



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Infecions per Enterovirus i Parechovirus que produeixen patologies neurològiques i sistèmiques en el pacient pediàtric. Vigilància epidemiològica i estudi de biomarcadors de gravetat

Dídac Casas Alba

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tdx.cat) i a través del Dipòsit Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX ni al Dipòsit Digital de la UB. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX o al Dipòsit Digital de la UB (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tdx.cat) y a través del Repositorio Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR o al Repositorio Digital de la UB. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR o al Repositorio Digital de la UB (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service and by the UB Digital Repository (diposit.ub.edu) has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.

**Infeccions per Enterovirus i Parechovirus que produeixen
patologies neurològiques i sistèmiques en el pacient pediàtric.
Vigilància epidemiològica i estudi de biomarcadors de gravetat**

Tesi Doctoral presentada per

Dídac CASAS ALBA

per optar al títol de Doctor en Medicina

per la Universitat de Barcelona

*Treball realitzat sota la direcció del **Dr. Cristian Launes Montaña** (Servei de
Pediatría) i la **Dra. Carmen Muñoz-Almagro** (Departament de Microbiologia
Molecular) i la tutorització de la **Dra. Iolanda Jordan i García** (Unitat de Cures
Intensives Pediàtriques) de l'Hospital Sant Joan de Déu (Universitat de Barcelona)*

Línia de recerca:

Fisiopatologia de les Malalties Pediàtriques (Medicina i Recerca Translacional).

Facultat de Medicina. Universitat de Barcelona.

Informe dels Directors i la Tutora de Tesi

Barcelona, març de 2019

Els directors de Tesi, Dr. Cristian Launes Montaña i Dra. Carmen Muñoz-Almagro, i la tutora de Tesi, Iolanda Jordan i García

CERTIFIQUEN que la Tesi Doctoral titulada *Infeccions per Enterovirus i Parechovirus que produeixen patologies neurològiques i sistèmiques en el pacient pediàtric. Vigilància epidemiològica i estudi de biomarcadors de gravetat* presentada per Dídac Casas Alba per a l'obtenció del grau de Doctor en Medicina per la Universitat de Barcelona compleix amb tots els requisits administratius i acadèmics per a ser sotmesa a la seva defensa davant de la corresponent comissió i,

CERTIFIQUEN que els articles presentats en aquesta tesi:

Primer article: *Outbreak of brainstem encephalitis associated with enterovirus-A71 in Catalonia, Spain (2016): a clinical observational study in a children's reference centre in Catalonia*

Segon article: *Utility of FilmArray Meningitis/Encephalitis Panel during Outbreak of Brainstem Encephalitis Caused by Enterovirus in Catalonia in 2016*

Tercer article: *Cerebrospinal fluid neopterin in children with enterovirus-related brainstem encephalitis.*

Quart article: *Extreme Hyperferritinemia in Dizygotic Twins With Human Parechovirus-3 Infection*

Pertanyen a una mateixa temàtica, que el doctorand és el primer autor/coautor de les publicacions, que estan publicades en revistes indexades que es troben en el primer decil, primer quartil i segon quartil de l'àrea de coneixement i que no formen part de cap altra tesi doctoral. Tanmateix, la participació del doctorand ha estat fonamental i decisiva en el disseny, interpretació i anàlisi de les dades i redacció dels treballs presentats.

Dr. Cristian Launes Montaña

Dra. Carmen Muñoz-Almagro

Iolanda Jordan i García

El articles que es presenten en aquesta Tesi han rebut fons del *Fondo de Investigación Sanitaria, Instituto Nacional de Salud Carlos III* (FIS, número de projecte PI15CIII-00020) i *Fundación Godia*. En el segon article, els kits de Filmarray® Meningitis/Encephalitis Panel van ser proporcionats per BioFire Diagnostics.

Les entitats de finançament no han tingut cap paper en el disseny de l'estudi, ni en la recollida i anàlisi de dades, ni en les decisions sobre la seva publicació.

Els resultats d'aquesta Tesi han sigut parcialment presentats com a comunicacions en les següents reunions científiques.

- 36th annual meeting of the European Society for Pediatric Infectious Diseases (ESPID 2018).
- 35th Annual Meeting of the European Society for Paediatric Infectious Diseases (ESPID 2017).
- XXIII Reunió Anual de la Societat Catalana de Pediatria.
- 22 Reunion Anual de la Sociedad Española de Urgencias de Pediatría "El Futuro, nuestro presente".
- XXX Congreso Nacional de la Sociedad Española de Pediatría Extrahospitalaria y Atención Primaria – SEPEAP.
- VIII Congreso de la Sociedad Española y VII Reunión Hispano-Mexicana de Infectología Pediátrica.

AGRAÏMENTS

*A ti, María, por llenarme de vida.
Als meus pares, el mirall en el que em miro.
Al meu germà, per ser-hi sempre.*

*Al Dr. Cristian Launes, pel seu recolzament constant i incondicional.
A la Dra. Muñoz-Almagro, pel seu esperit científic i la seva motivació.
A la Dra. Iolanda Jordán, per ser tota una referent professional per a mi.
Al Dr. Toni Martínez, per acompanyar-me en els primers passos i en els
projectes futurs.
A tot el personal sanitari que va atendre els pacients afectes pel brot, molt
especialment als Serveis de Pediatria, Neuropediatria, Radiologia i
Microbiologia Molecular, així com a la Unitat de Cures Intensives Pediàtriques.*

*“Caminante, son tus huellas
el camino y nada más;
Caminante, no hay camino,
se hace camino al andar.”*

Antonio Machado

ÍNDEX

1	ABREVIACIONS	1
2	INTRODUCCIÓ.....	5
2.1	GENERALITATS	6
2.2	VIGILÀNCIA EPIDEMIOLÒGICA D'EV I HPeV.....	7
2.3	GÈNERE ENTEROVIRUS	9
2.3.1	Classificació.....	9
2.3.2	Epidemiologia	9
2.3.3	Estructura i replicació	11
2.3.4	Fisiopatologia	13
2.3.5	Clínica	13
2.3.6	Diagnòstic	15
2.3.7	Prevenció i tractament	16
2.3.8	Poliovirus	16
2.3.8.1	Classificació	16
2.3.8.2	Epidemiologia	17
2.3.8.3	Clínica	17
2.3.8.4	Diagnòstic.....	18
2.3.8.5	Prevenció i tractament.....	18
2.3.9	Enterovirus D68.....	19
2.3.9.1	Classificació	19
2.3.9.2	Epidemiologia	19
2.3.9.3	Clínica	20
2.3.9.4	Diagnòstic.....	20
2.3.9.5	Prevenció i tractament.....	20
2.3.10	Enterovirus A71.....	21
2.3.10.1	Classificació	21
2.3.10.2	Epidemiologia	21
2.3.10.3	Replicació	23
2.3.10.4	Anatomia patològica de l'encefalomielitis per EV-A71	23
2.3.10.5	Fisiopatologia de l'encefalitis de tronc per EV-A71	24
2.3.10.6	Clínica	27
2.3.10.7	Diagnòstic.....	30
2.3.10.8	Pronòstic.....	30
2.3.10.9	Prevenció.....	34
2.3.10.10	Tractament.....	34
2.4	GÈNERE PARECHOVIRUS	36

2.4.1	Classificació.....	36
2.4.2	Epidemiologia	36
2.4.3	Estructura	37
2.4.4	Fisiopatologia	37
2.4.5	Clínica	37
2.4.6	Diagnòstic	38
2.4.7	Prevenció i tractament	39
2.5	BIOLOGIA MOLECULAR APLICADA A LA DETECCIÓ D'EV I HPeV	39
2.5.1	Generalitats	39
2.5.2	Breu descripció metodològica	41
2.5.2.1	PCR, real-time RT-PCR i PCR niada múltiple	41
2.5.2.2	Real-time RT-PCR PAN EV d'elaboració pròpia de l'Hospital Sant Joan de Déu	42
2.5.2.3	FilmArray® Meningitis/Encephalitis panel	43
2.5.2.4	Seqüenciació de primera generació	44
2.5.2.5	Seqüenciació de segona generació	45
2.5.2.6	Seqüenciació de tercera generació	46
2.6	NEOPTERINA COM A BIOMARCADOR DE GRAVETAT.....	47
3	JUSTIFICACIÓ I HIPÒTESIS	49
4	OBJECTIUS.....	53
5	RESULTATS.....	57
5.1	Primer article	61
5.1.1	Resum del primer article	70
5.2	Segon article.....	75
5.2.1	Resum del segon article.....	79
5.3	Tercer article	81
5.3.1	Resum del tercer article	95
5.4	Quart article	99
5.4.1	Resum del quart article	103
6	DISCUSSIÓ	105
7	CONCLUSIONS	119
8	BIBLIOGRAFIA	123
9	ANNEX DE RESULTATS	145

9.1	Cinquè article	149
9.1.1	Resum del cinquè article	159
9.2	Sisè article:.....	163
9.2.1	Resum del sisè article	189

1 ABREVIACIONES

1 ABREVIACIONS

Àcid ribonucleic (RNA)

Àrea sota la corba (AUC)

Coxsackievirus (CV)

2',3'-didesoxinucleòtids trifosfats (ddNTP)

Echovirus (E)

Enterovirus (EV)

Enterovirus no poliovirus (ENP)

Factor de necrosi tumoral α (TNF- α)

Factor estimulant de colònies de granulòcits (G-CSF)

Factor nuclear potenciador de les cadenes lleugeres κ de les cèl·lules B activades (NF- κ B)

FilmArray® Meningitis/Encephalitis (FA-M/E)

Freqüència cardíaca (FC)

Gasdermina D (GSDMD)

Gen induïble de l'àcid retinoic I (RIG-I)

Immunoglobulines intravenoses (IGIV)

Iniciativa Global per a l'Eradicació de la Poliomièlitis (GPEI)

Interleuquina-1 β (IL-1 β)

Interferó (IFN)

Líquid cefaloraquidi (LCR)

Malaltia boca-mà-peu (MBMP)

Mielitis flàccida aguda (MFA)

Organització Mundial de la Salut (OMS)

Paràlisi flàccida aguda (PFA)

Parechovirus (HPeV)

Poliovirus (PV)

Poliovirus derivats de la vacuna de la poliomièlitis (PVDV)

Poliovirus salvatges (PVS)

Proteïna associada a la diferenciació del melanoma 5 (MDA5),

Proteïna de senyalització antiviral mitocondrial (MAVS)

Reacció en cadena de la polimerasa real time després de transcriptasa inversa (real-time RT-PCR)

Receptor tipus Toll 3 (TLR3)
Receptors tipus RIG-I (RLR)
Ressonància magnètica (RM)
Seqüenciació de nova generació metagenòmica (mNGS)
Seqüenciació del genoma complet (WGS)
Sistema nerviós central (SNC)
Tomografia computeritzada (TC)
Trifosfat de guanosina (GTP)
Unitat de Cures Intensives Pediàtrica (UCIP)
Vacuna antipoliomielítica inactivada (VPI)
Vacuna antipoliomielítica oral (VPO)
Virus de la vacuna de la poliomielitis oral (VVPO)
Virus herpes humà (VHH)
Virus herpes simple (VHS)

2 INTRODUCCIÓ

2 INTRODUCCIÓ

2.1 GENERALITATS

La present Tesi Doctoral s'inscriu en el marc de dos projectes FIS consecutius que han dut a terme una activitat de vigilància epidemiològica d'enterovirus (EV) i parechovirus (HPeV) a Espanya, "Investigación en infecciones por enterovirus y parechovirus que causan patologías neurológicas y sistémicas severas en población infantil" (PI15CIII/00020, 2016-2018) i "Investigación de las infecciones neurológicas graves en niños causadas por enterovirus emergentes en España: EV-A71 y EV-D68" (PI18CIII/00017, 2019-fins l'actualitat), en que l'autor ha participat en qualitat d'investigador col·laborador.

En el decurs d'aquesta activitat, pren especial rellevància l'aparició des de març de 2016 a Catalunya d'una sèrie de casos de pacients pediàtrics amb patologia neurològica aguda amb signes d'afectació de tronc encefàlic¹. L'equip de l'Hospital Vall d'Hebron i l'Institut Català de la Salut van tenir un paper clau en donar la primera veu d'alarma, en ser centres receptors dels primers pacients afectes de l'àrea de Tarragona^{2,3}. En els primers casos es va identificar l'EV, però aquests resultats s'havien d'interpretar amb precaució perquè eren producte de l'anàlisi de mostres no invasives en un nombre reduït de pacients. A més, a Espanya mai no s'havia descrit un brot d'infecció per EV amb aquestes característiques clíniques. En un moment d'incertesa, va ser clau la ràpida capacitat de coordinació dels recursos humans i tècnics que es va orquestrar des de la Subdirecció General de Vigilància i Resposta a Emergències de Salut Pública, a través del "Protocol d'actuació davant casos d'EV en població pediàtrica"⁴. Durant el brot d'encefalitis de tronc de l'any 2016, seguint les instruccions de Catsalut, des del nostre centre es van notificar tots els casos a l'Àrea de vigilància epidemiològica referent i es va treballar en xarxa amb el Centre Nacional de Microbiologia i l'Hospital de Sant Pau.

Davant d'aquest escenari, vam considerar oportú estudiar i caracteritzar microbiològicament els pacients amb símptomes neurològics de forma prospectiva, per tal de respondre a una sèrie d'interrogants que es van generar davant els primers casos: Era l'EV l'agent causal del brot? Podíem demostrar la presència de l'EV en el sistema nerviós central (SNC)? Quin genotip era? La soca s'havia originat per mutació d'una soca local o bé era importada? Quines característiques clíniques tenien els pacients afectes en relació a altres descripcions? Seríem capaços d'identificar nous biomarcadors amb implicacions pronòstiques i terapèutiques? La gravetat de la patologia, el fet que afectés a població infantil, i la novetat en el nostre medi, expliquen l'important repercussió mediàtica que va tenir aquest brot, així com l'impacte dels estudis que formen part d'aquesta Memòria de Tesi, tant en premsa especialitzada com no especialitzada⁵.

2.2 VIGILÀNCIA EPIDEMIOLÒGICA D'EV I HPeV

La vigilància epidemiològica d'infeccions per EV i HPeV té els seus orígens en el programa per a l'eradicació de la poliomielitis de l'Organització Mundial de la Salut (OMS). L'estàndard de referència per a la vigilància de la poliomielitis és el programa de vigilància de paràlisi flàccida aguda (PFA), que té per objectiu descartar o confirmar la presència de poliomielitis en qualsevol cas de PFA en un menor de 15 anys⁶. L'única tècnica acceptada és l'aïllament viral en cultiu cel·lular, a partir de mostres de femta⁶. Actualment l'OMS recomana que en els casos de PFA s'estudiï no només la presència de poliovirus (PV) si no també la d'enterovirus no poliovirus (ENP) que també són causa d'important morbiditat i mortalitat, com per exemple l'EV-D68 i l'EV-A71.

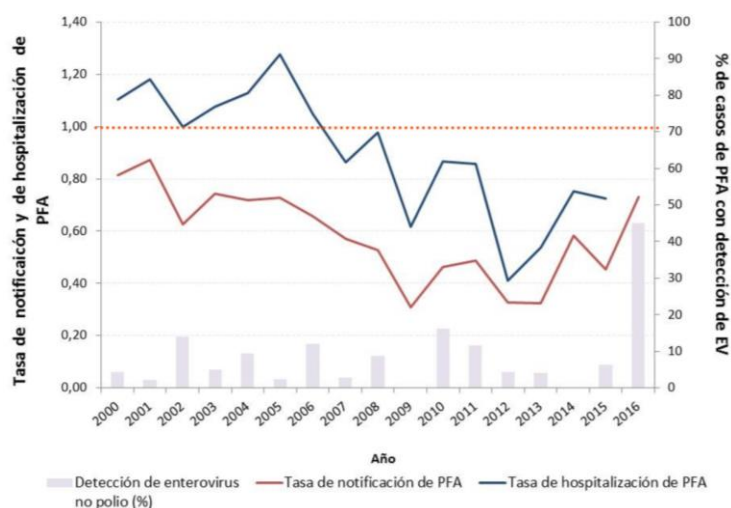


Figura 1. Taxa de notificació de casos de PFA a Espanya entre 2000 i 2016. Figura extreta de l'informe *Vigilancia de la Parálisis Flácida Aguda y Vigilancia de Enterovirus. Plan de acción en España para la erradicación de la Poliomieltis*⁷.

Mantenir l'estatus de "lliure de poliomieltis" és un repte en aquells països no endèmics, on la disminució progressiva de la percepció de risc del personal sanitari pot afectar els resultats del programa de vigilància de PFA. Per exemple, les dades del programa de vigilància de PFA a Espanya, vigent des de l'any 1998, reflecteixen que la taxa de notificació de casos de PFA és inferior a l'esperat segons l'OMS (1 cas/100.000 menors de 15 anys a l'any) (**Figura 1**)⁶. Convé tenir present que l'amenaça de la poliomieltis és encara vigent, ja que en els últims anys països que prèviament eren considerats "lliures de poliomieltis" han presentat casos importats de països endèmics, com per exemple el brot de Tajikistan que es va estendre a Rússia l'any 2010 o el brot de Xina l'any 2011^{8,9}.

Per tal d'intensificar la vigilància de la poliomieltis en països no endèmics que comptin amb serveis sanitaris de qualitat, l'OMS accepta sistemes complementaris, com per exemple la vigilància d'EV i la vigilància mediambiental de PV⁶. La vigilància d'EV té per objectiu demostrar l'absència de PV circulants entre els EV caracteritzats en mostres clíniques de pacients amb quadres clínics diferents de PFA. En ampliar el focus d'estudi, permet estudiar patologies neurològiques i sistèmiques produïdes per ENP que també són causa d'important morbiditat i mortalitat, com per exemple l'EV-D68 i l'EV-A71. La vigilància d'EV, vigent a Espanya des de 1998, és voluntària i no està establerta en tot el territori nacional⁷. La xarxa de laboratoris està constituïda pel Laboratori

Nacional de PV del Centre Nacional de Microbiologia de l'Institut de Salut Carles III, així com per laboratoris de 9 hospitals⁷.

La vigilància de HPeV sempre ha estat lligada a la vigilància d'EV, tant per motius històrics, doncs no va ser fins l'any 1992 que els HPeV van considerar-se un gènere independent dels EV, com per motius clínics, doncs també són causa de patologies neurològiques i sistèmiques greus que se solapen amb patologies produïdes per EV¹⁰.

Són objecte d'estudi d'aquesta Tesi Doctoral els ENP (no *Rhinovirus*) i els HPeV.

2.3 GÈNERE ENTEROVIRUS

2.3.1 Classificació

El gènere Enterovirus forma part de la família Picornaviridae, formada per virus petits (30 nm) amb àcid ribonucleic (RNA) monocatenari de polaritat positiva, amb una càpside icosaèdrica i sense embolcall¹¹. Al seu torn, el gènere Enterovirus està constituït per 15 espècies, *Enterovirus A-L* i *Rhinovirus A-C*, i més de 300 tipus¹². Només són patògens humans els *Enterovirus A-D* i els *Rhinovirus A-C*¹¹. S'agrupen dins d'un mateix tipus (o genotip) els EV que presenten > 75% d'homologia en la seqüència de nucleòtids de la regió genòmica VP1 (> 85% d'homologia en la seqüència d'aminoàcids)¹¹. Històricament, els tipus s'han designat amb una terminologia heterogènia, com ara PV i ENP (entre els que s'inclouen, per exemple, els coxsackievirus [CV] A i B i els echovirus [E]), però els tipus recentment descoberts s'han numerat des de l'EV-D68 en amunt, de forma no contínua. El terme subgenotip designa un grup dins d'un genotip.

2.3.2 Epidemiologia

Els EV circulen amb un patró estacional en climes temperats, amb un pic d'incidència a la primavera i a l'estiu a Espanya (**Figura 2**), però en climes

2.3.3 Estructura i replicació

El genoma de l'EV té una longitud aproximada de 7.500 nucleòtids, que comprèn una regió 5' no traduïda de 750 nucleòtids, un marc de lectura obert (en anglès, open reading frame, ORF) de 6.700 nucleòtids, i una regió 3' no traduïda de 70-100 nucleòtids¹¹. La càpside viral icosaèdrica (**Figura 3**) està constituïda per 60 protòmers, formats per assemblatge de les proteïnes estructurals VP1-4²⁴. La regió 5' no traduïda és àmpliament conservada, per la qual cosa s'utilitza per a la detecció d'EV. Tanmateix, la regió codificant per a la proteïna VP1 presenta variabilitat entre genotips i subgenotips i conté la majoria d'epítops reconeguts pels anticossos neutralitzants, per al qual cosa s'utilitza per a la tipificació i l'anàlisi filogenètica¹¹.

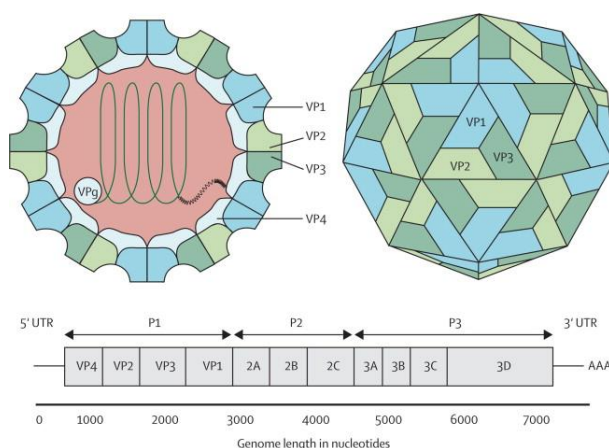


Figura 3. Estructura del viriò i del genoma de l'EV-A71. Figura extreta de la revista *Lancet Infectious Diseases*²⁵.

El cicle de replicació dels EV comença amb la unió de les proteïnes VP1-3 a receptors de membrana i l'endocitosis mitjançada per receptor (**Figura 4**)²⁶. L'RNA viral s'allibera al citoplasma a través d'un porus en la membrana de l'endosoma, unit de forma covalent a la proteïna VPg (3B), un encebador necessari per a la replicació²⁶. La traducció de la regió ORF codifica una poliproteïna que és escindida per les proteïnases virals (2A^{pro}, 3C^{pro} i 3CD^{pro}) en 3 proteïnes estructurals (VP0, VP1 i VP3) i 7 proteïnes no estructurals (2A-C i 3A-D)²⁶. Les proteïnases 2A^{pro} i 3C^{pro} també escindeixen múltiples proteïnes de l'hoste per optimitzar la replicació i inhibir la resposta cel·lular antiviral²⁶.

infectades per PV³⁰. Diferents estudis han relacionat de forma directa fenòmens de recombinació amb l'aparició de nous subgenotips d'EV-A71³¹.

2.3.4 Fisiopatologia

Un cop s'ha produït la infecció, els llocs de replicació primaris són el tracte gastrointestinal (plaques de Peyer de l'intestí prim) i respiratori (amígdals)¹¹. La replicació continua en els nòduls limfàtics adjacents (cervicals i mesentèrics) i pot produir virèmia¹¹. En la majoria de pacients, la infecció es limita en aquest punt i romanen asimptomàtics³². Tanmateix, si no es controla la infecció es produeix la disseminació hematògena. Alguns tipus d'EV presenten tropismes tissulars específics, incloent cèl·lules neuronals, cardiomiòcits i cèl·lules epitelials entre d'altres¹¹. La infecció per EV produeix un dany cel·lular directe, però s'hipotetitza que part de la patologia s'explica per la resposta inflamatòria desencadenada en l'hoste³³. La immunitat humoral és el principal mecanisme de defensa front els EV. N'és una prova que els pacients amb agammaglobulinèmia lligada al cromosoma X presenten infeccions més greus i perllongades³⁴.

2.3.5 Clínica

Les infeccions per EV són freqüentment asimptomàtiques i sobretot afecten a lactants i escolars¹⁷. Poden produir patologies d'un ampli espectre de gravetat. S'associen a infeccions de vies respiratòries altes, herpangina, conjuntivitis hemorràgica aguda, bronquitis, bronquiolitis i pneumònia¹⁷. Poden produir exanemes de diferents tipus, un dels més característics és el que dona nom a la malaltia boca-mà-peu (MBMP)¹⁷. També s'associen a febre sense focus i sèpsia neonatal, a vegades de curs fatal¹⁷. Són la primera causa de meningitis asèptica, si bé també poden produir altres patologies neurològiques, com encefalitis, encefalitis de tronc i PFA¹⁷. També s'associen amb manifestacions rares però greus, com miocarditis, pericarditis, pleurodínia (malaltia de Bornholm), hepatitis i pancreatitis¹⁷. Recentment s'ha implicat els EV, sobretot el CV-B1, en la fisiopatologia de la diabetis mellitus tipus 1³⁵. Un mateix tipus d'EV pot produir diferents patologies i una mateixa patologia pot ser produïda per diferents tipus d'EV, si bé hi ha algunes associacions característiques (**Taula**

1)¹⁷. Tot i que el nom pugui portar a la confusió, no són una causa freqüent de gastroenteritis aguda.

