014 Mar 4;14:123. doi: 10.1186/1471-2334-14-123.
- Liu Z, Tian J, Wang Y, Li Y, Liu-Helmersson J, Mishra S, Wagner AL, Lu Y, Wang W. The burden of hand, foot, and mouth disease among children under different vaccination scenarios in China: a dynamic modelling study. *BMC Infect Dis*. 2021 Jul 5;21(1):650. doi: 10.1186/s12879-021-06157-w.
- Lizasoain A, Burlandy FM, Victoria M, Tort LFL, da Silva EE, Colina R. An Environmental Surveillance in Uruguay Reveals the Presence of Highly Divergent Types of Human Enterovirus Species C and a High Frequency of Species A and B Types. *Food Environ Virol*. 2018 Dec;10(4):343-352. doi: 10.1007/s12560-018-9351-7.
- Lizasoain A, Mir D, Martínez N, Colina R. Coxsackievirus A10 causing hand-foot-and-mouth disease in Uruguay. *Int J Infect Dis*. 2020b May;94:1-3.
- Lizasoain A, Mir D, Masachessi G, Farías A, Rodríguez-Osorio N, Victoria M, Nates S, Colina R. Environmental Surveillance through Next-Generation Sequencing to Unveil the Diversity of Human Enteroviruses beyond the Reported Clinical Cases. *Viruses*. 2021c Jan 17;13(1):120. doi: 10.3390/v13010120.
- Lizasoain A, Mir D, Salvo M, Bortagaray V, Masachessi G, Farías A, Rodríguez-Osorio N, Nates S, Victoria M, Colina R. First evidence of enterovirus A71 and echovirus 30 in Uruguay and genetic relationship with strains circulating in the South American region. *PLoS One*. 2021a Aug 12;16(8):e0255846. doi: 10.1371/journal.pone.0255846.
- Lizasoain A, Mir D, Victoria M, Barrios ME, Blanco-Fernández MD, Rodríguez-Osorio N, Nates S, Cisterna D, Mbayed VA, Colina R. Human Enterovirus Diversity by Next-Generation Sequencing Analysis in Urban Sewage Samples From Buenos Aires Metropolitan Area, Argentina: A Retrospective Study. *Food Environ Virol*. 2021b Jun;13(2):259-269. doi: 10.1007/s12560-021-09468-y.
- Lizasoain A, Piegas S, Victoria M, Da Silva EE, Colina R. Hand-foot-and-mouth disease in uruguay: Coxsackievirus A6 identified as causative of an outbreak in a rural childcare center. *J Med Virol*. 2020a Feb;92(2):167-173. doi: 10.1002/jmv.25590.
- Lizasoain A. Tipificación de variantes de enterovirus humanos responsables de un brote de Hand-Foot-and-Mouth disease que tuvo lugar en 2019 en Paysandú, Uruguay, y su relación con variantes detectadas en el ambiente. Sin publicar. 2021.
- Lodder WJ, Schijven JF, Rutjes SA, de Roda Husman AM, Teunis PF. Enterovirus and parechovirus distributions in surface water and probabilities of exposure to these viruses during water recreation. *Water Res*. 2015 May 15;75:25-32. doi: 10.1016/j.watres.2015.02.024.
- Lu HK, Lin TY, Hsia SH, Chiu CH, Huang YC, Tsao KC, Chang LY. Prognostic implications of myoclonic jerk in children with enterovirus infection. *J Microbiol Immunol Infect*. 2004 Apr;37(2):82-7. PMID: 15181488.
- Lu QB, Zhang XA, Wo Y, Xu HM, Li XJ, Wang XJ, Ding SJ, Chen XD, He C, Liu LJ, Li H, Yang H, Li TY, Liu W, Cao WC. Circulation of Coxsackievirus A10 and A6 in hand-foot-mouth disease in China, 2009-2011. *PLoS One*. 2012;7(12):e52073. doi: 10.1371/journal.pone.0052073.
- Luchs A, Cilli A, Russo DH, Costa FF, Carmona Rde C, Timenetsky Mdo C. Evaluation of enterovirus 71 immune status in São Paulo state, Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2010 Nov-Dec;52(6):339-41. doi: 10.1590/s0036-46652010000600010.

- Luchs A, Russo DH, Cilli A, Costa FF, Morillo SG, Machado BC, Pellini AC, de Cássia Compagnoli Carmona R, Timenetsky Mdo C. Echovirus 6 associated to aseptic meningitis outbreak, in São Joaquim da Barra, São Paulo, Brazil. *Braz J Microbiol.* 2008 Jan;39(1):28-31. doi: 10.1590/S1517-83822008000100007.
- Luchs A. Comments on "Detection and identification of enteroviruses circulating in children with acute gastroenteritis in Pará State, Northern Brazil (2010-2011)". *Viol J.* 2021 Jun 30;18(1):133. doi: 10.1186/s12985-021-01602-3.
- Lukashev AN, Drexler JF, Kotova VO, Amjaga EN, Reznik VI, Gmyl AP, Grard G, Taty Taty R, Trotsenko OE, Leroy EM, Drosten C. Novel serotypes 105 and 116 are members of distinct subgroups of human enterovirus C. *J Gen Virol.* 2012 Nov;93(Pt 11):2357-2362. doi: 10.1099/vir.0.043216-0.
- Lukashev AN, Vakulenko YA, Turbabina NA, Deviatkin AA, Drexler JF. Molecular epidemiology and phylogenetics of human enteroviruses: Is there a forest behind the trees? *Rev Med Virol.* 2018 Nov;28(6):e2002. doi: 10.1002/rmv.2002.
- Lukashev AN, Vakulenko YA. Molecular evolution of types in non-polio enteroviruses. *J Gen Virol.* 2017 Dec;98(12):2968-2981. doi: 10.1099/jgv.0.000966.
- Lulla V, Dinan AM, Hosmillo M, Chaudhry Y, Sherry L, Irigoyen N, Nayak KM, Stonehouse NJ, Zilbauer M, Goodfellow I, Firth AE. An upstream protein-coding region in enteroviruses modulates virus infection in gut epithelial cells. *Nat Microbiol.* 2019 Feb;4(2):280-292. doi: 10.1038/s41564-018-0297-1.
- Maan HS, Dhole TN, Chowdhary R. Identification and characterization of nonpolio enterovirus associated with nonpolio-acute flaccid paralysis in polio endemic state of Uttar Pradesh, Northern India. *PLoS One.* 2019 Jan 30;14(1):e0208902. doi: 10.1371/journal.pone.0208902.
- Machado RS, de Sousa IP Jr, Monteiro JC, Ferreira JL, Dos Santos Alves JC, Tavares FN. Detection and identification of enteroviruses circulating in children with acute gastroenteritis in Pará State, Northern Brazil (2010-2011). *Viol J.* 2020 Oct 16;17(1):156. doi: 10.1186/s12985-020-01431-w.
- Macklin G, Diop OM, Humayun A, Shahmahmoodi S, El-Sayed ZA, Triki H, Rey G, Avagyan T, Grabovac V, Jorba J, Farag N, Mach O. Update on Immunodeficiency-Associated Vaccine-Derived Polioviruses - Worldwide, July 2018-December 2019. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 2020 Jul 17;69(28):913-917. doi: 10.15585/mmwr.mm6928a4.
- Madeley CR. Fatal diarrhoea and coxsackie A1 virus. *Lancet.* 1982 May 1;1(8279):1013-4. doi: 10.1016/s0140-6736(82)92008-6.
- Magoffin RL, Jackson EW, Lennette EH. Vesicular stomatitis and exanthem. A syndrome associated with Coxsackie virus, type A16. *JAMA.* 1961 Feb 11;175:441-5. doi: 10.1001/jama.1961.03040060015004.
- Majumdar M, & Martin J. Detection by Direct Next Generation Sequencing Analysis of Emerging Enterovirus D68 and C109 Strains in an Environmental Sample From Scotland. *Front Microbiol.* 2018, 9, 1956. doi: 10.3389/fmicb.2018.01956.
- Majumdar M, Klapsa D, Wilton T, Akello J, Anscombe C, Allen D, Mee ET, Minor PD, Martin J. Isolation of Vaccine-Like Poliovirus Strains in Sewage Samples From the United Kingdom. *J Infect Dis.* 2018b Mar 28;217(8):1222-1230. doi: 10.1093/infdis/jix667.