Els EV són la causa més freqüent de meningitis asèptica infantil en aquells casos en que s'identifica l'etiologia en el nostre medi³⁶. Els tipus d'EV més freqüents són: CV-B2, CV-B3, CV-B4, CV-B5, CV-A5, CV-A7, CV-A9, CV-A16, E4, E6, E9, E11, E14, E16, E25, E30, E31 i l'EV-A71³⁷. En la meningitis per EV és característica la pleocitosi, a vegades amb predomini de cèl·lules polimorfonuclears, però en nounats es descriu sovint també la presència de material genètic en LCR en absència de pleocitosi³⁶. El pronòstic a curt termini és benigne, però manquen estudis a llarg termini³⁶.

Espècie	Tipus representatius	Manifestacions clíniques característiques
EV-A	CV-A6, CV-A16, EV-A71	S'associen amb exanemes maculovesiculars, sobretot MBMP, infeccions de vies respiratòries altes, herpangina i conjuntivitis L'EV-A71 s'associa amb MBMP i brots de patologia neurològica aguda (meningitis, encefalitis de tronc i encefalomièlitis) a Àsia i Regió del Pacífic
EV-B	Echovirus, CV-A9, CV-B4	S'associen amb meningitis, sèpsia neonatal, miocarditis, pericarditis, pleurodínia (malaltia de Bornholm), pneumonitis focal i necrosi hepàtica
EV-C	PV 1-3, CV-A24	Els PV s'associen amb meningitis i PFA L'EV-A24 s'associa amb conjuntivitis hemorràgica
EV-D	EV-D68, EV-D70, EV-D94	L'EV-D68 s'associa amb brots de malaltia respiratòria L'EV-D70 s'associa amb epidèmies de conjuntivitis hemorràgica L'EV-D94 s'associa amb paràlisi flàccida

Taula 1. Manifestacions clíniques característiques dels EV. Taula adaptada del llibre *Manual of Childhood Infection: The Blue Book*¹⁷.

Mereixen consideració a part els PV, així com l'EV-D68 i l'EV-A71, que s'han associat amb l'aparició de brots en diferents regions.

2.3.6 Diagnòstic

La detecció d'EV en mostres invasives (sang o líquid cefaloraquídi [LCR]) confirma la infecció, mentre que la detecció en mostres no invasives (mostres respiratòries o fecals) s'ha d'interpretar amb precaució, ja que els portadors asimptomàtics també poden excretar el virus de forma sostinguda¹⁸.

La detecció de material genètic mitjançant reacció en cadena de la polimerasa després de transcriptasa inversa (RT-PCR) està desplaçant l'aïllament viral en cultiu cel·lular per al diagnòstic de la infecció per EV³⁸. La regió 5' no traduïda del genoma dels EV conté elements essencials per a la replicació viral i la traducció de la regió codificant, per la qual cosa es troba àmpliament conservada entre les diferents espècies³⁹. S'han identificat seqüències de la regió 5' no traduïda d'alta homologia per al desenvolupament d'encebadors i sondes per a la detecció d'EV mitjançant RT-PCR³⁹.

L'amplificació de la regió VP1 i seqüenciació de l'amplicó està desplaçant el test de neutralització per a la tipificació d'EV³⁸. La regió VP1 es correlaciona amb el serotip viral, per la qual cosa es pot realitzar la tipificació mitjançant la comparació d'un fragment 3' de la regió VP1 d'un EV amb seqüències de referència disponibles a bases de dades de seqüències genètiques (com per exemple GenBank)⁴⁰. Les dades de seqüenciació genètica, a més de servir per a la tipificació d'EV, poden utilitzar-se per a realitzar anàlisi filogenètica, és a dir, una estimació de la distància genètica (nombre de substitucions) que reflecteix el temps de separació entre dos virus amb un ancestre comú⁴¹.

Probablement el futur de la detecció d'EV passi per les noves tècniques de biologia molecular, com ara la seqüenciació de nova generació metagenòmica (mNGS) clínica. La tipificació i anàlisi filogenètica a partir de la seqüenciació del genoma complet (WGS), que ofereix la mNGS clínica, permet arribar a conclusions molt més precises que no pas els anàlisis realitzats a partir d'una única regió genòmica⁴².

2.3.7 Prevenció i tractament

Tot i la freqüència de les infeccions per EV, només es disposa de vacunes aprovades front als PV i, recentment, front a l'EV-A71 a la Xina, que es comentaran a part.

El tractament de les infeccions per EV és de suport⁴³. En funció del tipus i la gravetat de la patologia, aquest pot incloure ventilació mecànica, administració d'inotrops, oxigenació amb membrana extracorpòria, dispositius d'assistència ventricular i trasplantament cardíac o hepàtic.

L'ús d'immunoglobulines intravenoses (IGIV) inespecífiques s'ha descrit en infeccions greus per EV, però falten evidències per a una recomanació forta⁴³. Se sap que la immunitat humoral és clau en la resposta front els EV, i les IGIV contenen anticossos front a EV en quantitats variables³⁴. Un assaig clínic randomitzat en nounats amb infecció per EV, amb importants limitacions per la mida de la mostra (n=16), va mostrar que l'administració d'IGIV reduïa la duració de la virèmia, sense repercussió clínica⁴⁴. L'ús d'IGIV en l'encefalitis de tronc per EV-A71 s'exposarà a part.

No es disposa de cap antiviral aprovat per a les infeccions per EV. El pleconaril, un inhibidor de càpside amb activitat creuada front a picornavirus, és l'antiviral més estudiat⁴³. Un assaig clínic randomitzat en nounats amb sèpsia per EV (n=61) va mostrar que l'administració de pleconaril reduïa la duració de la virèmia i augmentava la supervivència⁴⁵.

2.3.8 Poliovirus

2.3.8.1 Classificació

Els PV formen part de l'espècie *Enterovirus C*. La importància dels PV és de tal magnitud que s'utilitza un terme per designar els EV de qualsevol altre tipus, els ENP. Els PV es classifiquen en poliovirus salvatges 1-3 (PVS 1-3), virus de la vacuna de la poliomièlitis oral (VVPO) i poliovirus derivats de la vacuna de

la poliomièlitis (PVDV). La poliomièlitis pot ser produïda per PVS i PVDV. Els PVDV són soques amb neurovirulència augmentada, generalment per mutació de la regió 5' no traduïda de la seqüència del VVPO⁴⁶.

2.3.8.2 Epidemiologia

Els PV van ser descrits com a causants de la poliomièlitis el 1909⁴⁷. Des del llançament de la Iniciativa Global per a l'Eradicació de la Poliomièlitis (GPEI) l'any 1988, la incidència de la poliomièlitis s'ha reduït un 99,9% (**Figura 5**)⁶. Les soques PVS3 i PVS2 van ser eradicades el 2012 i el 2015, respectivament⁶. La soca PVS1 és l'única circulant en l'actualitat. Quatre de les sis regions de l'OMS han assolit l'eradicació de la poliomièlitis: Les Amèriques (1994), Pacífic Occidental (2000), Europa (2002) i Àsia Sud-Oriental. Encara persisteix la transmissió endèmica de PVS1 a algunes regions d'Afganistan, Pakistan i Nigèria⁶. Europa va ser declarada lliure de poliomièlitis l'any 2002⁴⁸.

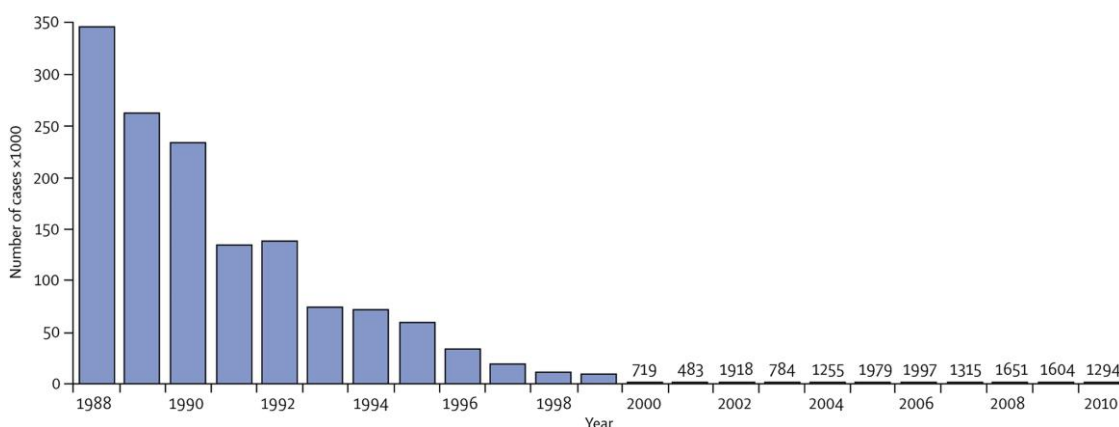


Figura 5. Casos de poliomièlitis reportats a tot el món entre 1988 i 2010. Gràfica extreta de la revista *The Lancet* ⁴⁹.

2.3.8.3 Clínica

Les infeccions per PV són asimptomàtiques en el 95% dels casos¹⁷. Poden produir poliomièlitis abortiva, meningitis asèptica, polioencefalitis i poliomièlitis paralítica (0,1-1% dels pacients)¹⁷. La poliomièlitis abortiva és una malaltia lleu que es caracteritza per la presència de febre, sovint acompanyada

de cefalea, odinofàgia, anorèxia i vòmits, de 1-3 dies de duració¹⁷. La polioencefalitis es caracteritza per alteració de la consciència i convulsions¹⁷.

La poliomielitis paralítica segueix un curs bifàsic: pròdroms en forma de poliomielitis abortiva i, 2-5 dies després de la resolució, aparició de febre, signes meningis, miàlgies greus i finalment debilitat muscular en la localització afectada. L'alteració de parells cranials afecta al 5-35% dels casos¹⁷. Una de les principals complicacions és la fallada respiratòria, per alteració del centre respiratori i els parells cranials IX, X i XII. En l'era pre-vacunal, la mortalitat era del 60%, sobretot per fallada respiratòria¹⁷. Fins al 60% dels pacients presenten dèficits residuals¹⁷. La síndrome post-poliomielitis, que afecta el 30% dels pacients amb recuperació completa inicial, consisteix en la reaparició de debilitat i dolor en els grups musculars prèviament afectats 25-35 anys després¹⁷.

2.3.8.4 Diagnòstic

Els PV rarament es detecten en el LCR, per la qual cosa es recomana la recollida de frotis faringi i mostra de femta per a la detecció del virus¹⁷.

2.3.8.5 Prevenció i tractament

Es disposa de dos tipus de vacunes front a la poliomielitis:

- Vacuna antipoliomielítica inactivada (VPI) o vacuna Salk¹⁷. Vacuna de virus inactivats que combina les tres soques de PV.
- Vacuna antipoliomielítica oral (VPO) o vacuna Sabin¹⁷. Vacuna de virus vius atenuats que combina les tres soques de PV. Presenta major immunogenicitat, inducció d'immunitat de mucoses, facilitat en l'administració i el potencial benefici de la disseminació dels virus vacunals entre la població no immunitzada. Tanmateix, la inestabilitat de les soques vacunals i la recombinació amb altres virus pot donar lloc a l'aparició de VDPV.

Donat que la majoria de poliomielitis secundàries a PVDV estaven associades al PVDV2, l'OMS va substituir la VPO trivalent per una VPO bivalent

a tot el món l'any 2016. Aquest és el primer pas en la retirada definitiva de les vacunes de virus vius atenuats, prevista per l'any 2019-2020⁶. A Espanya, la VPO es va substituir per la VPI l'any 2004. Des de 1996, la cobertura nacional amb tres dosis supera el 95%⁷.

El tractament de la poliomièlitis paralítica és de suport. L'analgèsia i el repòs absolut durant la fase aguda disminueixen l'extensió de la paràlisi¹⁷. Es recomana evitar injeccions intramusculars pel mateix motiu¹⁷. En cas de fallada respiratòria es requereix ventilació mecànica¹⁷. També és important la fisioteràpia en la fase de seqüeles¹⁷.

2.3.9 Enterovirus D68

2.3.9.1 Classificació

L'EV-D68 forma part de l'espècie *Enterovirus D*. Es classifica en els subgenotips A1-2, B1-3, C i D. La majoria de casos de PFA s'associen amb l'EV-D68 B1⁵⁰.

2.3.9.2 Epidemiologia

L'EV-D68 va ser descrit per primera vegada associat a malaltia respiratòria lleu l'any 1962⁵¹. Tanmateix, l'EV-D68 va saltar a la primera pàgina de l'actualitat arran del brot de malaltia respiratòria greu i mièlitis flàccida aguda (MFA)/PFA, sobretot en població infantil, a Estats Units i Canadà l'any 2014⁵⁰. Simultàniament es van reportar brots més petits a múltiples països d'Europa i a Xina⁵². Els primers casos reportats de MFA/PFA per EV-D68 a Espanya daten de 2015⁵³. L'EV-D68 comparteix múltiples propietats amb els RV: replica millor a 33°C, és inestable en medi àcid (no sobreviu a l'exposició a sucs gàstrics), es replica principalment en l'epiteli respiratori i es transmet per via respiratòria; derivat de l'anterior, sobretot es detecta en mostres respiratòries¹¹.

2.3.9.3 *Clínica*

Les infeccions per EV-D68 són freqüentment asimptomàtiques i afecten principalment a nens⁵⁴. Poden produir infeccions respiratòries de vies altes, bronquitis, bronquiolitis i pneumònia⁵⁴. La majoria de pacients presenten símptomes respiratoris lleus, però alguns poden requerir ventilació mecànica⁵⁴. L'antecedent d'asma predisposa a malaltia respiratòria greu⁵⁴. La MFA/PFA, al igual que la poliomièlitis paralítica, segueix un curs bifàsic en el 90% dels pacients: pròdroms en forma de febre o malaltia respiratòria i, 5 dies després, reaparició de febre, miàlgies i debilitat muscular en la localització afectada⁵⁵. Rarament és mortal, tot i que s'han reportat alguns casos.

2.3.9.4 *Diagnòstic*

L'EV-D68, al igual que els PV i l'EV-A71, rarament es detecta en LCR, per la qual cosa es recomana la recollida de frotis faringi i mostra de femta per a la detecció del virus⁵⁵. El frotis faringi és la mostra més rentable per a la detecció del virus, tot i que l'excreció a orofaringe és breu (1 setmana)⁵⁵. En la ressonància magnètica (RM) medul·lar, s'observen lesions hiperintenses en seqüències ponderades en T2⁵⁶. Les lesions són longitudinals i extenses, bilaterals i predominantment en astes anteriors⁵⁶. També poden observar-se lesions a troncs de l'encèfal⁵⁶.

2.3.9.5 *Prevenició i tractament*

No es disposa de cap vacuna front a l'EV-D68. El tractament de la MFA/PFA per EV-D68 és de suport. Durant el brot d'Estats Units i Canadà l'any 2014, van administrar-se corticoides, IGIV i plasmafèresi, sense benefici clínic evident⁵⁰. La fluoxetina ha demostrat activitat front a EV-D68 en estudis in vitro, però no ha demostrat millorar el pronòstic neurològic en estudis in vivo^{57,58}.

2.3.10 Enterovirus A71

2.3.10.1 Classificació

L'EV-A71 forma part de l'espècie *Enterovirus A*. La classificació de l'EV-A71 en subgenotips es basa en l'anàlisi de la regió codificant per a la proteïna VP1⁵⁹. El subgenotip A només conté el prototip BrCr. El subgenotip B se subclassifica en B0-5 i el subgenotip C en C1-5 (també es diferencien els llinatges C4a-b). Ambdós subgenotips tenen una distribució global. Recentment s'ha descobert un subgenotip nou a l'Índia (D) i dos a l'Àfrica (E i F)⁶⁰.

2.3.10.2 Epidemiologia

El primer brot d'EV-A71 associat a malaltia neurològica aguda va ser descrit a Califòrnia entre 1969 i 1972⁶¹, tot i que les mostres més antigues en que s'ha aïllat el virus daten de 1963, a Holanda⁶². Dos brots amb una important mortalitat associada van tenir lloc a Bulgària l'any 1975 i a Hongria l'any 1978^{63,64}. Des de llavors, s'han reportat casos esporàdics i brots afectant principalment menors de 5 anys en múltiples països. Els brots que han afectat a un major nombre de pacients i que han associat major morbimortalitat s'han localitzat a Àsia i a la Regió del Pacífic, de forma periòdica cada 2-3 anys. Destaquen el brot de Taiwan (Xina) l'any 1998 amb 130.000 casos i 78 èxits⁶⁵, i el brot d'Anhui (Xina) l'any 2008 amb 500.000 casos i 128 èxits⁶⁶. En aquests països, la infecció per EV-A71 és un problema de salut pública, es considera una malaltia de declaració obligatòria i és prioritari el desenvolupament de vacunes i antivirals⁶⁷. En el nostre medi, es realitza declaració microbiològica per part dels laboratoris al Sistema de Notificació Microbiològica de Catalunya de tots els microorganismes que ocasionen meningoencefalitis (inclòs l'EV-A71).

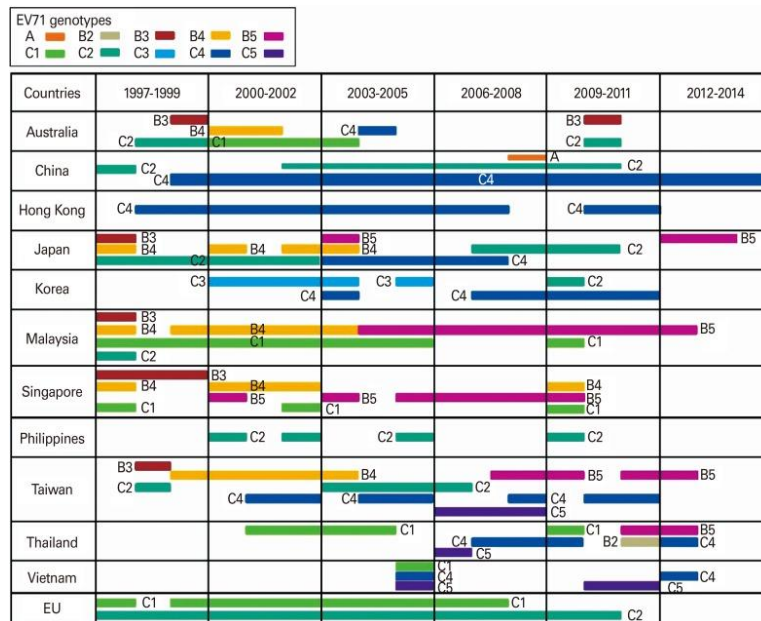


Figura 6. Subgenotips d'EV-A71 identificats en brots de 1997 a 2014. Figura extreta de la revista *Clinical and Experimental Vaccine Research*⁶⁸.

La distribució geogràfica i temporal dels subgenotips d'EV-A71 és complexa i canviant (**Figura 6**). Els subgenotips B van ser predominants als anys 1970-1980, i no va ser fins a mitjans de 1980 que es van identificar nous subgenotips que van passar a classificar-se com a subgenotips C⁴⁰. A Àsia i a la Regió del Pacífic, destaquen com a causants de brots el subgenotip B5, que predomina a Malàisia, Japó, i Taiwan, i el subgenotip C4, que predomina a Xina, Korea i Vietnam²⁵. Per altra banda, el subgenotip C1 té una distribució més generalitzada i acostuma a associar-se a casos esporàdics, excepte el brot d'Austràlia l'any 1986^{25,69}. A Europa, els subgenotips predominants són C1 i C2^{70,71}. Una nova variant recombinant de subgenotip C1 va identificar-se a Alemanya l'any 2015⁷². S'han reportat casos esporàdics de patologia neurològica aguda a Alemanya, França i al Regne Unit⁷²⁻⁷⁴. A Espanya, abans del brot d'encefalitis de tronc l'any 2016, s'havia observat la circulació d'EV-A71 C2, si bé la intensitat era baixa i la simptomatologia associada era exclusivament lleu (**Figura 7**)¹³.

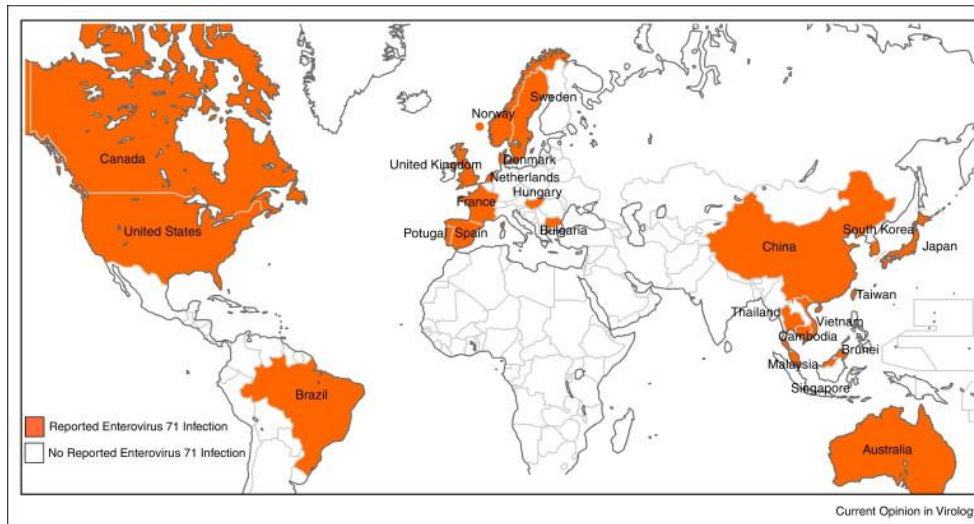


Figura 7. Països on s'havia reportat aïllament d'EV-A71 a data d'abril de 2014. Figura extreta de la revista *Current Opinion in Virology*⁷⁵.

2.3.10.3 Replicació

Pel que fa a la replicació viral, la majoria de conceptes referents als EV en general són aplicables a l'EV-A71, si bé la unió a receptors de membrana presenta algunes particularitats que es detallen a continuació. El receptor *scavenger* classe B membre 2 té un paper clau en la infecció per EV-A71, s'expressa en la membrana dels lisosomes i està implicat en el transport del sistema endosoma-lisosoma⁷⁶. L'EV-A71 també utilitza el lligand de glicoproteïna P-selectina 1, que s'expressa en la membrana dels leucòcits i està implicat en la interacció dels leucòcits amb l'endoteli vascular⁷⁷.

2.3.10.4 Anatomia patològica de l'encefalomielitis per EV-A71

En l'estudi de pacients èxits per encefalomielitis per EV-A71, a nivell macroscòpic, destaca un patró de distribució de la inflamació repetitiu en que les regions més afectades són la medul·la espinal (astes anteriors), el tronc cerebral (regió dorsal), els nuclis dentats del cerebel i l'hipotàlem (**Figura 8**)⁷⁸. L'àrea motora del còrtex cerebral pot estar lleument afectada, però altres regions estan respectades⁷⁸. També s'observen signes de meningitis lleu⁷⁸. A nivell microscòpic, s'observa infiltrat limfocitari perivascular, edema, necrosi, nòduls de micròglia i neuronofàgia, troballes típiques d'encefalitis virals⁷⁸. Les cèl·lules

inflamatòries són principalment macròfags i neutròfils; els limfòcits es troben més dispersos⁷⁸. La presència d'antígens i RNA virals en les neurones d'aquestes localitzacions confirma el neurotropisme de l'EV-A71, però l'àrea d'inflamació acostuma a ser molt més extensa⁷⁸.

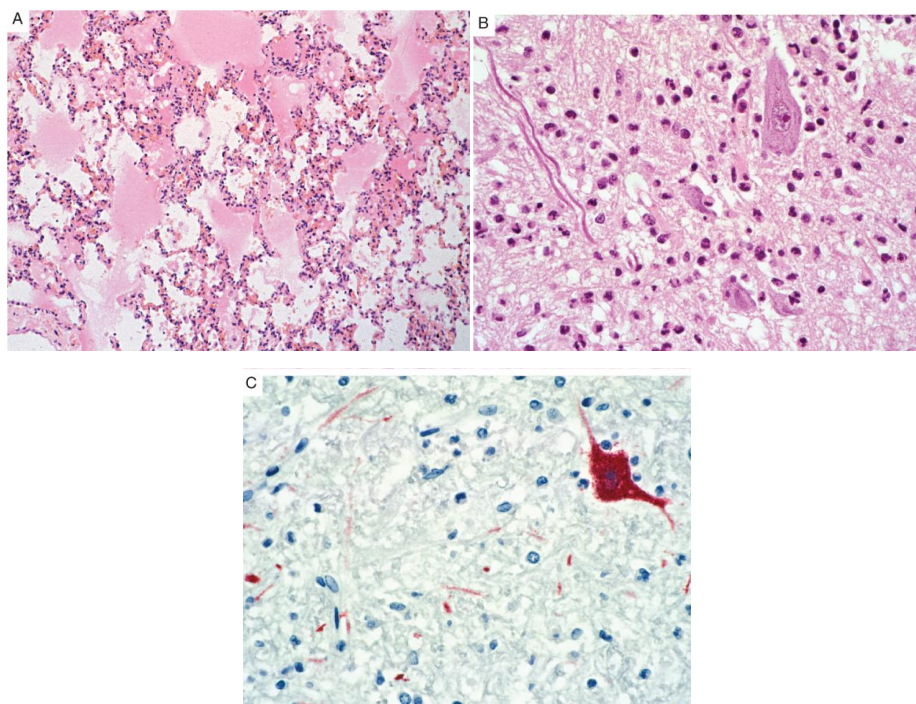


Figura 8. Troballes anatomopatològiques en un cas èxitus per encefalitis de tronc per EV-A71: A) edema pulmonar neurogènic (tinció hematoxilina-eosina); B) prominència de neutròfils en el tronc de l'encèfal (tinció hematoxilina-eosina); C) tinció immunohistoquímica per a la localització d'antigen d'EV-A71 en el tronc de l'encèfal. Figura extreta de la revista *Journal of Pathology*⁷⁹.

Pel que fa a altres localitzacions, en casos de fallada cardiopulmonar s'observa edema pulmonar amb hemorràgies multifocals, amb o sense signes inflamatoris, en absència d'antígens o RNA virals (**Figura 7**)⁸⁰. No s'acostumen a observar signes de miocarditis⁸⁰. La detecció d'antígens i RNA viral a l'epiteli escamós de les criptes amigdalines, però no en altres regions del tracte gastrointestinal, suggereix que aquest és el lloc de replicació primari⁸¹.

2.3.10.5 Fisiopatologia de l'encefalitis de tronc per EV-A71

L'EV-A71, després d'infectar l'hoste, envaeix els llocs de replicació primaris. Seguidament es pot disseminar mitjançant virèmia, colonitzant la pell i

altres òrgans⁷⁸. El neurotropisme de l'EV-A71 i la citòlisi que indueix es van demostrar per primera vegada mitjançant la detecció d'antígens i RNA virals en neurones de pacients èxits per encefalomièlitis a Malàisia l'any 1999⁸². A diferència d'altres EV, s'hipotetitza que la neuroinvasió es produeix principalment per transport axonal retrògrad, des dels parells cranials i els nervis motors perifèrics fins als nuclis motors del tronc de l'encèfal i les astes anteriors de la medul·la espinal, respectivament (**Figura 9**)⁸³.

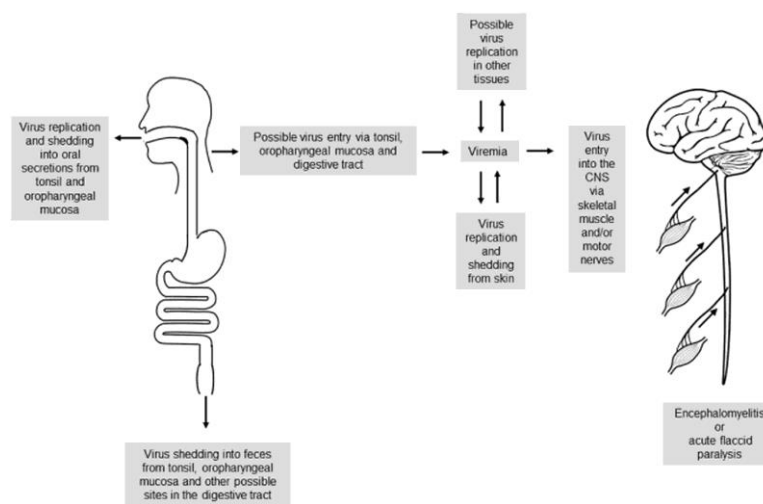


Figura 9. Hipòtesi sobre l'entrada de l'EV-A71 al SNC. Il·lustració extreta de la revista *Brain Pathology*⁷⁸.

La teoria del transport axonal retrògrad es basa en els estudis de Chen et al. que treballant en models de ratolí va observar que, després de la inoculació intramuscular d'EV-A71 en extremitats inferiors, es detectava a les astes anteriors de la medul·la espinal distal i després s'estenia a segments superiors; després de la inoculació intramuscular en extremitats superiors, es detectava a les astes anteriors de la medul·la espinal proximal⁸³. També va reportar que la colquicina, un inhibidor del transport axonal, reduïa la neuroinfecció de forma dosi dependent⁸³.

Després de l'entrada en el SNC, l'EV-A71 produeix mort cel·lular neuronal i astrocítica, el que desencadena una resposta inflamatòria i immunitària (cascada de citocines) que resulta en l'encefalitis de tronc⁸⁴. Les citocines més elevades en pacients amb edema pulmonar neurogènic són: interleuquina-1 β (IL-1 β), IL-1RA, factor estimulant de colònies de granulòcits (G-CSF), IL-6, IL-10,

factor de necrosi tumoral α (TNF- α) i interferó- γ (IFN- γ)⁸⁵. Per altra banda, l'alteració dels centres vasomotors i respiratoris produeix alliberació de catecolamines i disfunció autonòmica⁸⁶. S'hipotetitzava que la causa de l'edema pulmonar i la fallada cardiopulmonar és l'efecte combinat de la cascada de citocines i l'alteració dels centres vasomotors i respiratoris.

Els receptors de la immunitat innata que reconeixen l'EV-A71 són el gen induïble de l'àcid retinoic I (RIG-I) i la proteïna associada a la diferenciació del melanoma 5 (MDA5), ambdues de la família de receptors tipus RIG-I (RLR), i el receptor tipus Toll 3 (TLR3) (**Figura 10**)⁸⁷. La unió de l'EV-A71 als receptors RLR desencadena una cascada de senyalització, mitjançant la proteïna de senyalització antiviral mitocondrial (MAVS), que activa els interferons de tipus I (IFN tipus I)⁸⁸ i del factor nuclear potenciador de les cadenes lleugeres κ de les cèl·lules B activades (NF- κ B)⁸⁹. La unió al receptor TLR3 activa IFN- β i NF- κ B⁹⁰. Els IFN tenen un paper clau en limitar la replicació viral⁹¹.

A més, recentment s'ha descrit que l'EV-A71 pot induir piroptosi, mitjançant l'assemblatge d'un complex supramolecular anomenat inflammasoma que desencadena una cadena de senyalització en la qual destaca la caspasa-1 i la gasdermina D (GSDMD)³³. La piroptosi és una forma de mort cel·lular programada altament inflammatòria desencadenada per patògens intracel·lulars que probablement formi part de la resposta antimicrobiana⁹².

Per altra banda, l'EV-A71 disposa de múltiples mecanismes per inhibir la resposta immunitària antiviral (**Figura 10**). Les proteïnases virals 2A^{pro} i 3C^{pro}, que escindeixen la poliproteïna de l'EV-A71, també poden escindir proteïnes del sistema immunitari de l'hoste, com per exemple RIG-I, MDA5, MAVS i GSDMD, afavorint la propagació del virus^{89,93-95}.

Aquestes troballes, junt amb l'evidència anatomopatològica que l'àrea d'inflamació acostuma a ser molt més extensa que l'àrea on es detecta la presència del virus en pacients amb encefalomièlitis⁷⁸, han conduït a la hipòtesi que més enllà del dany cel·lular directe produït per l'EV-A71, gran part de la patologia s'explica per la resposta inflammatòria desencadenada en l'hoste.

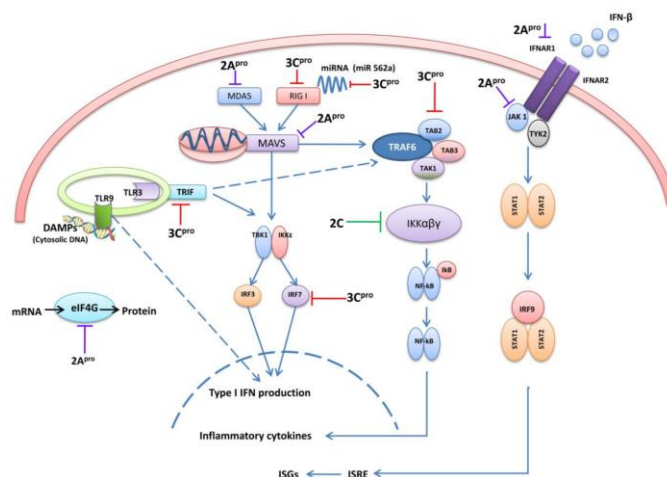


Figura 10. Receptors de la immunitat innata i estratègies d'evasió de l'EV-A71. Figura extreta de la revista *Viruses* ⁸⁷.

Encara existeix un buit de coneixement pel que fa a factors de risc de fallada cardiopulmonar en la infecció per EV-A71. Pel que fa a factors dependents del virus, alguns estudis associen determinats subgenotips amb major gravetat²⁵. Més recentment, algunes mutacions puntuals s'han associat amb major gravetat⁹⁶. De forma similar, alguns factors genètics de l'hoste, com per l'exemple l'HLA-A2, s'han associat a major gravetat, però el principal factor de risc és l'edat menor de 2 anys, probablement per la manca d'immunitat específica i creuada que confereix l'exposició repetida a infeccions per EV^{97,98}.

2.3.10.6 Clínica

Les infeccions per EV-A71 poden cursar de forma asimptomàtica i sobretot afecten a lactants i escolars⁹⁹. Característicament s'associen amb la MBMP i l'herpangina⁹⁹. Poden produir febre sense focus, infeccions respiratòries de vies altes, bronquitis, bronquiolitis, pneumònia i gastroenteritis⁹⁹. També pot causar patologies neurològiques agudes com la meningitis asèptica, l'encefalitis, l'encefalitis de tronc i menys freqüentment la síndrome de Guillain-Barré i l'encefalomièlitis, a vegades de curs fatal (**Taula 2**)⁹⁹. Donada la important morbimortalitat associada, en l'escenari actual en que la poliomièlitis es considera radicada en la majoria de països del món, l'EV-A71 s'ha guanyat el sobrenom de "la poliomièlitis del segle 21"¹⁰⁰.

Manifestació	Definició
MBMP	Febre i exantema papulovesicular palmoplantar que es pot acompanyar de vesícules o úlceres bucals. L'exantema pot ser maculopapular i també pot afectar natges, genolls i colzes.
Herpangina	Febre i múltiples úlceres bucals posteriors
Meningitis asèptica	Febre, cefalea, vòmits, signes meningis, pleocitosi (>5-10 cèl·lules/mm ³ de LCR) i cultiu de LCR negatiu
Encefalitis de tronc	Mioclònies, atàxia, nistagme, parèsies oculomotores i parèsies bulbars en diferents combinacions, amb o sense RM cerebral alterada. En regions subdesenvolupades, el diagnòstic d'encefalitis de tronc pot realitzar-se en nens amb mioclònies freqüents i pleocitosi
Encefalitis	Disminució de consciència (somnialescència, letargia o coma), convulsions o mioclònies
Encefalomielitis	PFA amb mioclònies, atàxia, nistagme, parèsies oculomotores i parèsies bulbars en diferents combinacions
Disfunció autonòmica	Suor freda, cutis reticular, taquicàrdia, taquipnea i hipertensió arterial
Edema/hemorràgia pulmonar	Destret respiratori amb taquicàrdia, taquipnea, crepitants i secrecions respiratòries rosades que apareix després de la disfunció autonòmica, amb radiografia toràcica que mostra infiltrats pulmonars bilaterals sense cardiomegàlia
Fallada cardiorrespiratòria	Taquicàrdia, destret respiratori, edema pulmonar, mala perfusió perifèrica que requereix inotrops, edema pulmonar per radiografia toràcica i disfunció contràctil per ecocardiografia

Taula 2. Manifestacions clíniques de la infecció per EV-A71. Taula extreta de la WHO Guide to Clinical Management and Public Health Response for HFMD¹⁰¹.

El terme MBMP, tal i com defineix la guia clínica de l'OMS, designa un exantema febril (**Figura 11**)¹⁰¹. Com que en els països d'Àsia i Regió del Pacífic, on la infecció per EV-A71 representa un problema de salut pública, els brots han cursat històricament amb manifestacions dermatològiques i neurològiques, en la literatura científica és freqüent l'ús del terme MBMP per a designar de forma àmplia la infecció per EV-A71.

Aquest ús pot resultar xocant en determinades regions on els brots han cursat amb poques manifestacions dermatològiques degut al baix dermatropisme del subgenotip causal, com per exemple en el brot d'Hongria l'any 1978⁶⁴. Les dues etiologies principals de la MBMP són l'EV-A71 i el CV-A16, i amb menor freqüència el CV-A6 i el CV-A10. Tanmateix, l'EV-A71 s'associa amb major freqüència amb brots de patologia neurològica amb important morbimortalitat. És important conèixer que l'EV-A71 pot associar-se amb exanemes de característiques inespecífiques, sobretot en menors de 2 anys⁹⁹. L'onicomadesi és una alteració unguial infreqüent que típicament es presenta 1-2 mesos després de la MBMP¹⁰².



Figura 11. Lesions mucocutànies de la MBMP: A) úlceres a la llengua, C i D) vesícules i úlceres a mà i peu. Figura extreta de la revista *Lancet Neurology*⁹⁹.

L'encefalitis de tronc es presenta típicament en forma de febre alta (amb o sense exantema), acompanyada d'irritabilitat i/o letargia, amb aparició posterior de mioclònies durant la son i tremolor intencional, atàxia i, menys freqüentment, parèsies oculomotores, parèsies bulbars i/o paràlisi flàccida aguda⁹⁹. La presència de mioclònies és més freqüent en la infecció del SNC per EV-A71 que en altres EV i podria ser un marcador precoç d'afectació neurològica¹⁰³. El reconeixement d'aquest signe requereix un alt índex de sospita, ja que les mioclònies poden presentar-se de forma fisiològica durant la son. Per altra banda, també poden presentar-se en altres encefalitis virals⁹⁹. La presència de convulsions és infreqüent, i en cas de presentar-se habitualment es tracta de convulsions febrils⁹⁹.

L'encefalitis de tronc/encefalomielitis per EV-A71, de forma similar a la poliomièlitis, pot associar símptomes cardiorrespiratoris⁹⁹. Tal i com s'ha descrit, l'edema pulmonar i la fallada cardiopulmonar es produeixen per l'efecte combinat

de la cascada de citocines i l'alteració dels centres vasomotors i respiratoris^{84,86}. Habitualment es presenta en forma de MBMP seguida d'un empitjorament sobtat entre el tercer i el cinquè dia de febre amb edema pulmonar i xoc, precedit a vegades per símptomes neurològics lleus⁹⁹. En absència de tractament de suport, associa una alta taxa de mortalitat¹⁰⁴.

2.3.10.7 *Diagnòstic*

En pacients amb sospita d'infecció del SNC per EV-A71, l'OMS recomana la recollida de frotis faringi i vesicular (en cas de no presentar vesícules, recomana la recollida de mostra de femta), ja que són les mostres més rentables per a la detecció del virus^{101,105}. La detecció en frotis vesicular confirma la infecció, mentre que la detecció en frotis faringi o mostra de femta no permet descartar l'estat de portador asimptomàtic, ja que els EV poden detectar-se de forma perllongada en faringe (2 setmanes) i femta (6 setmanes a 3 mesos)^{18,101}.

L'OMS recomana l'estudi de LCR per confirmar l'afectació de SNC¹⁰¹. La taxa de detecció d'EV-A71 en LCR és de 0-5% mitjançant tècniques habituals, de forma similar als PV¹⁰⁵. Tanmateix, el LCR és útil per a l'estudi d'altres EV causants de meningitis asèptica. L'analítica sanguínia també forma part de l'estudi bàsic¹⁰¹. Pel que fa a proves d'imatge, l'OMS recomana valorar la realització de RM cerebral i medul·lar i ecocardiografia, per confirmar el diagnòstic o per valorar la progressió de la malaltia¹⁰¹.

2.3.10.8 *Pronòstic*

Segons la guia clínica l'OMS, el més important en la valoració inicial d'un nen amb sospita d'infecció per EV-A71 és identificar els factors de mal pronòstic, per tal que ingressin en un centre hospitalari on puguin ser monitoritzats i tractats de forma precoç¹⁰¹. S'han descrit diversos factors de mal pronòstic, però pocs s'han validat de forma prospectiva. Són factors de risc d'afectació neurològica (no de fallada cardiopulmonar) la presència de temperatura màxima $\geq 38,5^{\circ}\text{C}$, la persistència de la febre > 3 dies i la presència de letargia¹⁰⁶. Els pacients amb menor edat (< 2 anys) presenten major risc de d'afectació neurològica greu¹⁰⁷.

Els pacients amb signes de disfunció autonòmica, incloent sudoració freda, pell reticulada, taquicàrdia, alteració de la variabilitat de la freqüència cardíaca (FC), taquipnea, hipertensió i hiperglucèmia, presenten alt risc de fallada cardiopulmonar^{108,109}. La presència de parèsia d'extremitats també s'associa amb fallada cardiopulmonar¹¹⁰. Existeixen dues classificacions de la gravetat inicial de la MBMP, la classificació de l'OMS i la classificació del Ministeri de Salut de Vietnam (**Taules 3 i 4**)^{101,111}. La segona té especial interès perquè va ser la primera en demostrar correlació entre la gravetat clínica inicial i el pronòstic, si bé la classificació de l'OMS és la més utilitzada per guiar el tractament¹¹¹.

Grau	Criteris
Grau 1	MBMP i/o herpangina
Grau 2a	Grau 1 i <ul style="list-style-type: none"> - Mioclònies observades per la família (no personal sanitari) - Letargia - Temperatura $\geq 39^{\circ}\text{C}$ o ≥ 48 h - Vòmits
Grau 2b grup 1	Grau 1 i <ul style="list-style-type: none"> - Mioclònies observades per personal sanitari o la família (≥ 2 mioclònies/30 minuts o 1 mioclònia i estupor) - FC 130-150 bpm (ajustada per la febre)
Grau 2b grup 2	Grau 1, mioclònies i <ul style="list-style-type: none"> - Tremolor continu, parèsia/paràlisi d'extremitats o somnolència (sense hipoglucèmia) - FC > 150 bpm (ajustada per la febre) - Temperatura rectal $\geq 39,5^{\circ}\text{C}$ i manca de resposta a antitèrmics durant 4 hores
Grau 3	Complicacions greus neurològiques o cardiopulmonars: <ul style="list-style-type: none"> - FC > 170 bpm - Suor profusa - Hipertensió arterial (pressió arterial sistòlica $>$ percentil 95) - Alteracions respiratòries: taquipnea, dificultat respiratòria - Convulsions - Coma (escala de Glasgow < 10 punts)
Grau 4	Complicacions greus: <ul style="list-style-type: none"> - Edema pulmonar agut - Fallada cardiopulmonar - SatHb $< 92\%$ amb oxigenoteràpia amb ulleres nasals 6 a lpm - Parada respiratòria o gasping

Taula 3. Classificació de la MBMP del Ministeri de Salut de Vietnam. Taula extreta de la revista *Trials*¹¹².

Grau	Criteris
MBMP/herpangina no complicada	MBMP i/o herpangina
MBMP amb afectació del SNC	Signes meníngis Mioclònies Atàxia, tremolors Letargia Debilitat d'extremitats
MBMP amb disfunció autonòmica	Afectació del SNC i - FC 150-170 bpm - Hipertensió arterial - Sudoració profusa - Alteracions respiratòries (taquipnea, dificultat respiratòria)
MBMP amb fallada cardiopulmonar	Disfunció autonòmica i: - Hipotensió/shock - Edema/hemorràgia pulmonar - Fallada cardíaca

Taula 4. Classificació de la MBMP de l'OMS. Taula extreta de la guia clínica *A Guide to Clinical Management and Public Health Response for Hand, Foot and Mouth Disease (HFMD)*¹⁰¹.

Pel que fa a proves de laboratori, la pleocitosi es descriu de forma invariable en els pacients que presenten fallada cardiopulmonar, fins i tot en aquells que no havien presentat símptomes neurològics⁹⁹. Tanmateix, també pot trobar-se pleocitosi lleu en pacients no greus⁹⁹. L'elevació dels nivells de lactat en LCR també s'associa amb mal pronòstic¹¹³. La presència de leucocitosi amb neutrofilia s'associa amb fallada cardiopulmonar¹¹⁰. L'elevació dels nivells de creatinina fosfoquinasa s'observa en pacients amb afectació cardíaca¹⁰⁸, i l'elevació dels nivells de troponina I és indicativa de fallada cardiopulmonar imminent¹¹⁴.

Pel que fa a proves de neuroimatge, l'OMS desaconsella la realització de tomografia computeritzada (TC)¹⁰¹. La RM cerebral i medul·lar és la prova d'elecció, ja que permet una millor valoració del tonc cerebral i de les lesions característiques¹⁰¹. El protocol habitual inclou seqüències ponderades en T1, T2, FLAIR i estudi de difusió (seqüència T1 post-contrast opcional). Característicament s'observen lesions hiperintenses en seqüències ponderades

en T2 a nivell dorsal de protuberància i bulb (a vegades mesencèfal) i nuclis dentats del cerebel (**Figura 12**)¹¹⁵. També poden observar-se lesions hiperintenses en seqüències ponderades en T2 a nivell d'astes anteriors de la medulla espinal¹¹⁵. La normalitat de la RM es correlaciona amb bon pronòstic¹¹⁶. La presència de lesions hiperintenses en seqüències ponderades en T2 a nivell dorsal de bulb, així com la presència de lesions en múltiples àrees del SNC, s'associen amb mal pronòstic^{117,118}. L'estudi de difusió podria ser més sensible per a la detecció precoç de lesions i la restricció en la difusió en el tronc de l'encèfal, indicativa d'edema citotòxic, podria associar-se amb fallada cardiopulmonar^{119,120}.

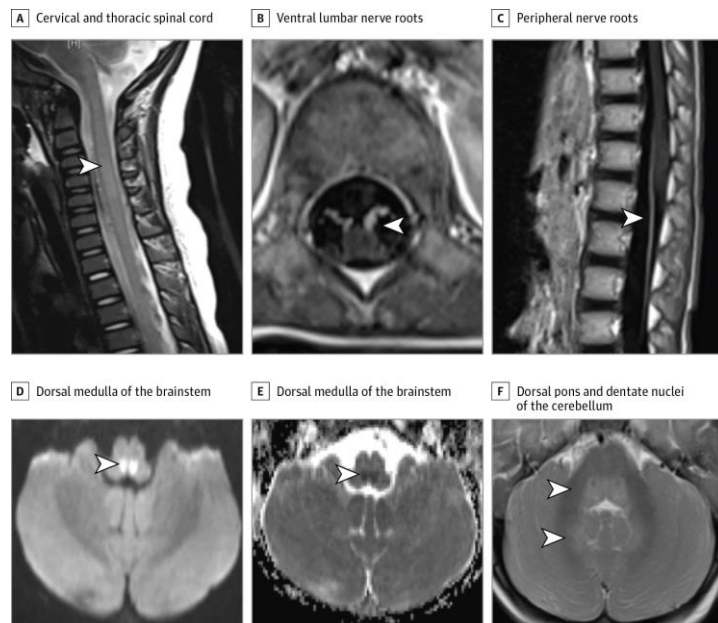


Figura 12. Troballes de RM en pacients amb encefalitis de tronc per EV-A71: A) senyal hiperintensa en seqüència ponderada en T2; B i C) captació de contrast; D i E) restricció de la difusió; F) senyal hiperintensa en T2. Figura extreta de la revista *JAMA Neurology*¹¹⁹.

La presència d'edema pulmonar i fallada cardiopulmonar s'observa en la RX de tòrax en forma d'infiltrats pulmonars bilaterals, sense cardiomegàlia. Tanmateix, sí que es poden observar signes de disfunció ventricular esquerra, amb o sense regurgitació mitral¹⁰⁸.

Segons una meta-anàlisi recent, la incidència acumulada de seqüeles a llarg termini o mort és del 20% (p25-p75: 10%-31%), essent més elevada en

pacients amb manifestacions inicials més greus (fallada cardiopulmonar). Pel que fa a l'evolució de la parèsia d'extremitats, un estudi va reportar que el 71% presenten recuperació completa als 2-3 mesos i el 13% presenten parèsies residuals als 6 mesos; la recuperació va de distal a proximal¹²¹. Alguns estudis han associat la infecció del SNC per EV-A71 amb el desenvolupament a llarg termini de dèficit d'atenció amb hiperactivitat¹²².