- Majumdar M, Klapsa D, Wilton T, Bujaki E, Fernandez-Garcia MD, Faleye TOC, Oyero AO, Adewumi MO, Ndiaye K, Adeniji JA, Martin J. High Diversity of Human Non-Polio Enterovirus Serotypes Identified in Contaminated Water in Nigeria. *Viruses.* 2021 Feb 5;13(2):249. doi: 10.3390/v13020249.
- Majumdar M, Sharif S, Klapsa D, Wilton T, Alam MM, Fernandez-Garcia MD, Rehman L, Mujtaba G, McAllister G, Harvala H, Templeton K, Mee ET, Asghar H, Ndiaye K, Minor PD, Martin J. Environmental Surveillance Reveals Complex Enterovirus Circulation Patterns in Human Populations. *Open Forum Infect Dis.* 2018a Oct 1;5(10):ofy250. doi: 10.1093/ofid/ofy250.
- Martínez-López N, Muñoz-Almagro C, Launes C, Navascués A, Imaz-Pérez M, Reina J, Romero MP, Calvo C, Ruiz-García M, Megías G, Valencia-Ramos J, Otero A, Cabrerizo M. Surveillance for Enteroviruses Associated with Hand, Foot, and Mouth Disease, and Other Mucocutaneous Symptoms in Spain, 2006-2020. *Viruses.* 2021 Apr 28;13(5):781. doi: 10.3390/v13050781.
- Martínez-Puchol S, Rusiñol M, Fernández-Cassi X, Timoneda N, Itarte M, Andrés C, Antón A, Abril JF, Girones R, Bofill-Mas S. Characterisation of the sewage virome: comparison of NGS tools and occurrence of significant pathogens. *Sci Total Environ.* 2020 Apr 15;713:136604. doi: 10.1016/j.scitotenv.2020.136604.
- Masachessi G, Pisano MB, Prez VE, Martínez LC, Michelena JF, Martínez-Wassaf M, Giordano MO, Isa MB, Pavan JV, Welter A, Nates SV, Ré V. Enteric Viruses in Surface Waters from Argentina: Molecular and Viable-Virus Detection. *Appl Environ Microbiol.* 2018 Feb 14;84(5):e02327-17. doi: 10.1128/AEM.02327-17.
- Masachessi G, Prez VE, Michelena JF, Lizasoain A, Ferreyra LJ, Martínez LC, Giordano MO, Barril PA, Paván JV, Pisano MB, Fariás AA, Isa MB, Ré VE, Colina R, Nates SV. Proposal of a pathway for enteric virus groups detection as indicators of faecal contamination to enhance the evaluation of microbiological quality in freshwater in Argentina. *Sci Total Environ.* 2021 Mar 15;760:143400. doi: 10.1016/j.scitotenv.2020.143400.
- Mathes EF, Oza V, Frieden IJ, Cordero KM, Yagi S, Howard R, Kristal L, Ginocchio CC, Schaffer J, Maguiness S, Bayliss S, Lara-Corrales I, Garcia-Romero MT, Kelly D, Salas M, Oberste MS, Nix WA, Glaser C, Antaya R. "Eczema coxsackium" and unusual cutaneous findings in an enterovirus outbreak. *Pediatrics.* 2013 Jul;132(1):e149-57. doi: 10.1542/peds.2012-3175.

- Matrajt G, Naughton B, Bandyopadhyay AS, Meschke JS. A Review of the Most Commonly Used Methods for Sample Collection in Environmental Surveillance of Poliovirus. *Clin Infect Dis*. 2018 Oct 30;67(suppl_1):S90-S97. doi: 10.1093/cid/ciy638.
- Maurer CP, Simonetti AB, Staggemeier R, Rigotto C, Heinzelmann LS, Spilki FR. Adenovirus, enterovirus and thermotolerant coliforms in recreational waters from Lake Guaíba beaches, Porto Alegre, Brazil. *J Water Health*. 2015 Dec;13(4):1123-9. doi: 10.2166/wh.2015.277.
- McMinn PC. Recent advances in the molecular epidemiology and control of human enterovirus 71 infection. *Curr Opin Virol*. 2012 Apr;2(2):199-205. doi: 10.1016/j.coviro.2012.02.009.
- Melnick JL, Rennick V. Infectivity titers of enterovirus as found in human stools. *J Med Virol*. 1980;5(3):205-20. doi: 10.1002/jmv.1890050305.
- Melnick JL, Tagaya I, von Magnus H. Enteroviruses 69, 70, and 71. *Intervirology*. 1974;4(6):369-70. doi: 10.1159/000149872.
- Melnick JL. My role in the discovery and classification of the enteroviruses. *Annu Rev Microbiol*. 1996;50:1-24. doi: 10.1146/annurev.micro.50.1.1.
- Melnick JL. Poliomyelitis virus in urban sewage in epidemic and in nonepidemic times. *Am J Hyg*. 1947 Mar;45(2):240-53. doi: 10.1093/oxfordjournals.aje.a119132.
- Mendelsohn CL, Wimmer E, Racaniello VR. Cellular receptor for poliovirus: molecular cloning, nucleotide sequence, and expression of a new member of the immunoglobulin superfamily. *Cell*. 1989 Mar 10;56(5):855-65. doi: 10.1016/0092-8674(89)90690-9.
- Mendoza LP, Bronzoni RV, Takayanagui OM, Aquino VH, Figueiredo LT. Viral infections of the central nervous system in Brazil. *J Infect*. 2007 Jun;54(6):589-96. doi: 10.1016/j.jinf.2006.11.013.
- Messacar K, Abzug MJ, Dominguez SR. 2014 outbreak of enterovirus D68 in North America. *J Med Virol*. 2016 May;88(5):739-45. doi: 10.1002/jmv.24410.
- Midgley CM, Watson JT, Nix WA, Curns AT, Rogers SL, Brown BA, Conover C, Dominguez SR, Feikin DR, Gray S, Hassan F, Hoferka S, Jackson MA, Johnson D, Leshem E, Miller L, Nichols JB, Nyquist AC, Obringer E, Patel A, Patel M, Rha B, Schneider E, Schuster JE, Selvarangan R, Seward JF, Turabelidze G, Oberste MS, Pallansch MA, Gerber SI, EV-D68 Working Group. Severe respiratory illness associated with a nationwide outbreak of enterovirus D68 in the USA (2014): a descriptive epidemiological investigation. *Lancet Respir Med*. 2015 Nov;3(11):879-87. doi: 10.1016/S2213-2600(15)00335-5.
- Midgley SE, Nielsen AG, Trebbien R, Poulsen MW, Andersen PH, Fischer TK. Co-circulation of multiple subtypes of enterovirus A71 (EV- A71) genotype C, including novel recombinants characterised by use of whole genome sequencing (WGS), Denmark 2016. *Euro Surveill*. 2017 Jun 29;22(26):30565. doi: 10.2807/1560-7917.ES.2017.22.26.30565.
- Minor P. Vaccine-derived poliovirus (VDPV): Impact on poliomyelitis eradication. *Vaccine*. 2009 May 5;27(20):2649-52. doi: 10.1016/j.vaccine.2009.02.071.
- Mirand A, Henquell C, Archimbaud C, Ughetto S, Antona D, Bailly JL, Peigue-Lafeuille H. Outbreak of hand, foot and mouth disease/herpangina associated with coxsackievirus A6 and A10 infections in 2010, France: a large citywide, prospective observational study. *Clin Microbiol Infect*. 2012 May;18(5):E110-8. doi: 10.1111/j.1469-0691.2012.03789.x.
- Mistchenko AS, Viegas M, Latta MP, Barrero PR. Molecular and epidemiologic analysis of enterovirus B neurological infection in Argentine children. *J Clin Virol*. 2006 Dec;37(4):293-9. doi: 10.1016/j.jcv.2006.08.009.
- Mizuta K, Abiko C, Aoki Y, Ikeda T, Matsuzaki Y, Hongo S, Itagaki T, Katsushima N, Ohmi A, Nishimura H, Ahiko T. Molecular epidemiology of Coxsackievirus A16 strains isolated from children in Yamagata, Japan between 1988 and 2011. *Microbiol Immunol*. 2013 May;57(5):400-5. doi: 10.1111/1348-0421.12041.
- Moazeni M, Nikaeen M, Hadi M, Moghim S, Mouhebat L, Hatamzadeh M, Hassanzadeh A. Estimation of health risks caused by exposure to enteroviruses from agricultural application of wastewater effluents. *Water Res*. 2017 Nov 15;125:104-113. doi: 10.1016/j.watres.2017.08.028.