2.3.10.9 *Prevenició*

Tal i com s'ha exposat, la MBMP per EV-A71 suposa un problema de salut pública en el Sud-Est Asiàtic, i és per aquest motiu que aquests països han liderat el desenvolupament de vacunes. L'Administració d'Aliments i Fàrmacs de la Xina va aprovar la primera vacuna inactivada front a l'EV-A71 el desembre de 2015 (Sinovac Biotech Co., Ltd.), i la segona el gener de 2016 (Chinese Academy of Medical Sciences)⁶⁸. Ambdues estan dirigides front al subgenotip EV-A71 C4a⁶⁸. Un assaig clínic de fase 3 amb la primera vacuna va demostrar una eficàcia vacunal superior al 90% front a la MBMP per EV-A71 i una taxa de seroconversió del 88-92%¹²³.

2.3.10.10 *Tractament*

L'OMS destaca la importància de la detecció precoç de signes de gravetat en la MBMP, ja que els casos greus poden presentar un empitjorament sobtat que associa una alta taxa de mortalitat en absència de tractament¹⁰¹. És tant important l'exploració neurològica com la cardiocirculatoria (incloent mesura de la tensió arterial i la freqüència cardíaca) per a una correcta valoració. El tractament és de suport, ja que no es disposa de cap antiviral aprovat¹⁰¹. L'OMS proposa un algoritme terapèutic en funció de la gravetat clínica (**Taula 5**)¹⁰¹.

Grau	Seguiment/Tractament
MBMP no complicada	Alta al domicili amb signes d'alarma Seguiment cada 1-2 dies durant els propers 7 dies Paracetamol Ingesta hídrica abundant

MBMP amb afectació del SNC	Ingrés hospitalari Paracetamol Oxigenoteràpia IGIV (no indicades en meningitis asèptica, a valorar en encefalitis de tronc, recomanades en paràlisi flàccida aguda)
MBMP amb disfunció autonòmica	Ingrés a Unitat de Cures Intensives Pediàtrica Seroteràpia intravenosa Considerar intubació precoç IGIV Inotrops (dobutamina, milrinona)
MBMP amb fallada cardiopulmonar	Ingrés a Unitat de Cures Intensives Pediàtrica Seroteràpia intravenosa Ventilació mecànica Inotrops (dobutamina, milrinona) IGIV (si no s'han administrat prèviament)

Taula 5. Tractament recomanat segons la classificació de la MBMP de l'OMS
Taula extreta de la guia clínica *A Guide to Clinical Management and Public Health Response for Hand, Foot and Mouth Disease (HFMD)*¹⁰¹.

En múltiples països afectats per brots de MBMP per EV-A71 s'ha reportat l'ús d'IGIV. S'hipotetitzava que tant la presència d'anticossos neutralitzants com les propietats antiinflamatòries inespecífiques podrien ser beneficioses. A més, l'ús d'IGIV s'ha descrit en altres infeccions per EV⁴³. Estudis retrospectius suggereixen que l'administració precoç d'IGIV suposa un benefici clínic¹⁰⁶. L'anàlisi de citoquines abans i després de l'administració d'IGIV també mostra una reducció de diverses citoquines proinflamatòries en pacients amb disfunció autonòmica¹²⁴. Tot i la manca d'assajos clínics randomitzats, l'ús d'IGIV és estès a la pràctica clínica. La pauta d'administració més freqüent és 1 g/kg cada 24 hores durant 2 dies (dosi total 2 g/kg).

Els pacients amb disfunció autonòmica o fallada cardiopulmonar són candidats a mesures de suport a Unitat de Cures Intensives Pediàtrica (UCIP), incloent ventilació mecànica, seroteràpia intravenosa, administració d'inotrops (dobutamina, milrinona) i oxigenació amb membrana extracorpòria¹⁰¹. L'administració de seroteràpia endovenosa s'ha de realitzar amb precaució pel risc d'edema pulmonar¹⁰¹. Un estudi retrospectiu (n=24) va mostrar que

l'administració de milrinona en pacients amb edema pulmonar s'associava amb menor mortalitat¹⁰⁴.

L'administració de glucocorticoides endovenosos en la MBMP per EV-A71 és controvertida, doncs no està recomanada per l'OMS¹⁰¹. Tanmateix, s'hipotetitza que podria ser beneficiosa, al igual que en les mielitides agudes virals, i de fet se n'ha reportat l'ús en diferents brots, com per exemple el d'Austràlia l'any 2013¹¹⁹. Un experiment amb model de ratolí va mostrar que l'administració precoç (primeres 72 hores) podria ser perjudicial¹²⁵. Estudis observacionals en humans han arribat a conclusions similars¹²⁶. La pauta d'administració més freqüent és metilprednisolona intravenosa, bolus de 30 mg/kg cada 24 hores (màxim 1 g) durant 3 dies¹¹⁹.

2.4 GÈNERE PARECHOVIRUS

2.4.1 Classificació

El gènere Parechovirus forma part de la família Picornaviridae. Al seu torn, el gènere Parechovirus està constituït per quatre espècies, *Parechovirus A-D*¹². L'espècie *Parechovirus A*, amb major interès clínic, se subclassifica en 19 genotips, els parechovirus humans 1-19 (HPeV-1-19)¹²⁷. Els HPeV-1 i 2 van ser aïllats per primera vegada en pacients amb gastroenteritis l'any 1956, i van classificar-se dins del gènere Enterovirus com E-22 i 23¹²⁸. No va ser fins l'any 1992 que l'anàlisi de la seqüència completa de l'E-22 va permetre reclassificar els HPeV dins d'un gènere independent¹⁰. Per aquest motiu, històricament EV i HPeV s'han estudiat de forma conjunta.

2.4.2 Epidemiologia

L'estacionalitat de les infeccions per HPeV és variable, ja que depèn del genotip. El HPeV-1 circula durant tot l'any. La incidència d'infeccions per HPeV-3 és més variable, amb un pic a l'estiu i amb un patró bianual en determinats països⁶². Les infeccions per HPeV poden cursar en forma de brots epidèmics¹²⁹. La seropositivitat front a HPeV-1 és gairebé universal en adults, mentre que front

a HPeV-3 és menor¹³⁰. Les infeccions per HPeV afecten principalment a lactants, essent el HPeV-1 el genotip predominant¹³¹. Les infeccions més greus afecten a menors de 6 mesos, per la major incidència de HPeV-3 en aquest grup d'edat¹³¹. Es transmeten principalment per via fecal-oral. L'excreció en femtes és més perllongada (7 setmanes) que l'excreció a orofaringe (1-3 setmanes)¹³².

2.4.3 Estructura

El genoma del HPeV té una longitud aproximada de 7.300 nucleòtids, que comprèn una regió 5' no traduïda, una regió ORF, una regió 3' no traduïda i una cua poliadenilada¹⁰. La càpside viral icosaèdrica està constituïda per 60 protòmers, formats per assemblatge de les proteïnes estructurals VP0, VP1 i VP3. La traducció de la regió ORF codifica una poliproteïna que és escindida en 3 proteïnes estructurals (VP0, VP1 i VP3) i 7 proteïnes no estructurals (2A-C i 3A-D)¹⁰. A diferència dels EV, la regió VP0 no és escindida en VP2 i VP4, per la qual cosa només conté tres polipèptids diferents¹³³.

2.4.4 Fisiopatologia

Un cop s'ha produït la infecció, els llocs de replicació primaris són el tracte gastrointestinal i respiratori¹³⁴. En una minoria de casos, les infeccions per HPeV es poden disseminar per via hematògena a altres òrgans, incloent el SNC o el fetge, que poden actuar com llocs de replicació secundaris¹³⁴.

2.4.5 Clínica

Les infeccions per HPeV són freqüentment asimptomàtiques i sobretot afecten a lactants¹³¹. Generalment produeixen gastroenteritis i infeccions respiratòries de vies altes i baixes. La majoria d'infeccions greus per HPeV s'associen amb HPeV-3, que afecta principalment a menors de 3 mesos en forma de sèpsia, malaltia similar a sèpsia o meningoencefalitis¹³⁵. Tal i com es descriu en el brot d'Austràlia l'any 2013, en un context epidemiològic compatible, és suggestiva d'aquesta etiologia la presència de febre, irritabilitat i exantema

(Figura 13)¹³⁵. L'exantema és característicament maculopapular eritematós de distribució generalitzada o palmoplantar¹³⁵. Poden presentar distensió abdominal, a vegades amb protrusió umbilical, així com apnees¹³⁵. Les infeccions per HPeV (sobretot HPeV-3) són la segona causa d'infecció del SNC en menors de 2 mesos, després de les infeccions per EV. La meningoencefalitis per HPeV cursa típicament amb crisis convulsives i s'associa amb risc de seqüeles per lesió de substància blanca¹³⁶. Els HPeV són una causa infreqüent de PFA¹³⁷. Altres manifestacions infreqüents són: hepatitis, insuficiència hepàtica aguda, síndrome hemolítica urèmica, miocarditis, miositis, herpangina, MBMP, síndrome de mort sobtada del lactant, limfohistiocitosi hemofagocítica (HPeV-3), hiperferritinèmia extrema amb disfunció transitòria de la citotoxicitat NK (HPeV-3) i síndrome de Reye¹²⁷.

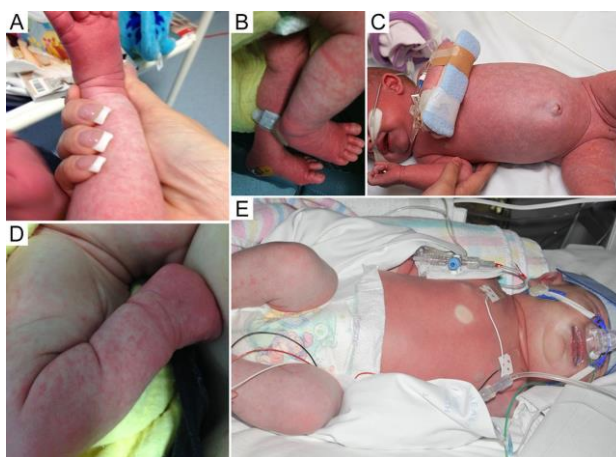


Figura 13. Exantema característic de la infecció per HPeV-3. Imatge extreta de la revista *Clinical Infectious Diseases* ¹³⁵.

2.4.6 Diagnòstic

Els HPeV poden detectar-se en mostres invasives (sang o LCR) i no invasives (femta i secrecions respiratòries). Al igual que en el cas de l'EV, la detecció de material genètic mitjançant RT-PCR (amb encebadors específics per a la regió 5' no traduïda) està desplaçant l'aïllament viral en cultiu¹²⁷. Les mostres més rentables per a la detecció de HPeV són les femtes (sensibilitat de fins al 95%) i el LCR (sensibilitat de fins al 84%)¹³⁸.

De forma similar a l'EV, l'amplificació de la regió VP3/VP1 (que és preferible a l'amplificació de la regió VP1) i seqüenciació de l'amplicó està desplaçant el test de neutralització per a la tipificació de HPeV¹³⁹.

2.4.7 Prevenció i tractament

No es disposa de cap vacuna ni antiviral per a les infeccions per HPeV, per la qual cosa el tractament és de suport¹²⁷. L'ús d' IGIV inespecífiques també s'ha descrit en infeccions greus per HPeV, però falten evidències per a una recomanació forta¹²⁷.

2.5 BIOLOGIA MOLECULAR APLICADA A LA DETECCIÓ D'EV I HPeV

2.5.1 Generalitats

Tal i com s'ha comentat al llarg de la introducció, les tècniques de biologia molecular estan reemplaçant de forma progressiva les tècniques clàssiques per a la detecció d'EV i HPeV. Per exemple, la RT-PCR està substituint l'aïllament viral en cultiu cel·lular per a la detecció d'EV³⁸. La RT-PCR és més sensible, més ràpida i pot detectar EV no cultivables³⁸. Moltes tècniques de RT-PCR per a la detecció d'EV utilitzen encebadors que identifiquen seqüències de la regió 5' no traduïda d'alta homologia, per la qual cosa detecten EV (incloent RV) sense diferenciar genotip ni subgenotip³⁹. El mateix és aplicable a la detecció de HPeV. La possibilitat de contaminació creuada és un inconvenient a tenir en compte³⁸.

De forma similar, l'amplificació de la regió VP1 i seqüenciació de l'amplicó està desplaçant el test de neutralització per a la tipificació d'EV³⁸. La regió VP1 es correlaciona amb el serotip viral, per la qual cosa es pot realitzar la tipificació mitjançant la comparació d'un fragment 3' de la regió VP1 d'un EV amb una base de dades de seqüències prototip⁴⁰. Aquesta tècnica també és més sensible, més ràpida i permet tipificar EV no serotipables³⁸. En el cas dels HPeV, la regió amplificada és VP3/VP1.

Una alternativa per a la detecció d'EV-A71 en un sol pas és una RT-PCR amb encebadors específics d'EV-A71¹⁴⁰. Aquesta tècnica és ràpida, senzilla i econòmica, però pot donar falsos negatius en cas d'aparició de noves variants, per la qual cosa requereix vigilància epidemiològica mitjançant un altre mètode¹⁴⁰.

Recentment s'han realitzat grans avenços en el camp de la biologia molecular. Algunes tècniques ja han arribat a la pràctica clínica, com la PCR niada múltiple, i d'altres s'estan començant a obrir pas, com la mNGS clínica. La PCR niada múltiple és una tècnica que combina la detecció simultània de múltiples patògens que ofereix la PCR múltiple i l'alta sensibilitat que ofereix la PCR niada. Les primeres aplicacions de la PCR niada múltiple en l'estudi de meningitis/encefalitis de causa desconeguda daten de mitjans de 1990¹⁴¹. En el context de la infecció del SNC per EV-A71, s'ha utilitzat per a la diferenciació de genotips i subgenotips d'EV, però no per al diagnòstic diferencial amb altres patògens¹⁴². El FilmArray® Meningitis/Encephalitis (FA-M/E) panel utilitza la tècnica RT-PCR niada múltiple per a la detecció simultània de 16 patògens que són causa freqüent de meningitis/encefalitis: 6 bacteris (*S. pneumoniae*, *N. meningitidis*, *S. agalactiae*, *H. influenzae*, *L. monocytogenes*, *E. coli* K1), 8 virus (EV, HPeV, virus herpes simple 1 i 2 [VHS-1 i 2], virus herpes humà 6 [VHH-6], citomegalovirus, virus Epstein Barr, virus varicel·la zòster) i 2 fongs (*Cryptococcus gattii/neoformans*)¹⁴³. El seu ús s'ha reportat en l'estudi de meningitis i encefalitis de causa desconeguda¹⁴³, però no en la infecció del SNC per EV-A71, si bé és una tècnica ràpida que permet detectar simultàniament EV i altres patògens que formen part del diagnòstic diferencial d'aquesta entitat.

La mNGS clínica és una tècnica que suposa un canvi de paradigma en el camp de la microbiologia, ja que permet l'estudi de microorganismes de forma no dirigida. D'aquesta manera es pot identificar simultàniament un ampli rang de patògens (bacteris, virus, fongs i paràsits) i seqüenciar el genoma complet, fent possible la detecció de canvis genètics en patògens esperats, la descoberta de patògens inesperats o fins i tot el descobriment de nous patògens. L'encefalitis representa en l'actualitat un important repte diagnòstic, doncs el percentatge de casos que romanen sense diagnòstic després d'estudi mitjançant tècniques

habituals és de 63-80%^{144,145}. Les primeres aplicacions de la mNGS en l'estudi d'encefalitis daten de mitjans de 2010, si bé tampoc no s'ha reportat el seu ús en la infecció del SNC per EV-A71¹⁴⁶.

2.5.2 Breu descripció metodològica

2.5.2.1 PCR, real-time RT-PCR i PCR niada múltiple

La PCR és la tècnica de biologia molecular més utilitzada en la detecció de patògens¹⁴⁷. La PCR convencional requereix una cadena de DNA motlle, DNA polimerasa (Taq polimerasa), un parell d'encebadors específics, nucleòtids i termociclador (reactius a part)¹⁴⁸. La mescla se sotmet a cicles d'altres i baixes temperatures durant els quals es desnaturalitzen les cadenes de DNA, s'hibriden els encebadors i se sintetitzen les noves cadenes de DNA¹⁴⁸. Després de 30-45 cicles, la PCR genera 2^n còpies d'una única cadena de DNA (n = número de cicles).

Variants de la PCR convencional:

- RT-PCR: Inicialment es converteix una cadena de RNA en DNA complementari mitjançant una transcriptasa inversa i seguidament es realitza una PCR convencional¹⁴⁹.
- Real-time PCR: PCR que amplifica i pot quantificar el producte de l'amplificació de forma simultània¹⁵⁰. Existeixen diferents mètodes de real-time PCR que utilitzen diferents mecanismes de quantificació. El cicle llindar es defineix com el nombre de cicles que requereix la senyal fluorescent per sobrepassar la fluorescència basal.
- Real-time RT-PCR: Combinació de la RT-PCR i la real-time PCR, que es pot realitzar en un sol pas o en dos passos.
- PCR niada: En el primer pas, s'amplifica una seqüència de DNA extensa que conté la seqüència d'interès. En el segon pas, s'amplifica la seqüència d'interès dins de l'amplicó que s'ha generat en el primer pas. Aquesta tècnica té una alta sensibilitat i especificitat.
- PCR múltiple: PCR en que s'amplifica simultàniament més d'una seqüència.

- PCR niada múltiple: Combinació de la PCR niada i de la PCR múltiple.

2.5.2.2 *Real-time RT-PCR PAN EV d'elaboració pròpia de l'Hospital Sant Joan de Déu*

El Departament de Microbiologia de l'Hospital Sant Joan de Déu utilitza una tècnica de real-time RT-PCR PAN EV d'elaboració pròpia, que ha sigut validada per comparació amb una tècnica comercial de referència¹⁵¹. La tècnica pròpia identifica la regió 5' no traduïda i utilitza sondes TaqMan¹⁵¹. Les sondes TaqMan són sondes específiques formades per oligonucleòtids amb un fluoròfor a l'extrem 3' i una molècula que bloqueja l'emissió de fluorescència en l'extrem 5' (en anglès, quencher)¹⁵². Inicialment, aquestes sondes s'hibriden en la regió central de la seqüència diana, sense emetre fluorescència perquè els dos extrems són pròxims¹⁵². Posteriorment la Taq polimerasa, degut a la seva activitat exonucleasa 5'-3', escindeix la sonda hibridada en la seqüència diana, la qual cosa produeix la separació del fluoròfor i el quencher i per tant l'emissió de fluorescència, que detecta el termociclador¹⁵². Aquesta fluorescència és directament proporcional a la quantitat d'amplicons.

A continuació es detalla el protocol de la real-time RT-PCR PAN EV d'elaboració pròpia de l'Hospital Sant Joan de Déu¹⁵¹. L'RNA viral s'extreu a partir de 200 µL de cada mostra amb el sistema NucliSENS®easyMag® (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France) i es dilueix en 25 µL de solució amortidora. L'amplificació es du a terme en un sol tub de reacció utilitzant els encebadors i la sonda sintetitzats per Applied Biosystems (Applied Biosystems, Foster City, CA). S'afegeixen 5 µL d'RNA viral a la mescla formada per 300 nM d'encebador en sentit directe (5'-CCCTGAATGCGGCTAATCC-3'), 900 nM d'encebador en sentit invers (5'-ATTGTCACCATAAGCAGCCA3'), 150 nM de sonda (5'-FAM-AACCGACTACTTTGGGTGTCCGTGTTTC-3'-TAMRA), 2x QuantiTect Probe RT-PCR Master Mix (QuantiTect Probe RT-PCR Master Mix kit, QIAGEN), 1x QuantiTect RT Mix (QuantiTect Probe RT-PCR Master Mix kit, QIAGEN), 1 µL de control intern i aigua lliure de nucleasa. El control intern consisteix en TaqMan® RNase P Detection Reagents (VIC™) (Applied Biosystems), que inclou iniciadors de RNasa P humana i la sonda TaqMan amb fluoròfor VIC a

l'extrem 5'. El DNA s'amplifica mitjançant l'Applied ABI PRISM 7300 Analytical PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA). Cada reacció consisteix en 30 minuts a 50°C, 15 minuts a 95°C, seguit per 45 cicles de 15 segons a 95°C i 1 minut a 60°C. Els resultats de l'amplificació s'analitzen amb el SDS software (Applied Biosystems). Els resultats negatius es defineixen com Ct > 40.

2.5.2.3 *FilmArray® Meningitis/Encephalitis panel*

El FA-M/E panel utilitza la tècnica RT-PCR niada múltiple amb anàlisi d'alta resolució de fusió¹⁵³. En aquesta anàlisi, després de realitzar una PCR, s'afegeix un fluoròfor (per exemple LCGreen®) que s'hibrida al DNA de doble cadena de forma inespecífica i augmenta la fluorescència emesa¹⁵⁴. Seguidament s'escalfa l'amplicó fins assolir la temperatura de fusió, és a dir, aquella temperatura en que es desnaturalitza el DNA i per tant disminueix la fluorescència emesa¹⁵⁴. La temperatura de fusió és específica per cada amplicó. En tot moment es monitoritza la temperatura i la fluorescència, que es representen de forma gràfica en una corba de fusió.

A continuació es detalla el protocol del FA-M/E panel¹⁵³:

- Extracció i purificació dels àcids nucleics.
- Transcriptasa inversa: Alguns patògens detectats són virus RNA, per la qual cosa inicialment s'ha de generar DNA complementari.
- Primera PCR: PCR múltiple en que s'utilitzen simultàniament encebadors per a tots els patògens.
- Segona PCR: El producte de la primera PCR es dilueix, s'afegeix el fluoròfor LCGreen® i es distribueix en una matriu multicel·la (en un sistema tancat per evitar contaminació). Cada cel·la conté un parell d'encebadors específics que amplifiquen seqüències d'interès dins dels amplicons que s'han generat en la primera PCR (per triplicat).
- Anàlisi d'alta resolució de fusió: S'escalfen les cel·les i es monitoritza la fluorescència per generar una corba de fusió.
- Processament de la informació: El software processa la informació de cadascuna de les cel·les i dona un resultat.

2.5.2.4 Seqüenciació de primera generació

La tecnologia Sanger permet la lectura de seqüències de DNA relativament curtes (< 1.000 parells de bases), per la qual cosa s'utilitza per a seqüenciar regions d'interès que prèviament s'han amplificat mitjançant PCR amb encebadors específics¹⁵⁵. La tecnologia Sanger, o mètode de terminació de cadena, requereix una cadena simple de DNA (regió d'interès), DNA polimerasa, encebadors, desoxinucleòtids i 2',3'-didesoxinucleòtids trifosfats (ddNTP), és a dir, desoxinucleòtids amb un grup hidroxil en el seu extrem 3' que bloqueja la incorporació de nous desoxinucleòtids¹⁵⁵. Hi ha diferents variants del mètode de terminació de cadena, però la més exitosa és la seqüenciació amb ddNTP marcats amb fluoròfors, en la qual cadascun dels quatre ddNTP (A, C, G i T) està marcat amb fluoròfors que emeten longituds d'ona diferents, perquè permet la seqüenciació en un sol tub de reacció¹⁵⁵. En cada cicle, s'incorpora un desoxinucleòtid o ddNTP a l'atzar¹⁵⁵. Finalment es desnaturalitzen les cadenes d'ADN i se separen per pes molecular mitjançant electroforesi en gel de poliacrilamida, la qual cosa permet l'obtenir un cromatograma mitjançant un microscopi de fluorescència (**Figura 14**)¹⁵⁵. La seqüència es compara amb bases de dades de seqüències de patògens conegudes.

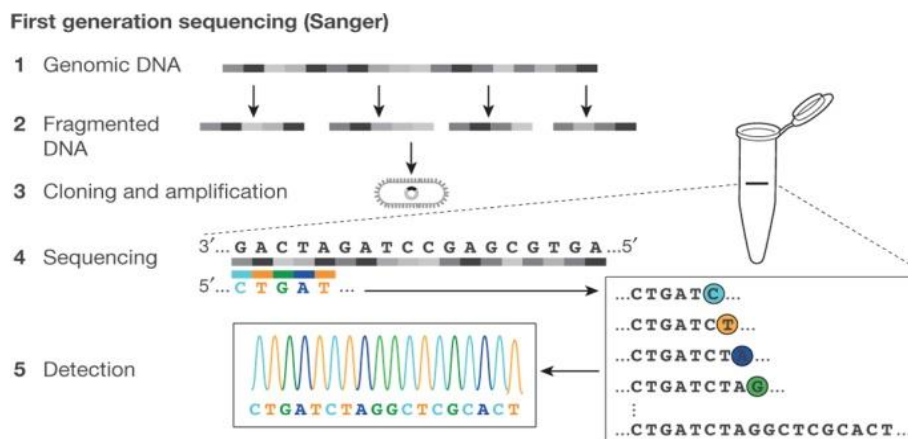


Figura 14. Seqüenciació amb tecnologia Sanger. Il·lustració extreta de la revista *Nature*¹⁵⁶.

L'Hospital Sant Joan de Déu col·labora amb la Unitat d'EV del Centre Nacional de Microbiologia de l'Institut de Salut Carles III per a la tipificació d'EV¹⁵⁷. En aquest centre, l'RNA viral s'extreu de cada mostra amb el sistema

QIAamp Viral RNA mini kit (Germany, QIAGEN). A continuació es realitza RT-PCR niada amb encebadors específics per a les espècies d'EV-A, B, C i D i seguidament es realitza seqüenciació Sanger d'un fragment 3' de la regió codificant per a la proteïna VP1¹⁵⁸.

2.5.2.5 Seqüenciació de segona generació

La tecnologia NGS permet la seqüenciació de múltiples fragments de DNA en paral·lel, produint milions de lectures en un sol pas, el que suposa un gran avenç respecte la seqüenciació de primera generació. La mNGS clínica és l'aplicació de la tecnologia NGS per a la detecció de múltiples patògens presents en una mostra clínica, sense requerir encebadors específics (o utilitzant múltiples encebadors)¹⁵⁹. Aquesta tecnologia permet seqüenciar el genoma complet d'un patogen (o múltiples patògens), i per tant no només detectar-lo, sinó també tipificar-lo i fins i tot poder identificar gens de virulència o de resistència antibacteriana.

Inicialment es fragmenta el DNA i s'afegeixen seqüències adaptadores als extrems mitjançant lligació, en un procés denominat preparació de la llibreria¹⁵⁹. Seguidament se seqüencien els fragments i s'analitzen mitjançant procediments bioinformàtics¹⁵⁹ (**Figura 15**). En la mNGS clínica, les seqüències de genoma humà són rebutjades i la resta de seqüències es comparen amb bases de dades de seqüències de patògens conegudes. Tots els passos poden introduir errors que poden alterar la interpretació dels resultats, sobretot en l'anàlisi de RNA.

Els diferents seqüenciadors utilitzen diferents tecnologies. Les plataformes Illumina®, que són les més utilitzades, es basen en el mètode de terminació cíclica reversible. Inicialment els fragments de DNA se separen i s'amplifiquen clonalment (clústers)¹⁶⁰. Seguidament s'incorpora DNA polimerasa, encebadors i nucleòtids marcats amb un fluoròfor i amb un extrem 3' que bloqueja la incorporació de nous nucleòtids, ambdós reversibles¹⁶⁰. Cadascun dels quatre nucleòtids (A, C, G i T) està marcat amb fluoròfors que emeten longituds d'ona diferents. En cada cicle, els fragments de cada clúster incorporen un únic nucleòtid, es renten els nucleòtids no incorporats i s'obté una

imatge mitjançant un microscopi de fluorescència¹⁶⁰. Finalment s'escindeix el fluoròfor i l'extrem 3' que bloqueja la incorporació de nous nucleòtids per poder començar un nou cicle¹⁶⁰.

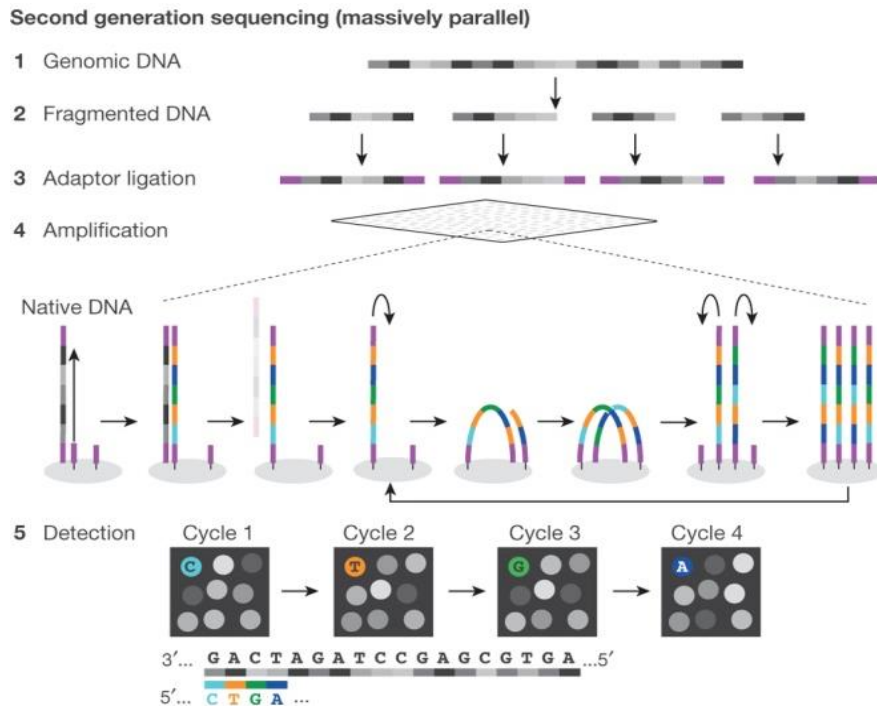


Figura 15. Seqüenciació amb tecnologia NGS. Il·lustració extreta de la revista *Nature*¹⁵⁶.

2.5.2.6 Seqüenciació de tercera generació

S'anomena seqüenciació de tercera generació a una sèrie de plataformes que s'han desenvolupat amb l'objectiu de seqüenciar molècules úniques en temps real, sense necessitat de fragmentar ni amplificar el material genètic.

Les plataformes Nanopore s'estan posicionant entre les més utilitzades a l'actualitat, si bé el seu ús encara està restringit a l'àmbit de la recerca¹⁶¹. La seqüenciació Nanopore utilitza l'eletroforesi per transportar un polinucleòtid (DNA o RNA) de cadena única a través d'un Nanopore, un biosensor que conté un orifici d'aproximadament 1 nm de diàmetre¹⁶¹. Amb el pas de cada base nucleica es produeix una senyal elèctrica característica que permet desxifrar la seqüència de la cadena¹⁶¹.

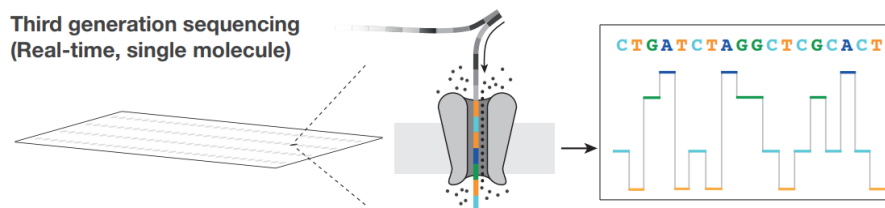


Figura 16. Seqüenciació amb tecnologia Nanopore. Il·lustració extreta de la revista *Nature* ¹⁵⁶.

2.6 NEOPTERINA COM A BIOMARCADOR DE GRAVETAT

El maneig de l'encefalitis de tronc/encefalomielitis per EV-A71 depèn exclusivament de signes clínics en la majoria de guies i protocols. Alguns paràmetres de determinació habitual, com ara la pleocitosi, l'elevació de lactat en LCR, la leucocitosi o la neutrofília s'han associat amb mal pronòstic, però ja sigui per la inespecificitat o per la inconsistència dels resultats, cap d'aquests paràmetres s'utilitza en la pràctica clínica per a guiar el tractament^{99,110,113}. Tot i els avenços en diferents àmbits, manquen biomarcadors amb implicacions pronòstiques i terapèutiques. En el context clínic actual en que s'estan desenvolupant nous fàrmacs, cobra especial rellevància el descobriment de biomarcadors, tant per identificar aquells pacients que es beneficiarien d'un tractament més precoç, com per mesurar la resposta al tractament de forma objectiva.

La neopterina, o 2-amino-4-hidroxi-6-(D-eritro-1',2',3'-trihidroxipropil)-pteridina, es forma a partir del trifosfat de guanosina (GTP) a través de la via GTP-ciclohidrolasa-1¹⁶². La seva formació té lloc a monòcits, macròfags, cèl·lules dendrítiques i cèl·lules endotelials, amb l'objectiu d'augmentar la citotoxicitat d'aquestes cèl·lules¹⁶². Els principals inductors de neopterina són l'interferó- γ , a través de la via Jak2/Stat, i el TNF a través de la via NF-kappaB, alliberats per limfòcits T i cèl·lules NK¹⁶² (**Figura 17**). En resum, és un marcador d'immunitat cel·lular.

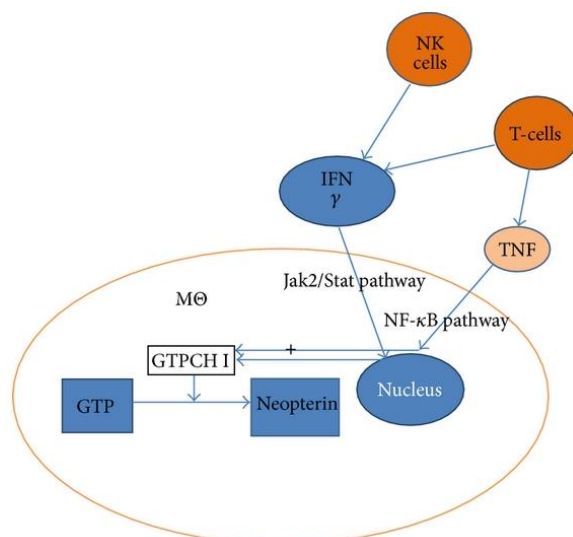


Figura 17. Vies per a la inducció de la producció de neopterin. Figura extreta de la revista *Journal of Biomarkers* ¹⁶³.

L'elevació de neopterin en LCR s'ha correlacionat amb la gravetat de múltiples infeccions del SNC^{164,165}. En el cas de l'encefalitis herpètica la seva elevació s'ha associat amb seqüeles neurològiques i mortalitat, i en el cas de la infecció per VIH, amb la gravetat de la demència associada a la SIDA^{166,167}. S'ha descrit una elevació lleu en els valors de neopterin en LCR en pacients amb meningitis per EV¹⁶⁴. Considerant aquestes troballes, la neopterin en LCR podria ser un biomarcador de gravetat en l'encefalitis de tronc per EV-A71, no estudiat fins a dia d'avui.

La determinació de neopterin en LCR requereix la conservació de les mostres a -70°C amb protecció lumínica¹⁶⁸. Es realitza oxidació amb diòxid de manganès i anàlisi mitjançant cromatografia líquida d'alta resolució i detecció per fluorescència¹⁶⁸.

3 JUSTIFICACIÓ I HIPÒTESIS

3 JUSTIFICACIÓ I HIPÒTESIS

La present Tesi Doctoral s'inscriu en el marc de dos projectes FIS consecutius que han dut a terme una activitat de vigilància epidemiològica d'EV i HPeV a Espanya, "Investigación en infecciones por enterovirus y parechovirus que causan patologías neurológicas y sistémicas severas en población infantil" (PI15CIII/00020, 2016-2018) i "Investigación de las infecciones neurológicas graves en niños causadas por enterovirus emergentes en España: EV-A71 y EV-D68" (PI18CIII/00017, 2019-2021), en que l'autor ha participat en qualitat d'investigador col·laborador. Aquests projectes FIS desenvolupen una activitat de vigilància epidemiològica d'EV, reconeguda per l'OMS com un sistema complementari de vigilància de poliomielitis, que a més permet estudiar patologies neurològiques i sistèmiques produïdes per ENP, que tal i com s'ha exposat al llarg de la introducció poden ser una important causa de morbiditat i mortalitat.

Amb aquests projectes en curs, al març de 2016 a Catalunya es va declarar un brot de patologia neurològica aguda associada a infecció per EV en població pediàtrica. En els primers casos es va identificar l'EV, però aquestes dades s'havien d'interpretar amb precaució donat que les primeres deteccions es van realitzar en pocs pacients i en mostres no invasives. Vam considerar oportú estudiar de forma prospectiva aquest brot, per confirmar-ne l'agent causal i analitzar-ne les característiques clíniques, amb particular èmfasi en les variables associades a major gravetat.

Durant el brot, la taxa de detecció d'EV en LCR mitjançant tècniques habituals va ser molt baixa, fet que podia generar dubtes sobre l'etiologia i la fisiopatologia de l'afectació neurològica en pacients amb detecció del virus en mostres exclusivament no invasives. Es plantegen estratègies complementàries d'abordatge diagnòstic, per tal d'analitzar la utilitat de noves tècniques de biologia molecular per demostrar la neuroinfecció. S'avalua la utilitat de la PCR niada múltiple en comparació amb les tècniques diagnòstiques habituals. També es planteja l'estudi de biomarcadors que podrien tenir implicacions en el pronòstic i

el maneig de la malaltia, com la neopterina en LCR, un marcador d'immunitat cel·lular l'elevació del qual s'ha pogut demostrar en diverses infeccions virals del SNC, però no estudiat en l'encefalitis de tronc per EV fins a dia d'avui.

Es van establir les següents hipòtesis de treball:

- L'aparició de noves manifestacions clíniques per EV en el nostre medi s'explica per noves variants d'ENP ja coneguts.
- Existeixen variables clíniques i analítiques associades amb major gravetat en la infecció del SNC per EV-A71 (2016).
- El FA-M/E panel, que utilitza la tècnica de PCR niada múltiple, és més sensible per a la detecció de RNA d'EV en LCR que els procediments habituals de real-time RT-PCR.
- L'elevació de la neopterina en LCR es pot utilitzar com a marcador de gravetat en la infecció del SNC per EV, i pot tenir implicacions en el maneig del pacient després d'interpretar els resultats en diferents contextos clínics.

4 OBJECTIUS

4 OBJECTIUS

D'acord amb les hipòtesis descrites, els objectius plantejats en els estudis que conformen aquesta tesi doctoral són els següents:

1. Primer estudi: Casas-Alba D, de Sevilla MF, Valero-Rello A, Fortuny C, García-García JJ, Ortez C, Muchart J, Armangué T, Jordan I, Luaces C, Barrabeig I, González-Sanz R, Cabrerizo M, Muñoz-Almagro C, Launes C. Outbreak of brainstem encephalitis associated with enterovirus-A71 in Catalonia, Spain (2016): a clinical observational study in a children's reference centre in Catalonia. Clin Microbiol Infect. 2017 Nov; 23 (11): 874-881.

Objectiu general:

1. Descriure les característiques dels pacients pediàtrics ingressats per infeccions per EV amb manifestacions neurològiques en el nostre medi durant la temporada epidèmica de l'any 2016.

Objectius específics:

- 1.1. Descriure les característiques clíniques, analítiques i microbiològiques dels pacients afectats pel brot d'encefalitis de tronc associat amb EV-A71.
- 1.2. Determinar les diferències clíniques, analítiques i microbiològiques entre les diferents formes d'afectació neurològica per EV.
- 1.3. Descriure les característiques clíniques i analítiques de determinació habitual associades amb major gravetat en el brot d'encefalitis de tronc associat amb EV-A71.

- 1.4. Determinar el subgenotip i filogènia de l'EV causant de la brot segons tècniques convencionals d'amplificació de la regió VP1 i seqüenciació de l'amplicó.

2. Segon estudi: Launes C, **Casas-Alba D**, Fortuny C, Valero-Rello A, Cabrerizo M, Muñoz-Almagro C. Utility of FilmArray Meningitis/Encephalitis Panel during Outbreak of Brainstem Encephalitis Caused by Enterovirus in Catalonia in 2016. J Clin Microbiol. 2016 Dec 28; 55 (1): 336-338.

Objectiu general:

2. Demostrar la neuroinfecció en els pacients afectes del brot d'encefalitis de tronc per EV (2016) mitjançant noves tècniques de biologia molecular per a la detecció de múltiples patògens.

Objectius específics:

- 2.1. Caracterització microbiològica i identificació de l'agent causal en LCR dels pacients afectes pel brot d'encefalitis de tronc per EV (2016).
- 2.2. Comparar els resultats de la PCR niada múltiple i la real-time RT-PCR PAN EV en l'estudi etiològic del brot d'encefalitis de tronc per EV (2016).

3. Tercer estudi: **Casas-Alba D**, Valero-Rello A, Muchart J, Armangué T, Jordán I, Cabrerizo M, Molero-Luís M, Artuch R, Fortuny C, Muñoz-Almagro C, Launes C. Cerebrospinal fluid neopterin as a biomarker of disease severity in children with enterovirus-related brainstem encephalitis. Pediatr Neurol. 2019 Feb; [Epub ahead of print].

Objectiu general:

3. Descriure quins són els valors de neopterinina en LCR en els pacients amb encefalitis de tronc per EV.

Objectius específics:

- 3.1. Determinar si existeixen diferències en els valors de neopterinina entre els pacients amb encefalitis de tronc per EV i els pacients amb meningitis asèptica per EV descrits en altres sèries.
- 3.2. Avaluar el paper de la neopterinina en LCR per a estimar la gravetat de l'encefalitis de tronc per EV i quins poden ser els factors de confusió a tenir en compte en la seva interpretació.

4. Quart estudi: Casas-Alba D, Martínez-Monseny A, Monfort L, Muñoz-Almagro C, Cabrerizo M, Deyà À, Launes C. Extreme Hyperferritinemia in Dizygotic Twins With Human Parechovirus-3 Infection. *Pediatr Infect Dis J.* 2016 Dec;35 (12): 1366-1368.

Objectiu general:

4. Descriure les característiques dels pacients pediàtrics ingressats per infeccions per HPeV amb manifestacions neurològiques i sistèmiques en el nostre medi durant el període 2015-2018.

Objectius específics:

- 4.1. Descriure les troballes clíniques i analítiques dels pacients pediàtrics amb infecció per HPeV.

5 RESULTATS

5 RESULTATS

Els resultats dels quatre estudis presentats han sigut publicats en quatre articles que es presenten a continuació, dels quals el doctorand és el primer autor en el primer, tercer i quart articles, i el segon autor en el segon article.

Aquests articles han sigut publicats en revistes situades en el primer decil (primer article), primer quartil (segon article) i segon quartil (tercer i quart articles) de factor d'impacte de les seves àrees de coneixement.

Primer article:

Outbreak of brainstem encephalitis associated with enterovirus-A71 in Catalonia, Spain (2016): a clinical observational study in a children's reference centre in Catalonia.

Casas-Alba D, de Sevilla MF, Valero-Rello A, Fortuny C, García-García JJ, Ortez C, Muchart J, Armangué T, Jordan I, Luaces C, Barrabeig I, González-Sanz R, Cabrerizo M, Muñoz-Almagro C, Launes C.

Clin Microbiol Infect. 2017 Nov; 23 (11): 874-881.

ISI Journal Citation Reports Ranking ® 2017: Decil 1.

Impact factor 2017: 5,394

Segon article:

Utility of FilmArray Meningitis/Encephalitis Panel during Outbreak of Brainstem Encephalitis Caused by Enterovirus in Catalonia in 2016.

Launes C, **Casas-Alba D**, Fortuny C, Valero-Rello A, Cabrerizo M, Muñoz-Almagro C.

J Clin Microbiol. 2016 Des; 55 (1): 336-338.

ISI Journal Citation Reports Ranking ® 2017: Quartil 1.

Impact factor 2017: 4,054.

Tercer article:

Cerebrospinal fluid neopterin in children with enterovirus-related brainstem encephalitis.

Casas-Alba D, Valero-Rello A, Muchart J, Armangué T, Jordán I, Cabrerizo M, Molero-Luís M, Artuch R, Fortuny C, Muñoz-Almagro C, Launes C.

Pediatr Neurol. 2019 Feb; [Epub ahead of print]

ISI Journal Citation Reports Ranking © 2017: Quartil 2.

Impact factor 2017: 2,398.

Quart article:

Extreme Hyperferritinemia in Dizygotic Twins With Human Parechovirus-3 Infection.

Casas-Alba D, Martínez-Monseny A, Monfort L, Muñoz-Almagro C, Cabrerizo M, Deyà À, Launes C.

Pediatr Infect Dis J. 2016 Des; 35 (12): 1366-1368.

ISI Journal Citation Reports Ranking © 2017: Quartil 2.

Impact factor 2017: 2,305.

5.1 Primer article

Outbreak of brainstem encephalitis associated with enterovirus-A71 in Catalonia, Spain (2016): a clinical observational study in a children's reference centre in Catalonia.

Casas-Alba D, de Sevilla MF, Valero-Rello A, Fortuny C, García-García JJ, Ortez C, Muchart J, Armangué T, Jordan I, Luaces C, Barrabeig I, González-Sanz R, Cabrerizo M, Muñoz-Almagro C, Launes C.

Article publicat a:

Clin Microbiol Infect. 2017 Nov; 23 (11): 874-881.



Contents lists available at ScienceDirect

Clinical Microbiology and Infection

journal homepage: www.clinicalmicrobiologyandinfection.com



Original article

Outbreak of brainstem encephalitis associated with enterovirus-A71 in Catalonia, Spain (2016): a clinical observational study in a children's reference centre in Catalonia

D. Casas-Alba¹, M.F. de Sevilla^{1,2,3}, A. Valero-Rello^{2,4}, C. Fortuny^{1,2,3}, J.-J. García-García^{1,2,3}, C. Ortez⁵, J. Muchart⁶, T. Armangué⁵, I. Jordan^{2,3,7}, C. Luaces⁸, I. Barrabeig⁹, R. González-Sanz¹⁰, M. Cabrerizo¹⁰, C. Muñoz-Almagro^{2,3,8,11}, C. Launes^{1,2,3,*}

¹ Department of Paediatrics, Hospital Sant Joan de Deu (University of Barcelona), Spain

² Paediatric Infectious Diseases Research Group, Institut de Recerca Sant Joan de Déu, Esplugues de Llobregat, Spain

³ CIBER en Epidemiología y Salud Pública, CIBERESP, Spain

⁴ Department of Molecular Microbiology, Hospital Sant Joan de Deu, Spain

⁵ Department of Paediatric Neurology, Hospital Sant Joan de Deu (University of Barcelona), Spain

⁶ Department of Diagnostic Imaging, Hospital Sant Joan de Deu (University of Barcelona), Spain

⁷ Paediatric Intensive Care Unit, Hospital Sant Joan de Deu (University of Barcelona), Spain

⁸ Emergency Department, Hospital Sant Joan de Deu (University of Barcelona), Spain

⁹ Epidemiological Surveillance Unit of Health Region, Barcelona-South, Public Health Agency of Catalonia, Hospitalet de Llobregat, Spain

¹⁰ Enterovirus Unit, National Centre for Microbiology, Institute of Public Health "Carlos III", Madrid, Spain

¹¹ School of Medicine, Universitat Internacional de Catalunya, Barcelona, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 19 January 2017

Received in revised form

15 March 2017

Accepted 18 March 2017

Available online 23 March 2017

Editor: E. Røilides

Keywords:

Brainstem

Encephalitis

Enterovirus

EV-A71

Molecular epidemiology

Types

ABSTRACT

Objectives: To describe the characteristics of an outbreak of brainstem encephalitis and encephalomyelitis related to enterovirus (EV) infection in Catalonia (Spain), a setting in which these manifestations were uncommon.

Methods: Clinical and microbiological data were analysed from patients with neurological symptoms associated with EV detection admitted to a reference paediatric hospital between April and June 2016.

Results: Fifty-seven patients were included. Median age was 27.7 months (p25–p75 17.1–37.6). Forty-one (72%) were diagnosed with brainstem encephalitis, seven (12%) with aseptic meningitis, six (11%) with encephalitis, and three (5%) with encephalomyelitis (two out of three with cardiopulmonary failure). Fever, lethargy, and myoclonic jerks were the most common symptoms. Age younger than 12 months, higher white-blood-cell count, and higher procalcitonin levels were associated with cardiopulmonary failure. Using a PAN-EV real-time PCR, EV was detected in faeces and/or nasopharyngeal aspirate in all the patients, but it was found in cerebrospinal fluid only in patients with aseptic meningitis. EV was genotyped in 47 out of 57 and EV-A71 was identified in 40 out of 47, being the only EV type found in patients with brainstem symptoms. Most of the detected EV-A71 strains were subgenogroup C1. Intravenous immunoglobulins were used in 34 patients. Eight cases (14%) were admitted to the intensive care unit. All the patients but three, those with encephalomyelitis, showed a good clinical course and had no significant sequelae. No deaths occurred.