- Mombo IM, Lukashov AN, Bleicker T, Brünink S, Berthet N, Maganga GD, Durand P, Arnathau C, Boundenga L, Ngoubangoye B, Boué V, Liégeois F, Ollomo B, Prugnolle F, Drexler JF, Drosten C, Renaud F, Rougeron V, Leroy E. African Non-Human Primates Host Diverse Enteroviruses. *PLoS One*. 2017 Jan 12;12(1):e0169067. doi: 10.1371/journal.pone.0169067.
- Monge S, Benschop K, Soetens L, Pijnacker R, Hahné S, Wallinga J, Duizer E. Echovirus type 6 transmission clusters and the role of environmental surveillance in early warning, the Netherlands, 2007 to 2016. *Euro Surveill*. 2018 Nov;23(45):1800288. doi: 10.2807/1560-7917.ES.2018.23.45.1800288.
- Monpoeho S, Maul A, Bonnin C, Patria L, Ranarijaona S, Billaudel S, Ferré V. Clearance of human-pathogenic viruses from sludge: study of four stabilization processes by real-time reverse transcription-PCR and cell culture. *Appl Environ Microbiol*. 2004 Sep;70(9):5434-40. doi: 10.1128/AEM.70.9.5434-5440.2004.
- Moreira RC, Castrignano SB, Carmona Rde C, Gomes FM, Saes SG, Oliveira RS, Souza DF, Takimoto S, Costa MC, Waldman EA. An exanthematic disease epidemic associated with coxsackievirus B3 infection in a day care center. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 1995 May-Jun;37(3):235-8. doi: 10.1590/s0036-46651995000300009.

- Morens DM, Folkers GK, Fauci AS. Acute Flaccid Myelitis: Something Old and Something New. *mBio*. 2019 Apr 2;10(2):e00521-19. doi: 10.1128/mBio.00521-19.
- Mosquera Gordillo MA, Barón Cano N, Ballester Añón R. El camino hacia la erradicación de la poliomielitis a través de la Organización Panamericana de la Salud. *Rev Panam Salud Publica*. 2014 Sep;36(3):185-92. PMID: 25418769.
- Moura FE, Ribeiro DC, Gurgel N, da Silva Mendes AC, Tavares FN, Timóteo CN, da Silva EE. Acute haemorrhagic conjunctivitis outbreak in the city of Fortaleza, northeast Brazil. *Br J Ophthalmol*. 2006 Sep;90(9):1091-3. doi: 10.1136/bjo.2006.098822.
- Muehlenbachs A, Bhatnagar J, Zaki SR. Tissue tropism, pathology and pathogenesis of enterovirus infection. *J Pathol*. 2015 Jan;235(2):217-28. doi: 10.1002/path.4438.
- Mueller JE, Bessaud M, Huang QS, Martinez LC, Barril PA, Morel V, Balanant J, Bocacao J, Hewitt J, Gessner BD, Delpeyroux F, Nates SV. Environmental poliovirus surveillance during oral poliovirus vaccine and inactivated poliovirus vaccine use in Córdoba Province, Argentina. *Appl Environ Microbiol*. 2009 Mar;75(5):1395-401. doi: 10.1128/AEM.02201-08.
- Mune M. Newly emerging C-105 enterovirus genotype in acute respiratory disease in Cuba. En: *Proceedings of the 4th World Conference on Virology*; 2014 Oct 6–8; San Antonio, Texas, USA. *J Antivir Antiretrovir*. 2014. p. 206.
- Muslin C, Mac Kain A, Bessaud M, Blondel B, Delpeyroux F. Recombination in Enteroviruses, a Multi-Step Modular Evolutionary Process. *Viruses*. 2019 Sep 14;11(9):859. doi: 10.3390/v11090859.
- Nakamura T, Hamasaki M, Yoshitomi H, Ishibashi T, Yoshiyama C, Maeda E, Sera N, Yoshida H. Environmental surveillance of poliovirus in sewage water around the introduction period for inactivated polio vaccine in Japan. *Appl Environ Microbiol*. 2015 Mar;81(5):1859-64. doi: 10.1128/AEM.03575-14.
- Nassef C, Ziemer C, Morrell DS. Hand-foot-and-mouth disease: a new look at a classic viral rash. *Curr Opin Pediatr*. 2015 Aug;27(4):486-91. doi: 10.1097/MOP.0000000000000246.
- Nathanson N, Kew OM. From emergence to eradication: the epidemiology of poliomyelitis deconstructed. *Am J Epidemiol*. 2010 Dec 1;172(11):1213-29. doi: 10.1093/aje/kwq320.
- Nathanson N. The pathogenesis of poliomyelitis: what we don't know. *Adv Virus Res*. 2008;71:1-50. doi: 10.1016/S0065-3527(08)00001-8.
- Ndiaye AK, Diop PA, Diop OM. Environmental surveillance of poliovirus and non-polio enterovirus in urban sewage in Dakar, Senegal (2007-2013). *Pan Afr Med J*. 2014 Nov 4;19:243. doi: 10.11604/pamj.2014.19.243.3538.
- Nery-Guimarães R, Bittencourt LC, Pastor MV. Meningites virais e bacterianas no município do Rio de Janeiro (Brasil). Algumas considerações sobre o sistema de informações em saúde e sobre a distribuição da doença no espaço urbano. *Rev Saude Publica*. 1981 Aug;15(4):379-94. doi: 10.1590/s0034-89101981000400004.
- Ngangas ST, Lukashov A, Jugie G, Ivanova O, Mansuy JM, Mengelle C, Izopet J, L'honneur AS, Rozenberg F, Leyssene D, Hecquet D, Marque-Juillet S, Boutolleau D, Burrel S, Peigue-Lafeuille H, Archimbaud C, Benschop K, Henquell C, Mirand A, Bailly JL. Multirecombinant Enterovirus A71 Subgenogroup C1 Isolates Associated with Neurologic Disease, France, 2016-2017. *Emerg Infect Dis*. 2019 Jun;25(6):1204-1208. doi: 10.3201/eid2506.181460.
- Nhu LNT, Nhan LNT, Anh NT, Hong NTT, Van HMT, Thanh TT, Hang VTT, Han DDK, Ny NTH, Nguyen LA, Quy DT, Qui PT, Khanh TH, Hung NT, Tuan HM, Chau NVV, Thwaites G, van Doorn HR, Tan LV. Coxsackievirus A16 in Southern Vietnam. *Front Microbiol*. 2021 Jun 24;12:689658. doi: 10.3389/fmicb.2021.689658.
- Nijhuis M, van Maarseveen N, Schuurman R, Verkuijlen S, de Vos M, Hendriksen K, & van Loon AM. Rapid and sensitive routine detection of all members of the genus enterovirus in different clinical specimens by real-time PCR. *J Clin Microbiol*. 2002, 40(10), 3666–3670. doi: 10.1128/JCM.40.10.3666-3670.2002.
- Nix WA, Oberste MS, Pallansch MA. Sensitive, seminested PCR amplification of VP1 sequences for direct identification of all enterovirus serotypes from original clinical specimens. *J Clin Microbiol*. 2006 Aug;44(8):2698-704. doi: 10.1128/JCM.00542-06.
- Nkosi N, Preiser W, van Zyl G, Claassen M, Cronje N, Maritz J, Newman H, McCarthy K, Ntshoe G, Essel V, Korsman S, Hardie D, Smuts H. Molecular characterisation and epidemiology of enterovirus-associated aseptic meningitis in the Western and Eastern Cape Provinces, South Africa 2018-2019. *J Clin Virol*. 2021 Jun;139:104845. doi: 10.1016/j.jcv.2021.104845.
- Oberste MS, & Pallansch MA. Enterovirus molecular detection and typing. *Rev Med Microbiol*. 2005, 16(4), 163–171. doi: 10.1097/01.revmedmi.0000184741.90926.
- Oberste MS, Maher K, Flemister MR, Marchetti G, Kilpatrick DR, Pallansch MA. Comparison of classic and molecular approaches for the identification of untypeable enteroviruses. *J Clin Microbiol*. 2000 Mar;38(3):1170-4. doi: 10.1128/JCM.38.3.1170-1174.2000.
- Oberste MS, Maher K, Kilpatrick DR, Flemister MR, Brown BA, Pallansch MA. Typing of human enteroviruses by partial sequencing of VP1. *J Clin Microbiol*. 1999b May;37(5):1288-93. doi: 10.1128/JCM.37.5.1288-1293.1999.