Conclusions: The 2016 outbreak of brainstem encephalitis in Catalonia was associated with EV-A71 subgenogroup C1. Despite the clinical manifestations of serious disease, a favourable outcome was observed in the majority of patients. **D. Casas-Alba, Clin Microbiol Infect 2017;23:874**

© 2017 European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

* Corresponding author. C. Launes, Paediatric Infectious Diseases Research Group, Paediatrics Department, Institut de Recerca Pediàtrica Hospital Sant Joan de Deu, P. Sant Joan de Déu, no. 2, 08950 Esplugues, Barcelona, Spain.

E-mail address: claunes@sjdhospitalbarcelona.org (C. Launes).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.cmi.2017.03.016>

1198-743X/© 2017 European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

Introduction

An outbreak of enterovirus (EV) infection affecting more than 100 children with acute brainstem symptoms was reported in Catalonia (Spain) between April and June 2016. EV detected in the first patients were typed as EV-A71 [1,2].

EV-A71 infections characteristically present as hand-foot-mouth disease (HFMD) or herpangina, but they are also associated with neurological pathologies [3,4], causing epidemics of aseptic meningitis, brainstem encephalitis, encephalomyelitis, and acute flaccid paralysis (AFP) largely restricted to infants [4]. The first association of EV-A71 with an outbreak of neurological disease occurred in California between 1969 and 1972 [5], although a subsequent retrospective study detected EV-A71 in samples from 1963 from The Netherlands [6]. In Europe, there were large outbreaks in Bulgaria and Hungary in the 1970s [7,8]. Since then, large outbreaks of EV-A71-associated illness with severe presentations have only been reported in the Asia-Pacific region, while sporadic cases and small outbreaks of mild to moderate disease have been reported worldwide [9–11]. Recent global concern about EV-A71-related neurological disease has increased because of the 2016 outbreak in Spain [2].

The great genetic diversity within EV, because of error-prone RNA-dependent RNA polymerase [12] and the *intra-* and *inter-*species recombination events among EVs [13–15], together with the different socioeconomic conditions of each setting, may lead to differences in clinical expression and outcomes from one outbreak to another. Furthermore, attempting to treat a completely unknown disease in our setting was made even more difficult as various treatment approaches had been used in Southeast Asia [16–20], with little strong clinical evidence of their benefit. The WHO summarized the evidence and issued clinical guidelines for management of HFMD/EV-A71 illness of different severities [21].

The objectives of this study were to describe the clinical characteristics of patients with EV infection associated with acute neurologic manifestations during the outbreak, as well as to detect variables associated with more severe disease and poorer prognosis. The study also describes the molecular EV typing of these cases.

Methods

Study design

Epidemiological, microbiological, and clinical data were prospectively collected from all children with enterovirus-related neurological disease who were seen in or transferred for hospitalization to a tertiary paediatric hospital (Hospital Sant Joan de Déu, University of Barcelona) from 15 April to 30 June 2016. This hospital is a 300-bed reference medical centre for high-complexity pathologies that provides healthcare services to a paediatric population of ≈300,000 subjects. The centre has participated in a Spanish EV molecular surveillance network since 2010.

Inclusion criteria and definitions

Case definitions of the WHO *Guide to Clinical Management and Public Health Response for HFMD* [21] were used to define the inclusion criteria. Patients with clinical diagnosis of brainstem encephalitis, encephalomyelitis with/without autonomic dysfunction, encephalitis, and aseptic meningitis were included if EV infection was detected in any sample and no other cause was associated with the clinical symptoms.

The Vietnamese Ministry of Health HFMD Classification and Management Guidelines were used to stratify the severity of

patients with brainstem encephalitis or encephalomyelitis [22]. Ataxia was considered a Grade 2b Group 2 criterion [16] (see Table S1, supporting information). The major variables considered in estimating severity were the Vietnamese classification, the presence of cardiopulmonary failure, and the persistence of neurologic symptoms with a modified Rankin Scale ≥ 2 (neurologic symptoms with significant disability) at days 14 and 30 from the onset of disease [23].

Management, including microbiological diagnosis and imaging tests

A protocol for the diagnosis and management of cases was established and it was applied prospectively during the study period.

Baseline assessment at presentation included history and physical examination, blood and CSF analysis, bacterial cultures, and collection of nasopharyngeal swab and stool samples in all the cases. An in-house PAN-Enterovirus real time-PCR [24] was performed in plasma and CSF in all patients. In addition, nasopharyngeal aspirate and stools were collected for EV detection by PAN-Enterovirus real time-PCR in patients with brainstem encephalitis or encephalomyelitis. RT-PCR for herpes simplex virus (HSV) in CSF was tested. The FilmArray Meningitis-Encephalitis (FA-M/E) panel was also tested in the CSF of the first 20 patients with brainstem symptoms of the outbreak [1]. Imaging studies were performed on all children with brainstem encephalitis and encephalomyelitis, except those with mild symptoms or quick recovery. The imaging studies included brain and spine magnetic resonance image (MRI) (diffusion-weighted, fast-spin-echo, T1 and T2-weighted, fluid-attenuation-inversion-recovery, and spoiled-gradient-echo sequences for the brain study, and T1 and T2-weighted for the spine study).

Treatment conformed to several guidelines for diagnosis and treatment of HFMD, recommending supportive care and consideration of IVIG in severe cases [16,21]. The clinical, radiological, and pathological assessments described for the Australian 2013 outbreak [20] were taken into special consideration to prescribe IVIG and/or methylprednisolone. IVIG (1 g/kg/day, once daily, for 2 days) was administered to patients with lethargy, invalidating or persistent ataxia, progressive worsening, or paresis. Methylprednisolone (30 mg/kg/day, 1 time/day, for 3 days) was given to patients with clinical or MRI signs of myelitis and patients with brainstem MRI lesions and persistent symptoms in whom IVIG had already been administered.

Outpatient follow-up after discharge was performed on all patients at days 14 and 30 from onset of disease.

EV-positive samples were genotyped at the Enterovirus Unit of the National Centre for Microbiology using a RT-nested PCR in the 3'-VP1 region specific for species EV-A, B, and C and sequencing according to a previously described procedure [25]. To study the relationships between Spanish EV-A71 strains and those circulating in other countries, a phylogenetic analysis was performed. Multiple sequence alignments were performed by the ClustalW program. Genetic distances were calculated using the maximum composite likelihood (MCL) nucleotide distance model, and statistical significance of phylogenies was estimated by bootstrap analysis with 1000 pseudoreplicate datasets. Phylogenetic trees were constructed using the neighbour-joining (NJ) method in the MEGA software 6.0.

Statistical analysis

Descriptive statistics are reported in terms of absolute frequencies and percentages. Data comparisons of categorical variables were performed using Pearson chi-square test or Fisher's exact test when appropriate. Continuous non-normal distributed variables were described as median value and interquartile range

(IQR) and compared using Mann-Whitney *U* test and Kruskal-Wallis analysis. Spearman's rho correlation coefficient was used to analyse the correlation between the time from the onset of neurologic symptoms to the initiation of therapies and the duration of symptoms after the onset of therapies. Statistical analysis was performed with SPSS v22.0 software (Armonk, NY: IBM Corp). A *p*-value <0.05 was considered to be statistically significant. Relative risks and 95% CI were calculated using MedCalc software.

The institutional ethics board approved the study and informed consent was obtained from parents or carers.

Results

Patient demographics

Sixty-three patients were admitted with neurological symptoms and EV detection during the study period. Informed consent could not be obtained from six patients and they were excluded from the study.

Of the 57 patients, 41 (72%) were classified with brainstem encephalitis following the WHO Classification, seven cases (12%) were diagnosed with aseptic meningitis, six cases (11%) with encephalitis, and three cases (5%) with encephalomyelitis, two of them with cardiopulmonary failure.

Overall, the median age at disease onset was 27.7 months (IQR 17.1–37.6) and 33 out of 57 patients were male (57.9%). The first case was diagnosed on 27 April and the outbreak lasted 10 weeks (Fig. 1).

Non-neurological manifestations

Table S2 (supporting information) shows the main clinical symptoms of patients. Fever (axillary temperature $\geq 38^\circ\text{C}$ at home

or in hospital) was the initial manifestation in all patients, with the median peak body temperature being 39°C (IQR 38.5–39.5). The mean time from the onset of fever to admission was 48 hours (IQR 24–72 hours) and the fever lasted a median of 3 days (IQR 2–4 days). There were no differences in peak body temperature between patients with aseptic meningitis and patients with brainstem encephalitis or encephalomyelitis; however, fever was shorter in patients with aseptic meningitis (Table 1).

Among the mucocutaneous manifestations, herpangina was observed in only eight (14%) patients, while petechial rash on extremities was the main observed exanthema (11, 19%) followed by HFMD vesicular exanthema (10, 18%).

Neurological manifestations

The mean time from the onset of fever to the onset of neurological symptoms was 24 hours (IQR 0–72 hours). Within the first 24 hours of fever, the most common neurological symptoms were lethargy and/or irritability (17 (30%) patients). Myoclonic jerks, tremor, ataxia, and/or cranial nerve involvement appeared subsequently in 44 children, mainly after 24 hours of fever (27 (61%) patients). Nystagmus and/or strabismus were observed in eight patients (14%). The three patients with encephalomyelitis developed paresis with a marked weakness especially in the neck and shoulder region after 24 hours of fever, two of them experiencing bulbar palsy and autonomous nervous system (ANS) dysfunction in the form of cardiopulmonary failure as well. One patient had a typical febrile seizure.

Laboratory and imaging findings

White-blood-cell (WBC) count and procalcitonin were high in patients with severe ANS dysfunction, but normal in all the others

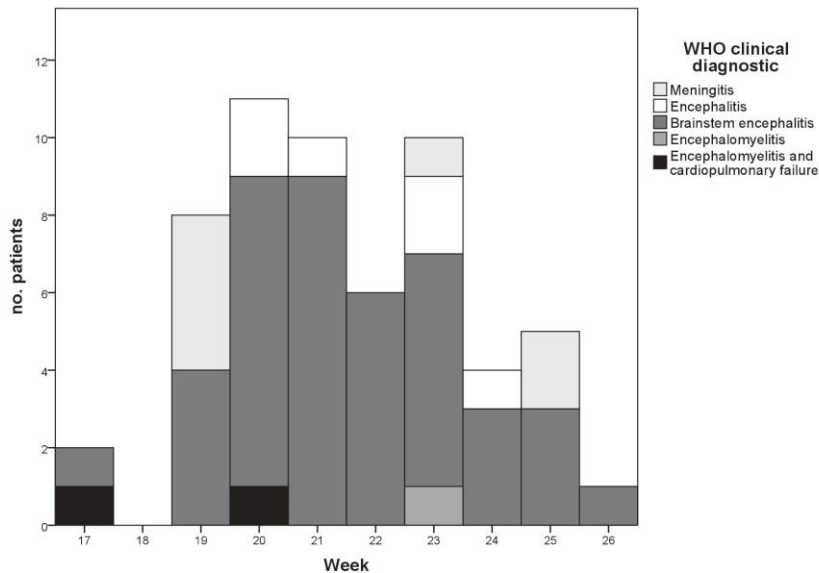


Fig. 1. Cases per week of EV-related neurological disease, classified according to the case definitions from the WHO Guide to Clinical Management and Public Health Response for Hand, Foot and Mouth Disease [21].

Table 1
Epidemiological, clinical, laboratory, and imaging variables associated with more severe disease in children with EV-related neurologic disease (n = 57)

	No.	Age, months ^a	Sex, males	Peak fever, °C ^b	Duration of fever ^c , days	White-blood-cell count ^d , cells*10 ³ /μL	CSF white cell count ^e , cells/mm ³	Procalcitonin ng/mL ^f	Bulbar involvement on MRI (yes/no, patients who underwent MRI)
WHO clinical classification [21]									
CNS involvement stage without ANS dysfunction	55	27.8 (18.4–37.7)	31/55	39.0 (38.5–39.5)	3 (2–4)	12.4 (11–15)	182 (105–442)	0.1 (0.07–0.15)	13/45
Cardiopulmonary failure stage	2	8.2 (7.7–8.6)	2/2	38.3 (38.1–38.5)	4 (3–5)	19.4 (17.4–21.4)	55 (10–100)	1 (0.40–1.60)	2/2
		p 0.07	p 0.55	p 0.14	p 0.43	p 0.03	p 0.09	p 0.02	p 0.10
Vietnam HFMD classification [22]									
Aseptic meningitis	7	12.3 (0.7–37.7)	4/7	38.3 (38.0–39.2)	1 (0.5–3)	12.4 (10.1–15.4)	560 (200–690)	0.09 (0.06–0.11)	—
2a	9	18.4 (5.1–48.9)	6/9	39.0 (38.3–39.8)	3 (1–4)	11.0 (9.9–12.7)	88 (52–180)	0.10 (0.10–0.25)	1/5
2bG1	9	27.9 (22.6–36.9)	5/9	39.0 (38.0–39.8)	3 (0.5–4.5)	11.9 (11.5–13.3)	198 (135–370)	0.09 (0.09–0.20)	1/9
2bG2	30	28.1 (20.6–42.0)	16/30	39.0 (38.7–39.6)	3.5 (3–4)	12.8 (11.7–15.3)	180 (112–385)	0.08 (0.05–0.14)	11/29
4	2	8.2 (7.9–8.6)	2/2	38.3 (38.1–38.5)	4 (3–5)	19.4 (17.4–21.4)	55 (10–100)	1.00 (0.40–1.60)	2/2
		p 0.09	p 0.73	p 0.25	p 0.02	p 0.05	p 0.02	p 0.10	p 0.08
NRL exploration with persistent paresis at day 30									
Yes	3	8.6 (8.2–16.7)	2/3	38.5 (38.3–39.1)	4 (3.5–4.5)	17.4 (15.0–19.4)	50 (30–75)	0.09 (0.07–0.14)	3/3
No	54	27.8 (18.2–37.8)	31/54	39.0 (38.5–39.5)	3 (2–4)	12.4 (11.1–15.1)	185 (112–445)	1.00 (0.40–1.60)	12/42
		p 0.12	p 1.00	p 0.59	p 0.27	p 0.07	p 0.02	p 0.01	p 0.01

ANS, autonomic nervous system; CNS, central nervous system; CSF, cerebrospinal fluid; HFMD, hand-foot-mouth disease; MRI, magnetic resonance imaging; NRL, neurologic; WHO, World Health Organization.

Differences were considered significant at p<0.05, and these values are listed in bold type.

^a Median (interquartile range).

(Table 1). No patient had significant alterations in plasma C-reactive protein. CSF white-cell count was significantly higher in patients with aseptic meningitis than in patients with brainstem encephalitis and/or encephalomyelitis (Table 1).

Forty-seven MRIs were performed, among which 25 (53%) were abnormal: 15 had bulbar involvement and 18 had medullary involvement. The most common MRI findings were high-intensity lesions on T2-weighted images in the dorsal pons and medulla oblongata, midbrain, and dentate nuclei. In cases with medullary involvement, MRI showed bilateral high-intensity lesions on T2-weighted images in the anterior horn cells of the spinal cord and also in the posterior cords in some cases.

Virological findings

The PAN-Enterovirus real time-PCR detected EV genome in the CSF of six out of 57 (11%) patients, all being patients with diagnosis of aseptic meningitis. Patients testing negative for CSF were tested for EV detection in faeces and nasopharyngeal aspirate using the same PAN-Enterovirus real time-PCR. The rates of detections were 40 out of 46 (87%) in faeces and 35 out of 51 (69%) in nasopharyngeal aspirate. In only two of 33 patients was EV detected in plasma.

On the other hand, the FilmArray M/E panel detected EV genome in CSF of four out of 20 patients with brainstem symptoms who were negative for EV detection in CSF using the PAN-Enterovirus real time-PCR [1]. HHEV-6 was detected in three of 20 patients and the result was interpreted as latency in CSF [1].

No bacterial culture from CSF or blood was positive. No patient tested positive for HSV infection in CSF.

Detected EV was genotyped in 47 of 57 (82%) patients, with EV-A71 being the most frequently identified type (40 out of 47), followed by echovirus-30 (four out of 47), coxsackievirus (CV)-B1 (two out of 47), and CV-A10 (one out of 47). EV-A71 was the only serotype detected in patients with brainstem encephalitis or encephalomyelitis. Table 2 shows EV types and the WHO clinical diagnosis. EV-A71 was detected in the CSF from one brainstem encephalitis

case and in another CSF sample, an EV-A was identified, but the specific serotype could not be determined. The rest of the EV-A71 were typed from respiratory and/or stool detections.

Phylogenetic analysis carried out with 38 EV-A71 strains obtained in this study and others available in GenBank showed that most of the Spanish ones (35 out of 38) belonged to subgenogroup C1 and only three out of 38 to subgenogroup C2 (Fig. 2). Furthermore, Spanish C1 strains formed a subclade together with the variant Germany strain detected in 2015 [15,26].

Management

Thirty-three patients (58%) received IVIG, of whom 26 also received steroids (46%). No patient with aseptic meningitis or encephalitis received treatment. The median lag time between the onset of fever and the administration of IVIG was 3 days (IQR 3–5), and from admission to its administration was 1 day (IQR 1–2). The median time from the onset of fever to corticosteroid administration was 4 days (IQR 3.5–5 days), and a median of 2 days (IQR 1–3) passed from admission to its administration. Steroids were initiated in six cases with normal MRI, because of cranial nerve dysfunction (two cases) and persistent symptoms (mainly, ataxia) despite the administration of IVIG (four cases). Four patients did not receive steroids because of complete recovery before abnormal MRI results.

Outcomes and variables associated with a more severe disease

The neurological symptoms lasted a median of 5 days (IQR 3.5–8 days), and the median hospital stay was 7 days (IQR 4.5–9 days). Eight cases (14%) were admitted to the intensive care unit (ICU), because of decreased consciousness level for a short-observation period (six cases) and severe shock (two) requiring mechanical ventilation and inotropes. The median ICU stay was 3.5 days (IQR 1.5–17.5).

Forty-four patients (77%) recovered fully while they were hospitalized and the remaining 13 patients (23%) were discharged with symptoms, ranging from mild ataxia in 10 patients, to paresis

Table 2
Clinical characteristics and enterovirus (EV) positive rates according to EV genotypes

	Patients in whom EV could be genotyped		p-value ^a	Total, n = 47	Patients in whom EV could not be genotyped, n = 10
	EV-A71, n = 40	Other EV types, n = 7			
WHO clinical classification [21]					
Aseptic meningitis	2 (28.6%)	5 (71.4%)		7	0
Encephalitis	4 (66.6%)	2 (33.3%)		6	0
Brainstem encephalitis	31 (100%)	0 (0%)	<0.01	31	10 ^b
Encephalomyelitis	1 (100%)	0 (0%)		1	0
Encephalomyelitis with ANS dysfunction	2 (100%)	0		2	0
Positive samples in cerebrospinal fluid	4/37 ^c	5/7	<0.01	9/44	2/8
Positive samples in respiratory specimens	27/40	2/4	0.59	29/44	6/7
Positive samples in faeces	29/35	3/3	1	32/38	8/8

ANS, autonomous nervous system; WHO, World Health Organization.

^a Comparing proportions between EV-A71 group and other EV types.

^b In one case, EV from species A was identified but it could not be typed.

^c The four detections were made using the FilmArray meningitis/encephalitis panel [1].

in three. Paresis affected neck musculature chiefly (two patients had hypotony on horizontal and vertical suspension, oral feeding disability and shoulder weakness, and one patient was bending the neck laterally). At day 30, all were improving and oral feeding was successfully recovered. Three additional patients presented persistent hyperreflexia in some extremity with no significant disability at day 30. There were no deaths.

With regard to epidemiological variables associated with severe ANS dysfunction, two out of nine patients aged under 12 months old had cardiopulmonary failure, whereas no older patients had it ($p = 0.02$). Higher white-blood-cell counts, higher procalcitonin blood levels, and lower CSF white-cell counts were more common in patients with cardiopulmonary failure. As for MRI results, all the patients with cardiopulmonary failure had bulbar inflammatory lesions (two out of two), but this finding was also found in patients without ANS dysfunction (13 out of 45), so the differences were not significant (Table 1).

Sequelae with significant disability at day 30 were related to the presence of encephalomyelitis independently of cardiopulmonary failure, using both the case definitions of the WHO (relative risk (RR) 96.2; 95% CI 6–1557) and stage 4 of the Vietnamese classification (RR 31; 95% CI 6–163) (Table 3). We did not find any correlation between the prompt initiation of IVIG and the duration of neurological symptoms after the onset of treatment (Spearman rho -0.24, $p = 0.20$). However, the lag time between the onset of symptoms and the onset of corticosteroids, and the duration of neurological symptoms after the onset of treatment, correlated inversely (Spearman rho -0.56, $p = 0.01$). No paresis/ANS dysfunction was observed in patients who had been administered corticosteroids and/or IVIG.

Discussion

This is the first report of an outbreak of central nervous system (CNS) disease associated with EV-A71 detection in Spain. In all patients with brainstem or encephalomyelitis symptoms in whom EV could be typed, EV-A71 was found. The other EV types were in the minority and were only found causing benign entities. The outbreak occurred in spring, showing a similar seasonal pattern to that reported for other EVs in Spain [9,25]. It affected children of around 2 years of age, like other EV-A71 epidemics elsewhere [4,20,27]. Although the EV-A71 outbreak seemed to be largely restricted to Catalonia, some sporadic cases occurred in the rest of Spain (no published data). Furthermore, a smaller concomitant outbreak in France has recently been reported [28]. EV-A71 is

classified into seven genogroups, A–G, on the basis of the diversity of the nucleotide sequences of the VP1 protein capsid. In recent years, increasing epidemic activity of genogroups B3–B5 and C1–C5 has been reported in the Asian-Pacific region, while genogroup C1–C5 viruses were also detected in Australia. In Europe, most of the EV-A71 detected belongs to C1 and C2 [12]. The phylogenetic analysis showed that most of the EV-A71 detected in 2016 in Catalonia belonged to subgenogroup C1. Our centre participates in a Spanish EV surveillance network that reported low-level circulation of EV-A71 in recent years, associated with non-severe neurological symptoms [10,29]. These EV-A71 C1 viruses had not previously been detected in Spain [10] and were closely related to a new cluster of EV-A71 C1 viruses identified in Germany and France in 2015 and 2016, respectively, suggesting that this new variant has spread from the north to the south of Europe [15,26,28]. The Public Health Agency of Catalonia conducted epidemiological research and they did not find any association between the first cases suggesting a common origin nor a clear connection between cases [30].

Similar to poliomyelitis, detection of EV-A71 from sterile sites is specific but usually insensitive [21], while detection from rectal and throat swabs is more sensitive but less specific and may include asymptomatic carriage. The clinical similarity between the patients as well as the detection of EV-A71 in all the cases of brainstem encephalitis and encephalomyelitis guided us to the aetiological diagnosis of the outbreak. Wide networks of EV molecular surveillance in European countries may help to identify new virulent variants and to assist in early detection of the aetiology and epidemiological connections of similar outbreaks, which in turn may help to guide clinical management and foster optimal diagnostic strategies.

We found a very low rate of patients with EV-A71 and mucocutaneous manifestations, which is concordant with previous literature reporting a wide variability of manifestations depending on the dermatotropism and neurotropism of the circulating strain [8,31]. This fact made a prompt diagnosis harder. Initial manifestations could be indistinguishable among patients with meningitis, encephalitis, brainstem encephalitis, and encephalomyelitis, but patients with the later two progressively developed myoclonic jerks, tremor, ataxia, and, among a minority, cranial nerve involvement. In patients with aseptic meningitis, fever duration was shorter, pleocytosis was higher, and the CSF was more likely to be positive for EV, as in other studies [32]. Consequently, patients with a suspected diagnosis of aseptic meningitis and persistent fever should undergo close clinical observation and may require further investigation.

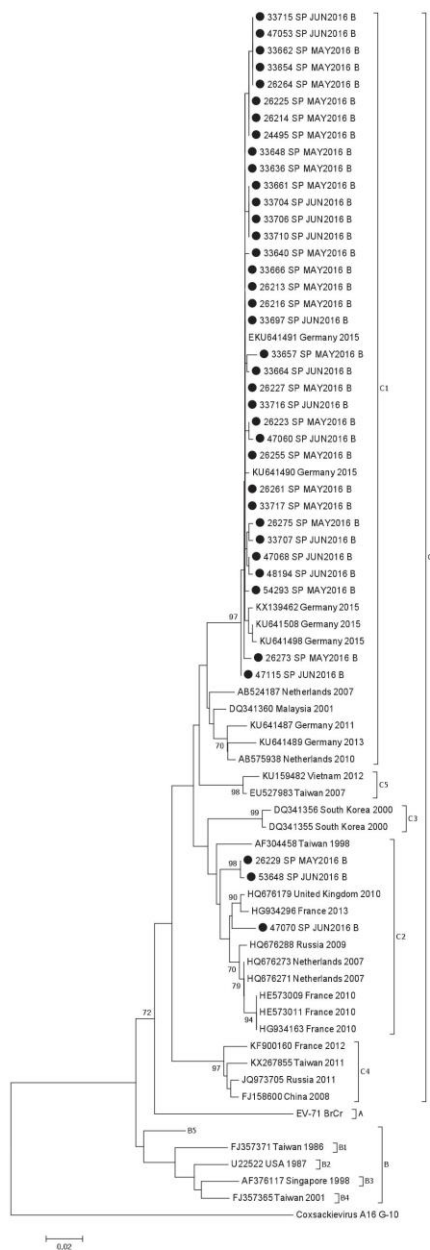


Fig. 2. Phylogenetic analysis of 38 Catalanian and 31 worldwide strains of EV-A71 based on a 360-nucleotide 3'-VP1 sequence. MEGA 6 software was used to construct

Regarding variables associated with a more severe disease, most of our patients were classified in the Stage 2b Group 2 of the Vietnamese classification at the peak of the disease. During hospitalization, some patients worsened to Stage 2b Group 2, but no patient developed ANS dysfunction (Stages 3 and 4), in contrast to other series [27]. There were no deaths, which seems plausible considering that the case-fatality rate for this disease is low (<0.4%) [16]. Nevertheless, two cases had signs of severe ANS dysfunction at admission. Both were younger than 12 months old, in line with other series that have inversely correlated the age at onset with the severity [18,33,34]. Leucocytosis has also been described in the most severely affected children, as has a more prolonged fever [19,35]. As with the outbreak in Australia in 2013 [20], this study also supports the usefulness of the 2011 WHO guidelines for establishing the risk of sequelae using the case definitions of each clinical entity. Persistent paresis at day 30 was only observed in the three patients with encephalomyelitis.

The role of IVIG treatment in reducing acute morbidity and mortality rates is controversial [16–20]. Despite the main indication of IGIV treatment being clinical severity [16,21], we used MRI to guide the treatment, following some other experiences [20]. The frequency and type of MRI findings in our patients with severe symptoms (Stage 2b Group 2) were consistent with previous reports [20,36,37], but we found an unexpected number of patients with non-severe symptoms (Stage 2a) and bulbar involvement on MRI. Furthermore, some patients with abnormal MRI were not treated because of the timing of imaging and recovery. This limits the conclusions that can be drawn about the role of MRI in treatment planning, as some patients may not need to be treated if they continue to improve despite abnormal imaging. Additionally, no conclusions can be drawn concerning the worsening of neurological manifestations without IVIG treatment, as all the patients with severe disease received it. Regarding steroids, they are a common treatment in viral and inflammatory myelitis [38], and their use in EV-A71 disease has been documented [20,39]. The prompt use of corticosteroids in children with no severe symptoms also has been associated with increased risk of subsequent severe disease in other observational studies [40,41]. In our series, most of the patients received the treatment after several days of symptoms, and a worsened clinical course was not observed in them. Additional research on the effectiveness and safety of IVIG and steroids is imperative.

One of the main limitations of this study is that the small number of patients with ANS dysfunction limits the extrapolation from the data. It is also an observational study and this limits conclusions about the efficacy of treatments.

To conclude, 57 patients with CNS disease because of EV, sought treatment at our department. Most were infants with brainstem encephalitis, a manifestation rarely observed in our setting previously. EV-A71 was detected in all the cases of brainstem encephalitis or encephalomyelitis. Most of the EV-A71 belonged to subgenogroup C1, which was closely related to a new cluster of EV-A71 C1 viruses identified in Germany and France in 2015 and 2016. Treatment with IVIGs and corticosteroids was used according to the severity, but no conclusions can be drawn about their efficacy. Age younger than 12 months, longer fever, higher WBC-count, and higher procalcitonin levels were related to a more severe disease. All the patients but the three who presented with signs of encephalomyelitis before treatment showed a good clinical course and had no significant sequelae at day 30.

the NJ and MCL tree. CV-A16 prototype strain G-10 was used as the outgroup. Bootstrap values >70% are indicated at the branch nodes. The Catalanian strains from 2016 are indicated by black circles.

Table 3
Outcomes according to the WHO clinical classification [21] and the Vietnamese HFMD classification [22]

	Length of hospital stay, days	IVIg treatment (Yes)	NRL symptoms (mRS ≥ 2) at day 14	NRL symptoms (mRS ≥ 2) at day 30
WHO clinical classification				
Meningitis	3 (2–5)	0/7	0/7	0/7
Encephalitis	4.5 (3–6.2)	1/6	0/6	0/6
Brainstem encephalitis	8 (6–9)	30/41	9/41	0/41 ^a
Encephalomyelitis	10 (7.5–11.0)	1/1	1/1	1/1
Encephalomyelitis and cardiopulmonary failure	51 (38–64)	2/2	2/2	2/2
			p 0.01	p <0.01
Vietnam HFMD classification				
Aseptic meningitis	3 (2–5)	0/7	0/7	0/7
2a	4 (3–6.5)	2/9	0/9	0/9
2bG1	9 (5.5–10.5)	6/9	2/9	0/9
2bG2	8 (6–10)	24/30	8/30	1/30 ^a
4	51 (38–64)	2/2	2/2	2/2
			p 0.01	p <0.01

HFMD, hand-foot-mouth disease; IVIg, intravenous immunoglobulin; NRL, neurologic; mRS, modified Rankin Scale; WHO, World Health Organization.

Differences were considered significant at $p < 0.05$, and these values are listed in bold type.

^a Three other patients had discrete hyperreflexia in an extremity without significant disability.

Transparency declaration

This study was partially supported by a grant from the Spanish National Health Institute [grant number PI15CIII-00020] and “Fundación Godia”. Dr Armangué is supported by a grant from Instituto Carlos III (CM14/00081) and a Dodot Procter & Gamble research grant sponsored by Asociación Española de Pediatría (AEP) (DNO40579, TA). The funders have not influenced the design or analysis, nor have they had any role in preparing the manuscript. The authors declare no potential conflicts of interest.

Acknowledgements

Thanks to all the clinical, laboratory, and diagnostic imaging personnel who take care of patients and who organized the response and management of the outbreak in our centre.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data related to this article can be found at <http://dx.doi.org/10.1016/j.cmi.2017.03.016>.

References

- Launes C, Casas-Alba D, Fortuny C, Valero-Rello A, Cabrerizo M, Muñoz-Almagro C. Utility of Filmarray Meningitis/Encephalitis panel during an outbreak of enterovirus brainstem encephalitis in Catalonia (2016). *J Clin Microbiol* 2016;55:336–8.
- European Centre for Disease Prevention and Control. Enterovirus detections associated with severe neurological symptoms in children and adults in European countries. 2016 Aug 08 [cited 2017 Jan 5]. <http://ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/01-08-2016-RRA-Enterovirus%2071-Spain,%20France,%20Netherlands.pdf>.
- Ooi MH, Wong SC, Lewthwaite P, Cardoso MJ, Solomon T. Clinical features, diagnosis, and management of enterovirus 71. *Lancet Neurol* 2010;9:1097–105.
- McMinn PC. An overview of the evolution of enterovirus 71 and its clinical and public health significance. *FEMS Microbiol Rev* 2002;26:91–107.
- Schmidt NJ, Lennette EH, Ho HH. An apparently new enterovirus isolated from patients with disease of the central nervous system. *J Infect Dis* 1974;129:304–9.
- Van der Sanden S, Koopmans M, Uslu G, Van der Avoort H, on behalf of the Dutch Working Group for Clinical Virology. Epidemiology of enterovirus 71 in The Netherlands, 1963 to 2008. *J Clin Microbiol* 2009;47:2826–33.
- Chumakov M, Voroshilova M, Shindarov L, Lavrova I, Gracheva L, Koroleva G, et al. Enterovirus 71 isolated from cases of epidemic poliomyelitis-like disease in Bulgaria. *Arch Virol* 1979;60:329–40.
- Nagy G, Takátsy S, Kukán E, Mihályi I, Dömök L. Virological diagnosis of enterovirus type 71 infections: experiences gained during an epidemic of acute CNS diseases in Hungary in 1978. *Arch Virol* 1982;71:217–27.
- Rodà D, Pérez-Martínez E, Cabrerizo M, Trallero G, Martínez-Planas A, Luaces C, et al. Clinical characteristics and molecular epidemiology of enterovirus infection in infants < 3 months in a referral paediatric hospital of Barcelona. *Eur J Pediatr* 2015;174:1549–53.
- Cabrerizo M, Farrago D, Muñoz-Almagro C, Del Amo E, Domínguez-Gil M, Eiros JM, et al. Molecular epidemiology of enterovirus 71, coxsackievirus A16 and A6 associated with hand, foot and mouth disease in Spain. *Clin Microbiol Infect* 2014;20:O150–5.
- Akhmadishina LV, Govorukhina MV, Kovalev EV, Nenadskaya SA, Ivanova OE, Lukashov AN. Enterovirus A71 Meningoencephalitis outbreak, Rostov-on-Don, Russia, 2013. *Emerg Infect Dis* 2015;21:1440–3.
- Tee KK, Lam TT, Chan YF, Bible JM, Kamarulzaman A, Tong CY, et al. Evolutionary genetics of human enterovirus 71: origin, population dynamics, natural selection, and seasonal periodicity of the VP1 gene. *J Virol* 2010;84:3339–50.
- Huang SW, Hsu YW, Smith DJ, Kiang D, Tsai HP, Lin KH, et al. Reemergence of enterovirus 71 in 2008 in Taiwan: dynamics of genetic and antigenic evolution from 1998 to 2008. *J Clin Microbiol* 2009;47:3653–62.
- Muslin C, Joffret ML, Pelletier I, Blondel B, Delpeyroux F. Evolution and emergence of enteroviruses through intra- and inter-species recombination: plasticity and phenotypic impact of modular genetic exchanges in the 5' untranslated region. *PLoS Pathog* 2015;11:e1005266.
- Karrasch M, Fischer E, Scholten M, Sauerbrei A, Henke A, Renz DM, et al. A severe pediatric infection with a novel enterovirus A71 strain, Thuringia, Germany. *J Clin Virol* 2016;84:90–5.
- Che S, Cheng YB, Chokephaibulkit K, Chotpitayasunondh T, Rogier van Doorn H, Hafy Z, et al. Workshop on use of intravenous immunoglobulin in hand, foot and mouth disease in Southeast Asia. *Emerg Infect Dis* 2015;21.
- Wang SM, Lei HY, Huang MC, Su LY, Lin HC, Yu CK, et al. Modulation of cytokine production by intravenous immunoglobulin in patients with enterovirus 71-associated brainstem encephalitis. *J Clin Virol* 2006;37:47–52.
- Chang LY, Hsia SH, Wu CT, Huang YC, Lin KL, Fang TY, et al. Outcome of enterovirus 71 infections with or without stage-based management: 1998 to 2002. *Pediatr Infect Dis J* 2004;23:327–32.
- Ooi M, Wong S, Mohan A, Podin Y, Perera D, Clear D, et al. Identification and validation of clinical predictors for the risk of neurological involvement in children with hand, foot, and mouth disease in Sarawak. *BMC Infect Dis* 2009;9:3.
- Teoh HL, Mohammad SS, Britton PN, Kandula T, Lorentzos MS, Booy R, et al. Clinical characteristics and functional motor outcomes of enterovirus 71 neurological disease in children. *JAMA Neurol* 2016;73:300–7.
- Cardosa J, Farrar J, Yeng C. A guide to clinical management and public health response for hand, foot and mouth disease (HFMD). Geneva, Switzerland: World Health Organization Western Pacific Region; 2011 [cited 2016 Oct 15]. <http://www.wpro.who.int/publications/docs/GuidancefortheclinicalmanagementofHFMD.pdf>.
- Qui PT, Khanh TH, Trieu HT, Giang PT, Bich NN, Thoa le PK, et al. Intravenous magnesium sulfate for the management of severe hand, foot, and mouth disease with autonomic nervous system dysregulation in Vietnamese children: study protocol for a randomized controlled trial. *Trials* 2016;17:98.
- van Swieten JC, Koudstaal PJ, Visser MC, Schouten HJ, van Gijn J. Interobserver agreement for the assessment of handicap in stroke patients. *Stroke* 1988;19:604–7.
- Selva L, Martínez-Planas A, García-García JJ, Casadevall R, Luaces C, Muñoz-Almagro C. Comparison of an in-house real-time RT-PCR assay with a commercial assay for detection of enterovirus RNA in clinical samples. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2012;31:715–9.

- [25] Cabrerizo M, Echevarría JE, González I, de Miguel T, Trallero G. Molecular epidemiological study of HEV-B enteroviruses involved in the increase in meningitis cases occurred in Spain during 2006. *J Med Virol* 2008;80:1018–24.
- [26] 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;22:1843–6.
- [27] Khanh TH, Sabanathan S, Thanh TT, Thoa le PK, Thuong TC, Hang VT, et al. Enterovirus 71-associated hand, foot, and mouth disease, Southern Vietnam, 2011. *Emerg Infect Dis* 2012;18:2002–5.
- [28] Antona D, Kossorotoff M, Schuffenecker I, Mirand A, Leruez-Ville M, Bassi C, et al. Severe paediatric conditions linked with EV-A71 and EV-D68, France, May to October 2016. *Euro Surveill* 2016;21. <http://dx.doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2016.21.46.30402>, pii: 30402.
- [29] Cabrerizo M, Diaz-Cerio M, Munoz-Almagro C, Rabella N, Tarragó D, Romero MP, et al. Molecular epidemiology of enterovirus and parechovirus infections according to patient age over a 4-year period in Spain. *J Med Virol* 2017;89:435–42.
- [30] Subdirecció General de Vigilància i Resposta a Emergències de Salut Pública (Agència de Salut Pública de Catalunya). Informe investigació epidemiològica quadres neurològics aguts per enterovirus en població pediàtrica. 2016 Oct 21 [cited 2017 Feb 28]. http://canalsalut.gencat.cat/web/contingut/contingut_responsiu/salutAZ/E/enterovirus/neurologics_enterovirus.pdf.
- [31] 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;341:929–35.
- [32] Volle R, Bailly JL, Mirand A, Pereira B, Marque-Juliet S, Chambon M. Variations in cerebrospinal fluid viral loads among enterovirus genotypes in patients hospitalized with laboratory-confirmed meningitis due to enterovirus. *J Infect Dis* 2014;210:576–84.
- [33] Chang L-Y, Huang L-M, Gau SS-F, Wu YY, Hsia SH, Fan TY, et al. Neurodevelopment and cognition in children after enterovirus 71 infection. *N Engl J Med* 2007;356:1226–34.
- [34] Xing W, Liao Q, Viboud C, Zhang J, Sun J, Wu JT, et al. Hand, foot, and mouth disease in China, 2008–12: an epidemiological study. *Lancet Infect Dis* 2014;14:308–18.
- [35] Chang L, Lin T, Hsu K, Huang YC, Lin KL, Hsueh C, et al. Clinical features and risk factors of pulmonary oedema after enterovirus-71-related hand, foot, and mouth disease. *Lancet* 1999;354:1682–6.
- [36] Shen WC, Chiu HH, Chow KC, Tsai CH. MR imaging findings of enteroviral encephalomyelitis: an outbreak in Taiwan. *AJNR Am J Neuroradiol* 1999;20:1889–95.
- [37] Chen CY, Chang YC, Huang CC, Lui CC, Lee KW, Huang SC. Acute flaccid paralysis in infants and young children with enterovirus 71 infection: MR imaging findings and clinical correlates. *AJNR Am J Neuroradiol* 2001;22:200–5.
- [38] Delfresne P, Meyer L, Tardieu M, Scalais E, Nuttin C, De Bont B, et al. Efficacy of high dose steroid therapy in children with severe acute transverse myelitis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2001;71:272–4.
- [39] Nolan MA, Craig ME, Lahra MM, Rawlinson WD, Prager PC, Williams GD, et al. Survival after pulmonary edema due to enterovirus 71 encephalitis. *Neurology* 2003;60:1651–6.
- [40] He Y, Yang J, Zeng G, Shen T, Fontaine RE, Zhang L, et al. Risk factors for critical disease and death from hand, foot and mouth disease. *Pediatr Infect Dis J* 2014;33:966–70.
- [41] Mou J, Dawes M, Li Y, He Y, Ma H, Xie X, et al. Severe hand, foot and mouth disease in Shenzhen, South China: what matters most? *Epidemiol Infect* 2014;142:776–88.

5.1.1 Resum del primer article

Es tracta d'un estudi observacional prospectiu en el que es van incloure tots els pacients pediàtrics amb diagnòstic clínic d'encefalitis de tronc, encefalomièlitis, encefalitis i meningitis asèptica, amb detecció d'EV en alguna mostra i absència d'altra etiologia plausible entre el 15 d'abril i el 30 de juny de 2016. Es van recollir dades clíniques, analítiques, radiològiques i microbiològiques. Les principals variables considerades per a estimar la gravetat van ser: la classificació de Vietnam ¹¹², la presència de fallada cardiopulmonar i la persistència de símptomes neurològics amb discapacitat significativa als 30 dies. Es va establir un protocol diagnòstic i terapèutic per al maneig dels casos, que recomanava realitzar una real-time RT-PCR PAN EV d'elaboració pròpia en plasma i LCR en tots els pacients, i en aspirat nasofaringi i mostra de femtes en els pacients amb encefalitis de tronc o encefalomièlitis. En els primers 20 pacients amb encefalitis de tronc, també es va analitzar el FA-M/E panel en LCR (els resultats detallats d'aquesta anàlisi s'exposen en el segon article). Les mostres positives per a EV es van tipificar, mitjançant amplificació de la regió 3'-VP1 i seqüenciació Sanger de l'amplicó, a la Unitat d'EV del Centre Nacional de Microbiologia. Es van recollir cultius bacterians i es va realitzar real-time PCR per a VHS-1 i 2 en LCR. Es va realitzar RM cerebral i medul·lar en els pacients amb encefalitis de tronc o encefalomièlitis, excepte milloria ràpida.

L'Hospital Sant Joan de Déu (Esplugues de Llobregat, Barcelona) és un centre monogràfic pediàtric de tercer nivell, amb 300 llits d'hospitalització pediàtrica i una UCIP amb 24 llits. El centre participa en la xarxa espanyola de vigilància epidemiològica d'infeccions per EV i HPeV des de 2010.

Els resultats d'aquest primer estudi són:

1. Característiques epidemiològiques:

1.1. Van ingressar seixanta-tres pacients amb símptomes neurològics i detecció d'EV durant el període d'estudi, dels quals vam obtenir el consentiment

informat en cinquanta-set pacients. L'edat mitjana va ser de 27,7 mesos (rang interquartílic (RIQ), de 17,1 mesos a 37,6 mesos) i trenta-tres (57,9%) eren homes.

1.2. Seguint les definicions de l'OMS¹⁰¹, quaranta-un pacients (72%) van presentar encefalitis de tronc, set (12%) meningitis asèptica, sis (11%) encefalitis i tres (5%) encefalomièlitis, dos d'ells amb fallada cardiopulmonar.

1.3. El brot va durar 10 setmanes.

2. Manifestacions no neurològiques:

2.1. La febre va ser la manifestació inicial en tots els pacients. La febre va durar una mitjana de 3 dies (RIQ de 2 a 4 dies), essent més breu en els pacients amb meningitis asèptica ($p=0,02$).

2.2. Només vuit pacients (14%) van presentar herpangina, onze (19%) un exantema petequíal a extremitats i deu (18%) un exantema tipus MBMP.

3. Manifestacions neurològiques:

3.1. Les primeres 24 hores de febre, els símptomes neurològics més freqüents van ser la presència de letargia i/o irritabilitat; conjuntament o per separat van estar presents en disset pacients (30%).

3.2. Les mioclònies, el tremolor, l'atàxia i l'afectació de parells cranials van estar presents, conjuntament o per separat, en quaranta-quatre pacients (77%). Aquests símptomes neurològics van aparèixer principalment a partir de les 24 hores de febre.

3.3. Van presentar parèsies els tres pacients amb encefalomièlitis, també a partir de les 24 hores de febre.

4. Troballes radiològiques:

4.1. Es va realitzar RM cerebral i medul·lar a quaranta-set pacients, dels quals vint-i-cinc (53%) van presentar alteracions. Quinze van presentar afectació bulbar i divuit afectació medul·lar.

4.2. Les troballes radiològiques més freqüents van ser la presència de lesions hiperintenses en seqüències ponderades en T2, localitzades a regió dorsal del pont, bulb, mesencèfal i nuclis dentats. A nivell medul·lar, les lesions estaven localitzades a les astes anteriors (i en alguns casos a les astes posteriors).

5. Troballes microbiològiques:

5.1. Resultats de la real-time RT-PCR PAN EV en mostres invasives:

- Positiva en LCR en 6/57 (11%), tots amb diagnòstic de meningitis asèptica.
- Positiva en plasma en 2/33 (6%).

5.2. Resultats de la real-time RT-PCR PAN EV en mostres no invasives (pacients sense detecció d'EV en LCR):

- Positiva en femtes en 40/46 (87%).
- Positiva en aspirat nasofaringi en 35/51 (69%).
- Positiva en femtes i/o aspirat nasofaringi en 57/57 (100%).

5.3. Tots els cultius bacterians van resultar negatius i cap pacient va resultar positiu per a VHS en LCR.

5.4. Es va poder tipificar una de les mostres positives per a EV en quaranta-set dels pacients inclosos (82%). L'EV-A71 va ser el genotip més freqüent (40/47) i l'únic identificat en pacients amb encefalitis de tronc o encefalomièlitis. Altres genotips identificats van ser: E-30 (4/47), CV-B1 (2/47) i CV-A10 (1/47).

5.5. L'anàlisi filogenètica de la regió 3'-VP1 va mostrar que 35/38 soques d'EV-A71 pertanyien al subgenotip C1 i 3/38 al subgenotip C2. A més, es va identificar una nova soca recombinant C1 detectada per primer cop el 2015 a Alemanya^{72,169}.

6. Maneig:

6.1. Trenta-tres pacients (58%) van rebre IGIV, dels quals vint-i-sis (46%) també van rebre corticoides. La mitjana de temps entre l'inici de la febre i l'administració d'IVIG va ser de 3 dies (RIQ de 3 a 5 dies), i entre l'inici de la febre i l'administració de corticoides va ser de 4 dies (RIQ de 3,5 a 5 dies).

7. Pronòstic i variables associades amb malaltia greu:

7.1. La majoria de pacients es van classificar com a estadi 2b grup 2 de la classificació de Vietnam¹¹². Durant l'ingrés, cap pacient sense disfunció autonòmica inicial va progressar a disfunció autonòmica.

7.2. Els símptomes neurològics van durar una mitjana de 5 dies (RIQ de 3,5 a 8 dies). A l'alta, tretze pacients (23%) presentaven seqüeles, des d'atàxia lleu (10/13) a parèsia (3/13). Als 30 dies, tots els pacients amb seqüeles presentaven milloria. No va haver-hi cap èxitus.

7.3. Vuit pacients (14%) van ingressar a UCIP per disminució del nivell de consciència (6/8) o xoc que va precisar ventilació mecànica i inotrops (2/8).

7.4. Variables associades amb malaltia greu:

- L'edat menor de 12 mesos es va associar amb fallada cardiopulmonar ($p=0,02$).
- Els valors més elevats de leucòcits en plasma i de procalcitonina en plasma es van associar amb fallada cardiopulmonar (respectivament, $p=0,03$ i $p=0,02$).

- La clínica d'encefalomielitis (independentment de la presència de fallada cardiopulmonar) es va associar amb la presència de seqüeles amb discapacitat significativa al dia 30.

7.5. No es va observar una associació entre la precocitat en l'inici d'IGIV i la duració dels símptomes neurològics.

5.2 Segon article

Utility of FilmArray Meningitis/Encephalitis Panel during Outbreak of Brainstem Encephalitis Caused by Enterovirus in Catalonia in 2016.

Launes C, **Casas-Alba D**, Fortuny C, Valero-Rello A, Cabrerizo M, Muñoz-Almagro C.

Article publicat a:

J Clin Microbiol. 2016 Dec 28;55(1):336-338.