- Oberste MS, Maher K, Kilpatrick DR, Pallansch MA. Molecular evolution of the human enteroviruses: correlation of serotype with VP1 sequence and application to picornavirus classification. *J Virol*. 1999a Mar;73(3):1941-8. doi: 10.1128/JVI.73.3.1941-1948.1999.

- Oberste MS, Nix WA, Kilpatrick DR, Flemister MR, Pallansch MA. Molecular epidemiology and type-specific detection of echovirus 11 isolates from the Americas, Europe, Africa, Australia, southern Asia and the Middle East. *Virus Res.* 2003 Feb;91(2):241-8. doi: 10.1016/s0168-1702(02)00291-5.
- Oberste MS, Peñaranda S, Rogers SL, Henderson E, Nix WA. Comparative evaluation of Taqman real-time PCR and semi-nested VP1 PCR for detection of enteroviruses in clinical specimens. *J Clin Virol.* 2010 Sep;49(1):73-4. doi: 10.1016/j.jcv.2010.06.022.
- Oberste MS. Progress of polio eradication and containment requirements after eradication. *Transfusion.* 2018 Dec;58 Suppl 3:3078-3083. doi: 10.1111/trf.15018.
- Onorato IM, Modlin JF, McBean AM, Thoms ML, Losonsky GA, Bernier RH. Mucosal immunity induced by enhance-potency inactivated and oral polio vaccines. *J Infect Dis.* 1991 Jan;163(1):1-6. doi: 10.1093/infdis/163.1.1.
- Onvimala N, Kosoltanapiwat N, Pumirat P, Vanaporn M, Nimmanitya S, Tacharoenmuang R, Guntapong R, Leungwutiwong P. Genotyping of non-polio enteroviruses associated with acute flaccid paralysis in Thailand in 2013 and 2014. *Virol J.* 2021 Jul 23;18(1):153. doi: 10.1186/s12985-021-01621-0.
- Organización Panamericana de la Salud (2005). Erradicación de la poliomielitis. Guía práctica. Tercera edición. Publicación Científica y Técnica No. 607. Disponible desde: <https://iris.paho.org/bitstream/handle/10665.2/735/9275316074.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Osterback R, Vuorinen T, Linna M, Susi P, Hyypiä T, Waris M. Coxsackievirus A6 and hand, foot, and mouth disease, Finland. *Emerg Infect Dis.* 2009 Sep;15(9):1485-8. doi: 10.3201/eid1509.090438.
- Palacios G, Casas I, Cisterna D, Trallero G, Tenorio A, Freire C. Molecular epidemiology of echovirus 30: temporal circulation and prevalence of single lineages. *J Virol.* 2002 May;76(10):4940-9. doi: 10.1128/jvi.76.10.4940-4949.2002.
- Pallansch MA, Oberste MS, Whitton JL. 2013. Enteroviruses: polioviruses, coxsackieviruses, echoviruses, and newer enteroviruses. En: Knipe, D.M., Howley, P.M. (Eds.), *Fields Virology*, 6th ed. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, pp. 502–516.
- Pan-American Health Organization (2014). Detection of imported wild poliovirus in environmental samples 21 June 2014. Disponible desde: <https://reliefweb.int/sites/reliefweb.int/files/resources/21-June-2014-cha-wildpoliovirus.pdf>
- Pan-American Health Organization. Acute flaccid paralysis surveillance in the Americas. *Polio Weekly Bulletin*, 2020; 35(14): 1-2.
- Parrott RH, Ross S, Burke FG, Rice EC. Further observations on herpangina and its relation to the Coxsackie group of viruses. *Clin Proc Child Hosp Dist Columbia.* 1952 May;8(5):118-24. PMID: 12979183.
- Pedreira C, Thrush E, Rey-Benito G, Chévez AE, Jauregui B. The path towards polio eradication over 40 years of the Expanded Program on Immunization in the Americas. *Rev Panam Salud Publica.* 2017 Dec 20;41:e154. doi: 10.26633/RPSP.2017.154.
- Peñata A, Mesa S, Leal A, Castaño T, Bustamante J, Sigifredo O. Molecular diagnosis of meningitis and meningoencephalitis with an automated real-time multiplex polymerase chain reaction in a tertiary reference complex in Medellín, Colombia. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 2020 Oct 9;62:e77. doi: 10.1590/S1678-9946202062077.
- Pérez G, Rosanova MT, Freire MC, Paz MI, Ruvinsky S, Rugilo C, Ruggieri V, Cisterna D, Martiren S, Lema C, Savransky A, González S, Martínez L, Viale D, Bologna R. Unusual increase of cases of myelitis in a pediatric hospital in Argentina. *Arch Argent Pediatr.* 2017 Aug 1;115(4):364-369. doi: 10.5546/aap.2017.eng.364.
- Pina S, Jofre J, Emerson SU, Purcell RH, Girones R. Characterization of a strain of infectious hepatitis E virus isolated from sewage in an area where hepatitis E is not endemic. *Appl Environ Microbiol.* 1998 Nov;64(11):4485-8. doi: 10.1128/AEM.64.11.4485-4488.1998.
- Pinto Junior VL, Rebelo MC, Costa EV, Silva EE, Bóia MN. Description of a widespread outbreak of aseptic meningitis due to echovirus 30 in Rio de Janeiro state, Brazil. *Braz J Infect Dis.* 2009 Oct;13(5):367-70. doi: 10.1590/S1413-86702009000500011.
- Piralla A, Daleno C, Girello A, Esposito S, Baldanti F. Circulation of two Enterovirus C105 (EV-C105) lineages in Europe and Africa. *J Gen Virol.* 2015 Jun;96(Pt 6):1374-1379. doi: 10.1099/vir.0.000088.
- Piralla A, Daleno C, Scala A, Greenberg D, Usonis V, Principi N, Baldanti F, Esposito S; CAP-PRI Study Group. Genome characterisation of enteroviruses 117 and 118: a new group within human enterovirus species C. *PLoS One.* 2013;8(4):e60641. doi: 10.1371/journal.pone.0060641.
- Pogka V, Labropoulou S, Emmanouil M, Voulgari-Kokota A, Vernardaki A, Georgakopoulou T, Mentis AF. Laboratory Surveillance of Polio and Other Enteroviruses in High-Risk Populations and Environmental Samples. *Appl Environ Microbiol.* 2017 Feb 15;83(5):e02872-16. doi: 10.1128/AEM.02872-16.
- Polio Eradication Initiative (2020). Appendix 1. Poliovirus rRT-PCR ITD 4.1 Addendum Kit. Disponible desde: <https://polioeradication.org/wp-content/uploads/2020/01/GPLN-GP2-appendix-English.pdf>
- Pons S. Epidemia boca-manos-pies. *Med Cutan Ibero Lat Am.* 1977;5(1):13-9. PMID: 561271.
- Pons-Salort M, Grassly NC. Serotype-specific immunity explains the incidence of diseases caused by human enteroviruses. *Science.* 2018 Aug 24;361(6404):800-803. doi: 10.1126/science.aat6777.

- Pons-Salort M, Oberste MS, Pallansch MA, Abedi GR, Takahashi S, Grenfell BT, Grassly NC. The seasonality of nonpolio enteroviruses in the United States: Patterns and drivers. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2018 Mar 20;115(12):3078-3083. doi: 10.1073/pnas.1721159115.
- Pons-Salort M, Parker EP, Grassly NC. The epidemiology of non-polio enteroviruses: recent advances and outstanding questions. *Curr Opin Infect Dis*. 2015 Oct;28(5):479-87. doi: 10.1097/QCO.0000000000000187.
- Prez VE, Martínez LC, Victoria M, Giordano MO, Masachessi G, Ré VE, Pavan JV, Colina R, Barril PA, Nates SV. Tracking enteric viruses in green vegetables from central Argentina: potential association with viral contamination of irrigation waters. *Sci Total Environ*. 2018 Oct 1;637-638:665-671. doi: 10.1016/j.scitotenv.2018.05.044.
- Price MN, Dehal PS, Arkin AP. FastTree 2--approximately maximum-likelihood trees for large alignments. *PLoS One*. 2010 Mar 10;5(3):e9490. doi: 10.1371/journal.pone.0009490.
- Puenpa J, Chansaenroj J, Auphimai C, Srimuan D, Thatsanathorn T, Poovorawan Y, Wanlapakorn N. Neutralizing antibody against Enterovirus-A71 in Thai children: A longitudinal study from birth to age 4 years. *Vaccine*. 2020 Nov 10;38(48):7638-7644. doi: 10.1016/j.vaccine.2020.10.002.
- Puenpa J, Wanlapakorn N, Vongpunsawad S, Poovorawan Y. The History of Enterovirus A71 Outbreaks and Molecular Epidemiology in the Asia-Pacific Region. *J Biomed Sci*. 2019 Oct 18;26(1):75. doi: 10.1186/s12929-019-0573-2.
- Qiu Y, Lee BE, Neumann N, Ashbolt N, Craik S, Maal-Bared R, Pang XL. Assessment of human virus removal during municipal wastewater treatment in Edmonton, Canada. *J Appl Microbiol*. 2015 Dec;119(6):1729-39. doi: 10.1111/jam.12971.
- Quian J. Actualizaciones del Certificado Esquema de Vacunación: Perspectivas a futuro en vacunación en la niñez. *Arch Pediatr Urug*. 2010, 81(1), 34-45.
- Raboni SM, Giamberardino HI, Debur MC, Santos JS. Enterovirus D68-associated respiratory infection in southern Brazil, 2018 - A population-based laboratory surveillance. *J Clin Virol*. 2020 Aug;129:104503. doi: 10.1016/j.jcv.2020.104503.
- Racaniello VR. One hundred years of poliovirus pathogenesis. *Virology*. 2006 Jan 5;344(1):9-16. doi: 10.1016/j.virol.2005.09.015.
- Rakoto-Andrianarivelo M, Guillot S, Iber J, Balanant J, Blondel B, Riquet F, Martin J, Kew O, Randriamanalina B, Razafinimpiasa L, Rousset D, Delpeyroux F. Co-circulation and evolution of polioviruses and species C enteroviruses in a district of Madagascar. *PLoS Pathog*. 2007 Dec;3(12):e191. doi: 10.1371/journal.ppat.0030191.
- Rakoto-Andrianarivelo M, Gumedé N, Jegouic S, Balanant J, Andriamamonjy SN, Rabemanantsoa S, Birmingham M, Randriamanalina B, Nkolomoni L, Venter M, Schoub BD, Delpeyroux F, Reynes JM. Reemergence of recombinant vaccine-derived poliovirus outbreak in Madagascar. *J Infect Dis*. 2008b May 15;197(10):1427-35. doi: 10.1086/587694.
- Rakoto-Andrianarivelo M, Jegouic S, Bessaud M, Delpeyroux F. Poliovirus et entérovirus C, même espèce, même "tribu" virale. *Med Sci (Paris)*. 2008a May;24(5):452-3. doi: 10.1051/medsci/2008245452.
- Rakoto-Andrianarivelo M, Rousset D, Razafindratsimandresy R, Chevaliez S, Guillot S, Balanant J, Delpeyroux F. High frequency of human enterovirus species C circulation in Madagascar. *J Clin Microbiol*. 2005 Jan;43(1):242-9. doi: 10.1128/JCM.43.1.242-249.2005.
- Ramvalho E, Sousa I Jr, Burlandy F, Costa E, Dias A, Serrano R, Oliveira M, Lopes R, Debur M, Burger M, Riediger I, Oliveira ML, Nascimento O, da Silva EE. Identification and Phylogenetic Characterization of Human Enteroviruses Isolated from Cases of Aseptic Meningitis in Brazil, 2013-2017. *Viruses*. 2019 Jul 29;11(8):690. doi: 10.3390/v11080690.
- Raychoudhuri A, Naru AK, Kanubothula SR, Uddala R. Development of an experimental inactivated vaccine from Vero cell adapted Enterovirus D68. *Virus Res*. 2021 Jul 30;198528. doi: 10.1016/j.virusres.2021.198528.
- Recarey R. (2011) Variabilidad genética de enterovirus asociados a encefalitis pediátricas". Tesis de Maestría en Ciencias Biológicas. Opción Biología Celular y Molecular. Programa de Desarrollo de las Ciencias Básicas (PEDECIBA). Universidad de la República. Montevideo-Uruguay.
- Repass GL, Palmer WC, Stancampiano FF. Hand, foot, and mouth disease: identifying and managing an acute viral syndrome. *Cleve Clin J Med*. 2014 Sep;81(9):537-43. doi: 10.3949/ccjm.81a.13132.
- Reynolds KA. Integrated cell culture/PCR for detection of enteric viruses in environmental samples. *Methods Mol Biol*. 2004;268:69-78. doi: 10.1385/1-59259-766-1:069.
- Richter J, Tryfonos C, Christodoulou C. Circulation of enteroviruses in Cyprus assessed by molecular analysis of clinical specimens and sewage isolates. *J Appl Microbiol*. 2011 Aug;111(2):491-8. doi: 10.1111/j.1365-2672.2011.05061.x.
- Richter J, Tryfonos C, Christodoulou C. Molecular epidemiology of enteroviruses in Cyprus 2008-2017. *PLoS One*. 2019 Aug 8;14(8):e0220938. doi: 10.1371/journal.pone.0220938.
- Richter J, Tryfonos C, Panagiotou C, Nikolaou E, Koliou M, Christodoulou C. Newly emerging C group enteroviruses may elude diagnosis due to a divergent 5'-UTR. *Int J Infect Dis*. 2013 Dec;17(12):e1245-8. doi: 10.1016/j.ijid.2013.07.010.

- Rieder E, Gorbalenya AE, Xiao C, He Y, Baker TS, Kuhn RJ, Rossmann MG, Wimmer E. Will the polio niche remain vacant? *Dev Biol (Basel)*. 2001;105:111-22; discussion 149-50.
- Roberts L. Global polio eradication falters in the final stretch. *Science*. 2020 Jan 3;367(6473):14-15. doi: 10.1126/science.367.6473.14.
- Robinson CR, Doane FW, Rhodes AJ. Report of an outbreak of febrile illness with pharyngeal lesions and exanthem: Toronto, summer 1957; isolation of group A Cocksackie virus. *Can Med Assoc J*. 1958 Oct 15;79(8):615-21. PMID: 13585281; PMCID: PMC1830188.
- Robinson CR, Rhodes AJ. Vesicular exanthem and stomatitis. Report of an epidemic due to Cocksackie virus Group A, Type 16. *N Engl J Med*. 1961 Nov 30;265:1104-5. doi: 10.1056/NEJM196111302652207.
- Ruggieri V, Paz MI, Peretti MG, Rugilo C, Bologna R, Freire C, Vergel S, Savransky A. Enterovirus D68 infection in a cluster of children with acute flaccid myelitis, Buenos Aires, Argentina, 2016. *Eur J Paediatr Neurol*. 2017 Nov;21(6):884-890. doi: 10.1016/j.ejpn.2017.07.008.
- Russo DH, Luchs A, Machado BC, Carmona Rde C, Timenetsky Mdo C. Echovirus 4 associated to hand, foot and mouth disease. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2006 Jul-Aug;48(4):197-9. doi: 10.1590/s0036-46652006000400004.
- Sadeuh-Mba SA, Bessaud M, Joffret ML, Endegue Zanga MC, Balanant J, Mpoudi Ngole E, Njouom R, Reynes JM, Delpeyroux F, Rousset D. Characterization of Enteroviruses from non-human primates in cameroon revealed virus types widespread in humans along with candidate new types and species. *PLoS Negl Trop Dis*. 2014 Jul 31;8(7):e3052. doi: 10.1371/journal.pntd.0003052.
- Sadeuh-Mba SA, Bessaud M, Massenet D, Joffret ML, Endegue MC, Njouom R, Reynes JM, Rousset D, Delpeyroux F. High frequency and diversity of species C enteroviruses in Cameroon and neighboring countries. *J Clin Microbiol*. 2013 Mar;51(3):759-70. doi: 10.1128/JCM.02119-12.
- Sadeuh-Mba SA, Kavunga-Membo H, Joffret ML, Yogolelo R, Endegue-Zanga MC, Bessaud M, Njouom R, Muyembe-Tamfu JJ, Delpeyroux F. Genetic landscape and macro-evolution of co-circulating Cocksackieviruses A and Vaccine-derived Polioviruses in the Democratic Republic of Congo, 2008-2013. *PLoS Negl Trop Dis*. 2019 Apr 19;13(4):e0007335. doi: 10.1371/journal.pntd.0007335.
- Saguil A, Kane SF, Lauters R, Mercado MG. Hand-Foot-and-Mouth Disease: Rapid Evidence Review. *Am Fam Physician*. 2019 Oct 1;100(7):408-414. PMID: 31573162.
- Salamano R, Scavone C, Baz M, Rey A, González G, Perna A, Cardinal P, Lewin S, Arbiza J, & Ruchanski D. Meningitis y encefalitis víricas en Uruguay: Relevamiento mediante técnicas de reacción en cadena de polimerasa aplicadas al líquido cefalorraquídeo de los grupos herpes, enterovirus y arbovirus como principales agentes etiológicos. A propósito de 59 casos. *Rev Med Urug*. 2009, 25(4), 212-218.
- Santos Ede O, Macedo O, Gomes Mde L, Nakauth CM. Conjuntivite hemorrágica aguda causada pela variante do coxsackievirus A24, em Belém, Pará, Brazil, 1987. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 1989 May-Jun;31(3):183-7. doi: 10.1590/s0036-46651989000300008.
- Santti J, Hyypää T, Kinnunen L, Salminen M. Evidence of recombination among enteroviruses. *J Virol*. 1999 Oct;73(10):8741-9. doi: 10.1128/JVI.73.10.8741-8749.1999.
- Sapia EY, Maroni C, Groisman C, Kromer H, Lihue Rojo G, Dastugue M, Valinotto L. Genotipificación del virus de la enfermedad mano-pie-boca atípica en un hospital pediátrico de la Ciudad de Buenos Aires, Argentina. *Arch Argent Pediatr*. 2020 Apr;118(2):e199-e203. doi: 10.5546/aap.2020.e199.
- Saxena VK, Sane S, Nadkarni SS, Sharma DK, Deshpande JM. Genetic diversity of enterovirus A71, India. *Emerg Infect Dis*. 2015 Jan;21(1):123-6. doi: 10.3201/eid2101.140743.
- Schatzmayr HG, Cabral MC. A virologia no Estado de Rio de Janeiro. Uma visão global. Gráfica Corbã e Serviço de Comunicação Visual. Instituto de Comunicação e Informação Científica e Tecnológica em Saúde. Rio de Janeiro, agosto de 2009.
- Schieble JH, Fox VL, Lennette EH. A probable new human picornavirus associated with respiratory diseases. *Am J Epidemiol*. 1967 Mar;85(2):297-310. doi: 10.1093/oxfordjournals.aje.a120693.
- Sedmak G, Bina D, MacDonald J. 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*. 2003 Dec;69(12):7181-7. doi: 10.1128/AEM.69.12.7181-7187.2003.
- Shaw AG, Majumdar M, Troman C, O'Toole Á, Benny B, Abraham D, Praharaj I, Kang G, Sharif S, Alam MM, Shaikat S, Angez M, Khurshid A, Mahmood N, Arshad Y, Rehman L, Mujtaba G, Akthar R, Salman M, Klapsa D, Hajarha Y, Asghar H, Bandyopadhyay A, Rambaut A, Martin J, Grassly N. Rapid and Sensitive Direct Detection and Identification of Poliovirus from Stool and Environmental Surveillance Samples by Use of Nanopore Sequencing. *J Clin Microbiol*. 2020 Aug 24;58(9):e00920-20. doi: 10.1128/JCM.00920-20.
- Shimodaira H, Hasegawa M. CONSEL: for assessing the confidence of phylogenetic tree selection. *Bioinformatics*. 2001 Dec;17(12):1246-7. doi: 10.1093/bioinformatics/17.12.1246.
- Shulman LM, Gavrilin E, Jorba J, Martin J, Burns CC, Manor Y, Moran-Gilad J, Sofer D, Hindiyeh MY, Gamzu R, Mendelson E, Grotto I, Genotype - Phenotype Identification (GPI) group. Molecular epidemiology of silent introduction and sustained transmission of wild poliovirus type 1, Israel, 2013. *Euro Surveill*. 2014 Feb 20;19(7):20709. doi: 10.2807/1560-7917.es2014.19.7.20709.

- Silva HR, Tanajura GM, Tavares-Neto J, Gomes Md Mde L, Linhares Ad Ada C, Vasconcelos PF, Ko AI. Síndrome da meningite asséptica por enterovírus e *Leptospira* sp em crianças de Salvador, Bahia. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2002 Mar-Apr;35(2):159-65. doi: 10.1590/s0037-86822002000200006.
- Simhon A, Pileggi V, Flemming CA, Bicudo JR, Lai G, Manoharan M. Enteric viruses in municipal wastewater effluent before and after disinfection with chlorine and ultraviolet light. *J Water Health*. 2019 Oct;17(5):670-682. doi: 10.2166/wh.2019.111.
- Sinclair C, Gaunt E, Simmonds P, Broomfield D, Nwafor N, Wellington L, Templeton K, Willocks L, Schofield O, Harvala H. Atypical hand, foot, and mouth disease associated with coxsackievirus A6 infection, Edinburgh, United Kingdom, January to February 2014. *Euro Surveill*. 2014 Mar 27;19(12):20745. doi: 10.2807/1560-7917.es2014.19.12.20745.
- Solomon T, Lewthwaite P, Perera D, Cardoso MJ, McMinn P, Ooi MH. Virology, epidemiology, pathogenesis, and control of enterovirus 71. *Lancet Infect Dis*. 2010 Nov;10(11):778-90. doi: 10.1016/S1473-3099(10)70194-8.
- Song Y, Zhang Y, Ji T, Gu X, Yang Q, Zhu S, Xu W, Xu Y, Shi Y, Huang X, Li Q, Deng H, Wang X, Yan D, Yu W, Wang S, Yu D, Xu W. Persistent circulation of Coxsackievirus A6 of genotype D3 in mainland of China between 2008 and 2015. *Sci Rep*. 2017 Jul 14;7(1):5491. doi: 10.1038/s41598-017-05618-0.
- Sorondo N, Frantchez V. (2014). Poliovirus. *Epidemiología y Prevención*. Cátedra de Enfermedades Infecciosas. Facultad de Medicina. Universidad de la República. Disponible desde: http://www.infectologia.edu.uy/index.php?option=com_k2&id=67_d758d75b711b5e73220ff14182e46251&lang=es&task=download&view=item
- Sousa IP Jr, Burlandy FM, Costa EV, Tavares FN, da Silva EE. Enteroviruses associated with hand, foot, and mouth disease in Brazil. *J Infect*. 2018b Nov;77(5):448-454. doi: 10.1016/j.jinf.2018.08.012.
- Sousa IP Jr, Burlandy FM, Ferreira JL, Alves JCS, Sousa-Júnior EC, Tavares FN, da Silva EE. Re-emergence of a coxsackievirus A24 variant causing acute hemorrhagic conjunctivitis in Brazil from 2017 to 2018. *Arch Virol*. 2019 Apr;164(4):1181-1185. doi: 10.1007/s00705-019-04157-5.
- Sousa IP Jr, Burlandy FM, Oliveira SS, Nunes AM, Sousa C, da Silva EM, Souza JG, de Paula VA, Oliveira IC, Tavares FN, da Costa EV, da Silva EE. Acute flaccid paralysis laboratorial surveillance in a polio-free country: Brazil, 2005-2014. *Hum Vaccin Immunother*. 2017 Mar 4;13(3):717-723. doi: 10.1080/21645515.2016.1236164.
- Sousa IP Jr, Burlandy FM, Tavares FN, da Silva EE. Enterovirus B74 associated with hand, foot and mouth disease. *Infect Genet Evol*. 2018a Nov;65:15-17. doi: 10.1016/j.meegid.2018.07.011.
- Sousa IP Jr, Oliveira MLA, Burlandy FM, Machado RS, Oliveira SS, Tavares FN, Gomes-Neto F, da Costa EV, da Silva EE. Molecular characterization and epidemiological aspects of non-polio enteroviruses isolated from acute flaccid paralysis in Brazil: a historical series (2005-2017). *Emerg Microbes Infect*. 2020 Dec;9(1):2536-2546. doi: 10.1080/22221751.2020.1850181.
- Stalkup JR, Chilukuri S. Enterovirus infections: a review of clinical presentation, diagnosis, and treatment. *Dermatol Clin*. 2002 Apr;20(2):217-23. doi: 10.1016/s0733-8635(01)00009-2.
- Supian NI, Ng KT, Chook JB, Takebe Y, Chan KG, Tee KK. Genetic diversity of Coxsackievirus A21 associated with sporadic cases of acute respiratory infections in Malaysia. *BMC Infect Dis*. 2021 May 17;21(1):446. doi: 10.1186/s12879-021-06148-x.
- Suresh S, Forgie S, Robinson J. Non-polio Enterovirus detection with acute flaccid paralysis: A systematic review. *J Med Virol*. 2018 Jan;90(1):3-7. doi: 10.1002/jmv.24933.
- Takimoto S, Waldman EA, Moreira RC, Kok F, Pinheiro Fde P, Saes SG, Hatch M, de Souza DF, Carmona Rde C, Shout D, de Moraes JC, Costa AM. Enterovirus 71 infection and acute neurological disease among children in Brazil (1988-1990). *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1998 Jan-Feb;92(1):25-8. doi: 10.1016/s0035-9203(98)90939-7.
- Tao Z, Chen P, Cui N, Lin X, Ji F, Liu Y, Xiong P, Zhang L, Xu Q, Song Y, Xu A. Detection of enteroviruses in urban sewage by next generation sequencing and its application in environmental surveillance. *Sci Total Environ*. 2020 Aug 1;728:138818. doi: 10.1016/j.scitotenv.2020.138818.
- Tao Z, Wang Z, Lin X, Wang S, Wang H, Yoshida H, Xu A, & Song Y. One-year Survey of human enteroviruses from sewage and the factors affecting virus adsorption to the suspended solids. *Sci Rep*. 2016, 6, 31474. doi: 10.1038/srep31474.
- Tapparel C, Siegrist F, Petty TJ, Kaiser L. Picornavirus and enterovirus diversity with associated human diseases. *Infect Genet Evol*. 2013 Mar;14:282-93. doi: 10.1016/j.meegid.2012.10.016.
- Tavares FN, Campos Rde M, Burlandy FM, Fontella R, de Melo MM, da Costa EV, da Silva EE. Molecular characterization and phylogenetic study of coxsackievirus A24v causing outbreaks of acute hemorrhagic conjunctivitis (AHC) in Brazil. *PLoS One*. 2011;6(8):e23206. doi: 10.1371/journal.pone.0023206.
- Tavares FN, Costa EV, Oliveira SS, Nicolai CC, Baran M, da Silva EE. Acute hemorrhagic conjunctivitis and coxsackievirus A24v, Rio de Janeiro, Brazil, 2004. *Emerg Infect Dis*. 2006 Mar;12(3):495-7. doi: 10.3201/eid1203.051173.
- The Lancet Infectious Diseases. Enterovirus D68: the unexpected guest. *Lancet Infect Dis*. 2014 Nov;14(11):1023. doi: 10.1016/S1473-3099(14)70968-5.
- Tiwari S, Dhole TN. Assessment of enteroviruses from sewage water and clinical samples during eradication phase of polio in North India. *Virol J*. 2018 Oct 16;15(1):157. doi: 10.1186/s12985-018-1075-7.

- Todd A, Taylor S, Huang QS. Identification of Enterovirus C105 for the first time in New Zealand. *Western Pac Surveill Response J*. 2015 Feb 10;6(1):60-2. doi: 10.2471/WPSAR.2014.5.4.003.
- Trallero G, Avellon A, Otero A, De Miguel T, Pérez C, Rabella N, Rubio G, Echevarria JE, Cabrerizo M. Enteroviruses in Spain over the decade 1998-2007: virological and epidemiological studies. *J Clin Virol*. 2010 Feb;47(2):170-6. doi: 10.1016/j.jcv.2009.11.013.
- Tuma JN, Wilkinson AL, Diop OM, Jorba J, Gardner T, Snider CJ, Anand A, Ahmed J. Surveillance to Track Progress Toward Polio Eradication - Worldwide, 2019-2020. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. 2021 May 7;70(18):667-673. doi: 10.15585/mmwr.mm7018a2.
- Upreti P, Graf EH. Enterovirus infection and acute flaccid myelitis. *Curr Opin Virol*. 2020 Feb;40:55-60. doi: 10.1016/j.coviro.2020.06.006.
- Valle DAD, Santos MLSF, Giamberardino HIG, Raboni SM, Scola RH. Acute Childhood Viral Encephalitis in Southern Brazil. *Pediatr Infect Dis J*. 2020 Oct;39(10):894-898. doi: 10.1097/INF.0000000000002709.
- van der Sanden S, van der Avoort H, Lemey P, Uslu G, Koopmans M. Evolutionary trajectory of the VP1 gene of human enterovirus 71 genogroup B and C viruses. *J Gen Virol*. 2010 Aug;91(Pt 8):1949-1958. doi: 10.1099/vir.0.019695-0.
- van der Schaar HM, Dorobantu CM, Albulescu L, Strating JRPM, van Kuppeveld FJM. Fat(al) attraction: Picornaviruses Usurp Lipid Transfer at Membrane Contact Sites to Create Replication Organelles. *Trends Microbiol*. 2016 Jul;24(7):535-546. doi: 10.1016/j.tim.2016.02.017.
- Van Leer-Buter CC, Poelman R, Borger R, Niesters HG. Newly Identified Enterovirus C Genotypes, Identified in the Netherlands through Routine Sequencing of All Enteroviruses Detected in Clinical Materials from 2008 to 2015. *J Clin Microbiol*. 2016 Sep;54(9):2306-14. doi: 10.1128/JCM.00207-16.
- Vecchia AD, Fleck JD, Comerlato J, Kluge M, Bergamaschi B, Da Silva JV, Da Luz RB, Teixeira TF, Garbinatto GN, Oliveira DV, Zanin JG, Van der Sand S, Frazzon AP, Franco AC, Roehe PM, Spilki FR. First description of Adenovirus, Enterovirus, Rotavirus and Torque teno virus in water samples collected from the Arroio Dilúvio, Porto Alegre, Brazil. *Braz J Biol*. 2012a May;72(2):323-9. doi: 10.1590/s1519-69842012000200013.
- Vecchia AD, Fleck JD, Kluge M, Comerlato J, Bergamaschi B, Luz RB, Arantes TS, Silva JV, Thewes MR, Spilki FR. Assessment of enteric viruses in a sewage treatment plant located in Porto Alegre, southern Brazil. *Braz J Biol*. 2012b Nov;72(4):839-46. doi: 10.1590/s1519-69842012000500009.
- Vinje J, Gregoricus N, Martin J, Gary HE Jr, Caceres VM, Venczel L, Macadam A, Dobbins JG, Burns C, Wait D, Ko G, Landaverde M, Kew O, Sobsey MD. Isolation and characterization of circulating type 1 vaccine-derived poliovirus from sewage and stream waters in Hispaniola. *J Infect Dis*. 2004 Apr 1;189(7):1168-75. doi: 10.1086/382545.
- Volle R, Joffret ML, Ndiaye K, Fernandez-Garcia MD, Razafindratsimandresy R, Heraud JM, Rezig D, Sadeuh-Mba SA, Boulahbal-Anes L, Seghier M, Deshpandeh JM, Bessaud M, Delpeyroux F. Development of a New Internally Controlled One-Step Real-Time RT-PCR for the Molecular Detection of Enterovirus A71 in Africa and Madagascar. *Front Microbiol*. 2020 Aug 14;11:1907. doi: 10.3389/fmicb.2020.01907.
- Waldman EA, Takimoto S, Ishida MA, Kitamura C, Mendonça LI. Enterovirus-70 na região metropolitana de São Paulo, Brasil, de 1984 a 1987: aspectos da infecção em períodos epidêmico e endêmico. *Rev Inst Med Trop São Paulo*. 1990 May-Jun;32(3):221-8. PMID: 1966917.
- Wallace GS, Curns AT, Weldon WC, Oberste MS. Seroprevalence of Poliovirus Antibodies in the United States Population, 2009-2010. *BMC Public Health*. 2016 Aug 5;16:721. doi: 10.1186/s12889-016-3386-1.
- Wang H, Tao Z, Li Y, Lin X, Yoshida H, Song L, Zhang Y, Wang S, Cui N, Xu W, Song Y, Xu A. Environmental surveillance of human enteroviruses in Shandong Province, China, 2008 to 2012: serotypes, temporal fluctuation, and molecular epidemiology. *Appl Environ Microbiol*. 2014 Aug;80(15):4683-91. doi: 10.1128/AEM.00851-14.
- Wang J, Hu T, Sun D, Ding S, Carr MJ, Xing W, Li S, Wang X, Shi W. Epidemiological characteristics of hand, foot, and mouth disease in Shandong, China, 2009-2016. *Sci Rep*. 2017 Aug 21;7(1):8900. doi: 10.1038/s41598-017-09196-z.
- Wang J, Teng Z, Cui X, Li C, Pan H, Zheng Y, Mao S, Yang Y, Wu L, Guo X, Zhang X, Zhu Y. Epidemiological and serological surveillance of hand-foot-and-mouth disease in Shanghai, China, 2012-2016. *Emerg Microbes Infect*. 2018 Jan 24;7(1):8. doi: 10.1038/s41426-017-0011-z.
- Wang SH, Wang K, Zhao K, Hua SC, Du J. The Structure, Function, and Mechanisms of Action of Enterovirus Non-structural Protein 2C. *Front Microbiol*. 2020 Dec 14;11:615965. doi: 10.3389/fmicb.2020.615965.
- Wells AI, Coyne CB. Enteroviruses: A Gut-Wrenching Game of Entry, Detection, and Evasion. *Viruses*. 2019 May 21;11(5):460. doi: 10.3390/v11050460.
- Werneck LMC, Baptista ML, Miagostovich MP, da Silva EE. Dissemination of enteroviruses in the production chain of organic lettuce in Rio de Janeiro, Brazil. *Microbiologyopen*. 2019 Mar;8(3):e00653. doi: 10.1002/mbo3.653.
- Wieczorek M, Figas A, Krzysztozek A. Enteroviruses Associated with Aseptic Meningitis in Poland, 2011-2014. *Pol J Microbiol*. 2016 Jun 7;65(2):231-235. doi: 10.5604/17331331.1204485.
- Witsø E, Palacios G, Cinek O, Stene LC, Grinde B, Janowitz D, Lipkin WI, Rønningen KS. High prevalence of human enterovirus a infections in natural circulation of human enteroviruses. *J Clin Microbiol*. 2006 Nov;44(11):4095-100. doi: 10.1128/JCM.00653-06.

- World Health Assembly (1988). Polio Eradication by the Year 2000. Geneva: World Health Organization. Disponible desde: https://polioeradication.org/wp-content/uploads/2016/07/19880513_resolution-2.pdf
- World Health Organization (2004). Polio laboratory manual. Geneva: World Health Organization. Disponible desde: https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/68762/WHO_IVB_04.10.pdf?sequence=1&isAllowed=y
- World Health Organization (2011). A Guide to Clinical Management and Public Health Response for Hand, Foot and Mouth Disease (HFMD); WHO Regional Office for the Western Pacific: Manila, Philippines. Disponible desde: https://iris.wpro.who.int/bitstream/handle/10665.1/5521/9789290615255_eng.pdf
- World Health Organization (2015) Enterovirus surveillance guidelines. Guidelines for enterovirus surveillance in support of the Polio Eradication Initiative. Disponible desde: https://www.euro.who.int/_data/assets/pdf_file/0020/272810/EnterovirusSurveillanceGuidelines.pdf
- Xiao J, Wang J, Zhang Y, Sun D, Lu H, Han Z, Song Y, Yan D, Zhu S, Pei Y, Xu W, Wang X. Coxsackievirus B4: an underestimated pathogen associated with a hand, foot, and mouth disease outbreak. *Arch Virol.* 2021 Aug;166(8):2225-2234. doi: 10.1007/s00705-021-05128-5.
- Xing W, Liao Q, Viboud C, Zhang J, Sun J, Wu JT, Chang Z, Liu F, Fang VJ, Zheng Y, Cowling BJ, Varma JK, Farrar JJ, Leung GM, Yu H. Hand, foot, and mouth disease in China, 2008-12: an epidemiological study. *Lancet Infect Dis.* 2014 Apr;14(4):308-318. doi: 10.1016/S1473-3099(13)70342-6.
- Xu Y, Sun Y, Ma J, Zhou S, Fang W, Ye J, Tan L, Ji J, Luo D, Li L, Li J, Fang C, Pei N, Shi S, Liu X, Jiang H, Gong S, Xu X. A novel Enterovirus 96 circulating in China causes hand, foot, and mouth disease. *Virus Genes.* 2017 Jun;53(3):352-356. doi: 10.1007/s11262-017-1431-5.
- Yang F, Yuan J, Wang X, Li J, Du J, Su H, Zhou B, Jin Q. Severe hand, foot, and mouth disease and coxsackievirus A6-Shenzhen, China. *Clin Infect Dis.* 2014 Nov 15;59(10):1504-5. doi: 10.1093/cid/ciu624.
- Yip CC, Lau SK, Woo PC, Chan KH, Yuen KY. Complete genome sequence of a coxsackievirus A22 strain in Hong Kong reveals a natural intratypic recombination event. *J Virol.* 2011 Nov;85(22):12098-9. doi: 10.1128/JVI.05944-11.
- Yoke-Fun C, AbuBakar S. Phylogenetic evidence for inter-typic recombination in the emergence of human enterovirus 71 subgenotypes. *BMC Microbiol.* 2006 Aug 30;6:74. doi: 10.1186/1471-2180-6-74.
- Yoon Y, Lee YP, Lee DY, Kim HJ, Lee JW, Lee S, Kang C, Choi W, Bin JH, Kim YH, Han MG, Kang HJ. Non-Polio Enteroviruses from Acute Flaccid Paralysis Surveillance in Korea, 2012-2019. *Viruses.* 2021 Mar 5;13(3):411. doi: 10.3390/v13030411.
- Yu H, Chen W, Chang H, Tang R, Zhao J, Gan L, Liu B, Chen J, Wang M. Genetic analysis of the VP1 region of enterovirus 71 reveals the emergence of genotype A in central China in 2008. *Virus Genes.* 2010 Aug;41(1):1-4. doi: 10.1007/s11262-010-0472-9.
- Zell R, Delwart E, Gorbalenya AE, Hovi T, King AMQ, Knowles NJ, Lindberg AM, Pallansch MA, Palmenberg AC, Reuter G, Simmonds P, Skern T, Stanway G, Yamashita T, Ictv Report Consortium. ICTV Virus Taxonomy Profile: Picornaviridae. *J Gen Virol.* 2017 Oct;98(10):2421-2422. doi: 10.1099/jgv.0.000911.
- Zell R. Picornaviridae-the ever-growing virus family. *Arch Virol.* 2018 Feb;163(2):299-317. doi: 10.1007/s00705-017-3614-8.
- Zeng H, Yi L, Chen X, Zhou H, Zheng H, Lu J, Yang F, Li C, Fang L, Zhang X, Jing X, Wu J, Li H. Emergence of a non vaccine-cognate enterovirus A71 genotype C1 in mainland China. *J Infect.* 2021 Mar;82(3):407-413. doi: 10.1016/j.jinf.2020.12.020.
- Zhang Q, MacDonald NE, Smith JC, Cai K, Yu H, Li H, Lei C. Severe enterovirus type 71 nervous system infections in children in the Shanghai region of China: clinical manifestations and implications for prevention and care. *Pediatr Infect Dis J.* 2014 May;33(5):482-7. doi: 10.1097/INF.0000000000000194.
- Zhang Y, Cao J, Zhang S, Lee AJ, Sun G, Larsen CN, Zhao H, Gu Z, He S, Klem EB, Scheuermann RH. Genetic changes found in a distinct clade of Enterovirus D68 associated with paralysis during the 2014 outbreak. *Virus Evol.* 2016a Jun 15;2(1):vew015. doi: 10.1093/ve/vew015.
- Zhang Y, Sun Q, Cui H, Yan D, Fan Q, Song Y, Zhu S, Li X, Huang G, Ji T, Hu L, Wang D, Yang Q, Xu W. Circulation of multiple serotypes of highly divergent enterovirus C in the Xinjiang Uighur Autonomous Region of China. *Sci Rep.* 2016b Sep 19;6:33595. doi: 10.1038/srep33595.
- Zhao TS, Du J, Sun DP, Zhu QR, Chen LY, Ye C, Wang S, Liu YQ, Cui F, Lu QB. A review and meta-analysis of the epidemiology and clinical presentation of coxsackievirus A6 causing hand-foot-mouth disease in China and global implications. *Rev Med Virol.* 2020 Mar;30(2):e2087. doi: 10.1002/rmv.2087.
- Zhu J, Luo Z, Wang J, Xu Z, Chen H, Fan D, Gao N, Ping G, Zhou Z, Zhang Y, An J. Phylogenetic analysis of Enterovirus 71 circulating in Beijing, China from 2007 to 2009. *PLoS One.* 2013;8(2):e56318. doi: 10.1371/journal.pone.0056318.
- Zhu R, Cheng T, Yin Z, Liu D, Xu L, Li Y, Wang W, Liu J, Que Y, Ye X, Tang Q, Zhao Q, Ge S, He S, Xia N. Serological survey of neutralizing antibodies to eight major enteroviruses among healthy population. *Emerg Microbes Infect.* 2018 Jan 10;7(1):2. doi: 10.1038/s41426-017-0003-z.