Utility of FilmArray Meningitis/Encephalitis Panel during Outbreak of Brainstem Encephalitis Caused by Enterovirus in Catalonia in 2016

Cristian Launes,^{a,b,c} Didac Casas-Alba,^a Claudia Fortuny,^{b,c,d} Ana Valero-Rello,^e Maria Cabrerizo,^f Carmen Muñoz-Almagro^{b,c,e,g}

Pediatrics Department, Hospital Sant Joan de Déu (University of Barcelona), Barcelona, Spain^a; Pediatric Infectious Diseases Research Group, Institut de Recerca Pediàtrica Hospital Sant Joan de Déu, Barcelona, Spain^b; CIBER Epidemiología y Salud Pública CIBERESP, Health Institute Carlos III, Madrid, Spain^c; Pediatric Infectious Diseases Unit, Pediatrics Department, Hospital Sant Joan de Déu (University of Barcelona), Barcelona, Spain^d; Molecular Microbiology Department, Hospital Sant Joan de Déu (University of Barcelona), Barcelona, Spain^e; Enterovirus Unit, National Centre for Microbiology, Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain^f; School of Medicine, Universitat Internacional de Catalunya, Barcelona, Spain^g

KEYWORDS brainstem, cerebrospinal fluid, encephalitis, enterovirus, multiplex PCR, rapid diagnostics

We read with interest the article by Leber et al. (1). The authors reported the performance of the FilmArray meningitis/encephalitis (FA-M/E) panel in a multi-center evaluation that included a large number of infants. Enterovirus (EV) was the main detection, and they described very high positive and negative percentages of agreement with comparator PCR assays (95.7% and 99.5%, respectively) for EV detections.

In April 2016, the first cases of an outbreak of brainstem encephalitis were observed in Catalonia, Spain. They were related to an increase of EV detections in nasopharyngeal aspirates and/or stools but not in normally sterile samples (blood or cerebrospinal fluid [CSF]) (2). EV is rarely detected by culture or molecular methods in CSF samples of children presenting with brainstem encephalitis, due to the low viral loads there (3). Despite the fact that clinical diagnosis was compatible with the EV neurological disease in other outbreaks, physicians were faced with multiple diagnostic dilemmas in an effort to ensure that bacterial or other treatable infections were not missed.

We report the performance and utility of the FA-M/E panel in this setting.

Commencing in April 2016, the first 20 children fulfilling clinical case definitions of brainstem encephalitis or encephalomyelitis (4) who were admitted in a referral pediatric hospital were included. The protocol for assessment included blood and CSF bacterial cultures, a real-time PCR for detection of herpes simplex virus 1 and 2 in CSF samples, and an in-house pan-EV real-time PCR assay (5) in plasma and CSF samples. All the negative CSF samples in the previous assays underwent additional testing by the FA-M/E panel. In these cases, the pan-EV real-time PCR was also performed in nasopharyngeal aspirate and fecal samples.

The median patient age was 27 months (interquartile range [IQR], 27.7 to 77.6). Pan-EV real-time PCR was positive in noninvasive samples in all patients (13/20 in respiratory sample and 13/18 in fecal samples) (Table 1). In CSF samples, the pan-EV real-time PCR was negative in all patients, whereas EV RNA was detected in 4/20 using the FA-M/E panel. These four patients had a lower median duration of symptoms before sampling than the patients who were FA-M/E negative (30 h [IQR, 8 to 45] versus 48 h [IQR, 21 to 72], respectively), but this difference was not statistically significant.

Accepted manuscript posted online 26 October 2016

Citation Launes C, Casas-Alba D, Fortuny C, Valero-Rello A, Cabrerizo M, Muñoz-Almagro C. 2017. Utility of FilmArray meningitis/encephalitis panel during outbreak of brainstem encephalitis caused by enterovirus in Catalonia in 2016. *J Clin Microbiol* 55:336–338. <https://doi.org/10.1128/JCM.01931-16>.

Editor A. M. Caliendo, Rhode Island Hospital

Copyright © 2016 American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

Address correspondence to Cristian Launes, claunes@hsjdbcn.org.

TABLE 1 Microbiological results of 20 cases with clinical diagnosis of brainstem encephalitis or encephalomyelitis

No. of cases	Result for indicated sample type and assay ^a							
	Cerebrospinal fluid				Plasma/blood		Respiratory specimens	Feces
	Real-time PCR-HSV 1 and 2	Pan-EV real-time PCR	Gram stain and bacterial culture	FA-M/E ^b	Pan-EV real-time PCR	Bacterial culture	Pan-EV real-time PCR ^c	Pan-EV real-time PCR ^d
7	Negative	Negative	Negative	No detection	Negative	Negative	Negative	Positive
4	Negative	Negative	Negative	No detection	Negative	Negative	Positive	Negative/NT
2	Negative	Negative	Negative	EV	Negative	Negative	Positive	Positive
2	Negative	Negative	Negative	EV	Negative	Negative	Positive	Negative/NT
2	Negative	Negative	Negative	HHV-6	Negative	Negative	Positive	Positive
1	Negative	Negative	Negative	No detection	Positive	Negative	Positive	Positive
1	Negative	Negative	Negative	No detection	Negative	Negative	Positive	Positive
1	Negative	Negative	Negative	HHV-6	Negative	Negative	Positive	Negative

^aHSV, herpes-simplex virus; EV, enterovirus; HHV-6, human herpesvirus 6; FA-M/E, FilmArray meningitis/encephalitis panel; NT, not tested.

^bThe median lag time (interquartile range) (h) between onset of fever and sampling was 30 (8 to 45) for samples with EV-positive results and 48 (21 to 72) for samples with EV-negative results.

^cThe median lag time (interquartile range) (h) between onset of fever and sampling was 48 (27 to 90) for samples with EV-positive results and 48 (18 to 72) for samples with EV-negative results.

^dThe median lag time (interquartile range) (h) between onset of fever and sampling was 48 (24 to 66) for samples with EV-positive results and 96 (30 to 96) for samples with EV-negative results.

There were no differences in clinical severity between patients with positive and negative detections in CSF samples. EV genotyping (6) was performed in 19 positive samples at the National Centre for Microbiology, Madrid, and all strains were identified as EV-A71.

With regard to other pathogens in CSF samples, human herpesvirus 6 (HHV-6) was detected in 3 patients who were negative for EV. Typical HHV-6 symptoms (such as exanthema or seizures) were not observed in them. On the other hand, HHV-6 was not found in either nasopharyngeal aspirate or blood samples, suggesting a viral latency in CSF samples. The neurological clinical features and the clinical course were similar to those in the rest of the patients.

To conclude, the FA-M/E panel was prospectively used to test samples from 20 children with brainstem symptoms with/without paresis in whom EV was detected in respiratory samples and/or fecal samples but not in CSF samples using a pan-EV real-time PCR. The FA-M/E detected EV in the CSF samples of 4 cases. These detections were confirmatory of the ongoing outbreak due to an EV neuroinfection, which was subsequently identified as EV-A71. We hypothesize that, like other nested multiplex PCRs (7), the FA-M/E panel could have a higher sensitivity to detect low viral loads than single-step real-time reverse transcription (RT)-PCR procedures.

ACKNOWLEDGMENTS

This study was partially supported by a grant from the Spanish National Health Institute (grant number PI15CIII-00020). We acknowledge Fundación Godia for supporting our research group.

FA-M/E kits were provided by BioFire Diagnostics. BioFire Diagnostics had no role in the study design or data analysis.

REFERENCES

1. Leber AL, Everhart K, Balada-Llasat J-M, Cullison J, Daly J, Holt S, Lephart P, Salimnia H, Schreckenberger PC, DesJarlais S, Reed SL, Chapin KC, LeBlanc L, Johnson JK, Soliven NL, Carroll KC, Miller J-A, Dien Bard J, Mestas J, Bankowski M, Enomoto T, Hemmert AC, Bourzac KM. 2016. Multicenter evaluation of BioFire FilmArray meningitis/encephalitis panel for detection of bacteria, viruses, and yeast in cerebrospinal fluid specimens. *J Clin Microbiol* 54:2251–2261. <https://doi.org/10.1128/JCM.00730-16>.
2. European Centre for Disease Prevention and Control. 14 June 2016. Outbreak of enterovirus A71 with severe neurological symptoms among children in Catalonia, Spain. ECDC Stockholm, Sweden. <http://ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/07-06-2016-RRR-Enterovirus%2071-Spain.pdf>.
3. Ooi MH, Wong SC, Lewthwaite P, Cardoso MJ, Solomon T. 2010. Clinical features, diagnosis, and management of enterovirus 71. *Lancet Neurol* 9:1097–1105. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(10\)70209-X](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(10)70209-X).
4. World Health Organization, Regional Office for the Western Pacific Region, Regional Emerging Diseases Intervention (REDI) Centre. 2011. A guide to clinical management and public health response for hand,

- foot and mouth disease (HFMD). World Health Organization, Geneva, Switzerland. <http://www.wpro.who.int/publications/docs/GuidancefortheclinicalmanagementofHFMD.pdf>.
5. Selva L, Martínez-Planas A, García-García JJ, Casadevall R, Luaces C, Muñoz-Almagro C. 2012. Comparison of an in-house real-time RT-PCR assay with a commercial assay for detection of enterovirus RNA in clinical samples. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 31:715–719. <https://doi.org/10.1007/s10096-011-1364-1>.
 6. Cabrerizo M, Echevarria JE, González I, de Miguel T, Trallero G. 2008. Molecular epidemiological study of HEV-B enteroviruses involved in the increase in meningitis cases occurred in Spain during 2006. *J Med Virol* 80:1018–1024. <https://doi.org/10.1002/jmv.21197>.
 7. Fujimoto T, Yoshida S, Munemura T, Taniguchi K, Shinohara M, Nishio O, Chikahira M, Okabe N. 2008. Detection and quantification of enterovirus 71 genome from cerebrospinal fluid of an encephalitis patient by PCR applications. *Jpn J Infect Dis* 61:497–499.

5.2.1 Resum del segon article

Es tracta d'un estudi observacional prospectiu en el que es van incloure els primers 20 pacients ingressats amb diagnòstic d'encefalitis de tronc o encefalomièlitis, amb detecció d'EV en alguna mostra i absència d'altra etiologia plausible, a partir de l'abril de 2016. Es van recollir dades clíniques i microbiològiques. El protocol diagnòstic va incloure realitzar una real-time RT-PCR PAN EV d'elaboració pròpia en plasma i LCR. En cas de resultat negatiu es va realitzar en aspirat nasofaringi i mostra de femtes, i també es va analitzar el FA-M/E panel en LCR. Les mostres positives per a EV es van tipificar a la Unitat d'EV del Centre Nacional de Microbiologia. Es van recollir cultius bacterians i es va realitzar real-time PCR per a VHS-1 i 2 en LCR.

Els resultats d'aquest segon estudi són:

1. Resultats de la detecció d'EV:

1.1. La real-time RT-PCR PAN EV en LCR va resultar negativa en tots els pacients. En aspirat nasofaringi va resultar positiva en 13/20 (65%) i en mostra de femtes va resultar positiva en 13/18 (72%). En aspirat nasofaringi o femtes va resultar positiva en 20/20 (100%).

1.2. El FA-M/E panel en LCR va resultar positiu per a EV en 4/20 pacients.

1.3. En el grup de pacients amb resultat positiu per a EV en LCR, la mitjana de temps des de l'inici de la febre fins la realització de la punció lumbar va ser menor que la resta, però les diferències no van ser estadísticament significatives. Tampoc no van observar-se diferències de gravetat clínica.

1.4. Es va poder tipificar una de les mostres positives per a EV en dinou dels pacients inclosos. L'EV-A71 va ser l'únic genotip identificat (19/19). Es va

poder tipificar l'EV-A71 en una mostra de LCR d'un pacient amb encefalitis de tronc.

2. Resultats de la detecció d'altres gèrmens en LCR:

2.1. El FA-M/E panel va detectar VHH-6 en 3 pacients negatius per a EV en LCR. El curs clínic d'aquests pacients va ser similar a la resta, no van presentar signes característics d'infecció per HHV-6 i es va descartar la presència de HHV-6 en aspirat nasofaringi i mostra de femtes, per la qual cosa es van interpretar els resultat com a latència viral en LCR.

5.3 Tercer article

Cerebrospinal fluid neopterin as a biomarker of disease severity in children with enterovirus-related brainstem encephalitis.

Casas-Alba D, Valero-Rello A, Muchart J, Armangué T, Jordán I, Cabrerizo M, Molero-Luís M, Artuch R, Fortuny C, Muñoz-Almagro C, Launes C.

Article publicat a:

Pediatr Neurol. 2019 Feb; [Epub ahead of print]

1 Cerebrospinal fluid neopterin in children with enterovirus-related brainstem encephalitis

2

3 Didac Casas-Alba, MD ^{1,2}; Ana Valero-Rello, PhD ^{2,3}; Jordi Muchart, MD ⁴; Thais Armangué,
4 PhD ^{5,6,7}; Iolanda Jordan, PhD ^{2, 8, 9}; María Cabrerizo, PhD ¹⁰; Marta Molero-Luís, PhD ^{7,11};
5 Rafael Artuch, PhD ¹¹; Claudia Fortuny, PhD ^{1,2,8}; Carmen Muñoz-Almagro, PhD ^{2,3,8,12}; Cristian
6 Launes, PhD ^{1,2,8}

7

8 1) Department of Pediatrics, Hospital Sant Joan de Deu (University of Barcelona), Barcelona,
9 Spain;

10 2) Pediatric Infectious Diseases Research Group, Institut de Recerca Sant Joan de Deu,
11 Barcelona, Spain;

12 3) Department of Molecular Microbiology, Hospital Sant Joan de Deu (University of
13 Barcelona), Barcelona, Spain;

14 4) Department of Diagnostic Imaging, Hospital Sant Joan de Deu (University of Barcelona),
15 Barcelona, Spain;

16 5) Pediatric Neuroimmunology Unit, Department of Pediatric Neurology, Hospital Sant Joan de
17 Deu (University of Barcelona), Barcelona, Spain;

18 6) Neuroimmunology Program, Institut d'Investigacions Biomediques August Pi I Sunyer
19 (IDIBAPS)-Hospital Clinic (University of Barcelona), Barcelona, Spain;

20 7) CIBER en Enfermedades Raras (CIBERER), Madrid, Spain;

21 8) CIBER en Epidemiología y Salud Pública (CIBERESP), Madrid, Spain;

22 9) Pediatric Intensive Care Unit, Hospital Sant Joan de Deu (University of Barcelona),
23 Barcelona Spain;

24 10) Enterovirus Unit, National Centre for Microbiology, Instituto de Salud Carlos III, Madrid,
25 Spain;

26 11) Department of Clinical Biochemistry, Institut de Recerca Sant Joan de Deu Barcelona,
27 Spain;

28 12) School of Medicine, Universitat Internacional de Catalunya, Barcelona, Spain;

29

30 **Corresponding author:** Cristian Launes, Pediatric Infectious Diseases Research Group, Institut
31 de Recerca Sant Joan de Deu; P. Sant Joan de Deu, no. 2, 08950, Esplugues de Llobregat,
32 Barcelona, Spain; phone: +34.93.280.55.69; fax: +34.93.280.36.26; e-mail address:
33 claunes@sjdhospitalbarcelona.org (C. Launes).

34 **Funding:** This study was partially supported by a grant from the Spanish National Health
35 Institute [grant number PI15CHI-00020], the CIBER of Epidemiology and Public Health
36 (Health Institute Carlos III, Spain) and "Fundación Godia". The funders have not influenced the
37 design or analysis, nor have they had any role in preparing the manuscript.

38 **Conflicts of interest:** Nothing to disclose.

39 **Keywords:** Enterovirus; EV-A71; brainstem encephalitis; biomarkers; neopterin.

40 **Abbreviated title:** CSF neopterin in EV brainstem encephalitis

41 **Word count:** 1489 words

42

1

ABSTRACT

2 **Background:** Enterovirus-A71 causes outbreaks of brainstem encephalitis (BE), ranging from
3 self-limited disease to acute flaccid paralysis and severe MRI abnormalities. The aim of this
4 study was to assess the role of CSF neopterin as a biomarker of disease severity in children with
5 enterovirus-related BE.

6 **Methods:** A descriptive, prospective, cohort study was conducted from April 2016 to March
7 2017 in a tertiary pediatric hospital. Pediatric patients with diagnosis of BE with/without
8 myelitis (encephalomyelitis (EM)) due to enterovirus infection were enrolled. The final study
9 group comprised a convenience sample including all patients with sufficient CSF volume for
10 neopterin determination. Other inflammatory markers were analyzed (CSF WBC count, CSF
11 protein; blood WBC, lymphocyte and neutrophil counts, serum C-reactive protein). The major
12 variables considered in estimating severity were the diagnosis of EM, the presence of lesions
13 and extensive lesions (> 2 affected areas) on brain and spine MRI, hospital stay length > 7 days
14 and the persistence of neurological symptoms with significant disability at day 30.

15 **Results:** Out of 60 patients, CSF neopterin could be measured in 36. Median age was 26 months
16 (IQR:19-32). Thirty-three were diagnosed with BE and three with EM. Enterovirus-A71 was the
17 only identified genotype (25/25). CSF neopterin levels were elevated (> 61 nmol/L) in 33/36
18 (92%), with a median of 347 nmol/L (IQR:204-525). CSF neopterin was useful to distinguish
19 patients with lesions on MRI (AUC=0.76;p=0.02) and extensive lesions (AUC=0.76;p=0.04).

20 **Conclusions:** This study suggests an association between CSF neopterin levels and the presence
21 of inflammatory lesions on MRI.

2

1 **INTRODUCTION**

2 An outbreak of brainstem encephalitis (BE) associated with enterovirus-A71 (EV-A71)
3 infection affecting more than 100 children occurred in Catalonia (Spain) in 2016 [1]. The
4 clinical spectrum ranged from a mild disease to acute flaccid paralysis and cardiopulmonary
5 failure. Outbreaks of EV-A71 have been associated with significant morbidity and mortality,
6 particularly in the Asia-Pacific region, leading to the coining of the term “the poliomyelitis of
7 the 21st century” [2]. Case management depends on clinical signs and symptoms in most
8 guidelines [3]. More recently, the prognostic utility of magnetic resonance imaging (MRI) for
9 EV-A71 BE has been reported and its potential to guide treatment could be inferred [4-6]. There
10 is limited literature on biomarkers to assess disease severity.

11 Neopterin is a marker of cell-mediated immunity and its levels have been proven to
12 correlate with the severity of several CNS infections, but have not been reported in EV-A71 BE
13 [7,8,9]. Neopterin is formed in monocytes, macrophages, dendritic cells and endothelial cells
14 enhancing the cytotoxic potential. Its production is induced by interferon- γ through the
15 Jak2/Stat pathway and by tumor necrosis factor through the NF-kappaB pathway, released by T-
16 lymphocytes and natural killer cells [10]. The objective of this study was to assess the use of
17 CSF neopterin as a biomarker of disease severity in children with EV-related BE.

18

19 **METHODS**20 **Study design**

21 A descriptive, prospective, cohort study was conducted from April 2016 to March 2017
22 in a tertiary pediatric hospital (Hospital Sant Joan de Deu, University of Barcelona).

23 **Inclusion criteria and definitions**

24 Pediatric patients with diagnosis of BE with/without myelitis (encephalomyelitis (EM))
25 according to the WHO case definitions [3] due to EV infection were enrolled [1]. The final
26 study group comprised a convenience sample including all patients with sufficient CSF volume
27 for neopterin determination (**Supplementary Figure 1**).

1 The major variables considered in estimating severity were the diagnosis of EM, the
2 presence of lesions and extensive lesions (>2 affected areas) on brain and spine MRI, hospital
3 stay length >7 days and the persistence of neurological symptoms with significant disability
4 (modified Rankin Scale ≥ 2) at day 30 [11].

5 **Management**

6 PAN-EV real time-PCR was performed in blood and CSF. If case of negative results,
7 nasopharyngeal aspirates and stool samples were also tested while other etiologies were
8 excluded [1]. EV-positive samples were sent to the EV Unit of the National Centre for
9 Microbiology for genotype identification [1].

10 To measure neopterin, CSF samples were stored at -70°C with protection from light
11 [12]. Neopterin was determined by oxidation by manganese dioxide and analysis by reverse
12 phase high performance liquid chromatography [12]. CSF neopterin levels were considered
13 elevated if >61 nmol/L, according to our previously established cut-off value for immune-
14 inflammatory conditions [13]. Other inflammatory markers were analyzed for comparative
15 purposes (CSF WBC count, CSF protein, blood WBC, lymphocyte and neutrophil counts and
16 serum C-reactive protein).

17 Brain and spine MRI were performed in most of the children, except in those who were
18 recovering before performing the MRI. The images were interpreted by neuroradiologists
19 blinded to the laboratory results. The number of CNS areas involved was calculated by
20 classifying high-intensity lesions in T2-weighted sequences according to their location in
21 supratentorial space, brainstem, cerebellum, cervicodorsal spine and lumbar spine.

22 Treatment consisted of supportive care and consideration of intravenous
23 immunoglobulin with/without methylprednisolone in severe cases [1]. Lumbar puncture was
24 performed before treatment administration.

25 **Statistics**

26 Dichotomous variables were compared using Chi-square test or Fisher's exact test.
27 Mann-Whitney U test was used to compare biomarker levels between groups. Receiver
28 operating characteristic (ROC) curve analysis was used to determine diagnostic accuracy of

1 CSF neopterin to detect lesions on MRI. The significance level considered was <0.05 . Statistical
2 analysis was performed with SPSS v22.0 software (Armonk, NY: IBM Corp).

3 **Ethics Statement**

4 The study was approved by the institutional ethics committee. All parents of the
5 participants provided the informed consent prior to patient enrollment.

6

7

8 **RESULTS**

9 **Description of the cohort**

10 Out of 60 patients, 8 were excluded because the lumbar puncture was performed in
11 another center and 16 due to insufficient CSF volume for neopterin determination
12 (**Supplementary Figure 1**). Excluded patients were comparable regarding age, sex and lesions
13 on MRI (data not shown). Thus, CSF neopterin levels were measured in 36. Median age was 26
14 months (interquartile-range(IQR):19-32) and 21/36 (58%) were male. Thirty-three (92%) were
15 diagnosed with BE and three (8%) with EM (**Supplementary Table 1**). The three patients with
16 EM developed paresis with a marked weakness especially in the neck and shoulder region (two
17 of them with severe autonomous nervous system dysfunction). No immunodeficiency was
18 detected in those patients.

19 EV was genotyped in 27/36; EV-A71 was the most frequently identified type (25/27).
20 In the other 2 patients, an EV belonging to species A was found, but further identification could
21 not be performed. The group of patients in whom EV-A71 could be genotyped was comparable
22 with the rest of the cohort (**Supplementary Table 1**).

23 MRI were abnormal on 18/28 (64%) patients (**Supplementary Table 2**). Analysis of
24 variables associated with abnormal MRI can be found on **Supplementary Table 3**. CSF
25 neopterin levels were elevated in 33/36 (92%), with a median of 347 nmol/L (IQR:204-525).

26 **Variables associated with a more severe disease**

27 Higher CSF neopterin levels correlated with the presence of lesions on MRI (see **Table**
28 **1**). The area under the ROC curve (AUC) was 0.76 (95% confidence interval (CI):0.56-0.96;
p=0.027). The cut-off value of >94 nmol/L had the highest average of sensitivity (100%) and

1 specificity (50%). The positive predictive value (PPV) was 78% and the negative predictive
2 value (NPV) was 100%.

3 Higher CSF neopterin levels were also observed in children with extensive lesions on
4 MRI (see Table 1). The AUC was 0.76 (95% CI:0.55-0.96; $p=0.047$). With a cut-of value of
5 >360 nmol/L, the sensitivity was 71%, the specificity was 70%, the PPV was 46% and the NPV
6 was 88%.

7 The three patients with EM had significant disability at day 30 (and persistent lesions on
8 MRI at 12-month-follow-up). Median CSF neopterin was higher in this group of patients, but
9 differences were not statistically significant (Table 1).

10 Concerning potential confounding variables, no significant association was found
11 between CSF neopterin levels and sex or age (data not shown). CSF neopterin levels tended to
12 peak on day 4-5 from fever onset and then tapered off (Figure 1). The lag time from fever onset
13 to CSF sampling did not correlate with the presence of lesions or extensive lesions on brain and
14 spine MRI ($p=0.28$).

15 No other inflammatory marker was associated with the severity variables (Table 1).

16

17

DISCUSSION

18 This study reveals that CSF neopterin levels are elevated in children with EV-related
19 BE/EM, and higher in those with MRI lesions. Lower values of CSF neopterin had been
20 previously described in EV meningitis/encephalitis [7,14].

21 A correlation between CSF neopterin levels and CSF viral load has been described in
22 several viral infections [8]. In the case of EV-A71 BE, no correlation with CSF viral load is
23 expected, as it is rarely detected in CSF [1]. Several observations support the etiologic role of
24 EV-A71 in BE/EM, including the observation of neuronal degeneration, necrosis and
25 neuronophagia, together with the identification of viral antigens and ribonucleic acid almost
26 exclusively on neurons in fatal cases with EM [15]. Besides, EV-A71 is known to activate many
27 inflammatory pathways which play a role in limiting viral replication but also have a deleterious

1 effect on the brain [16]. We hypothesize that viral infection induces cell-mediated immunity,
2 microglia activation and neopterin synthesis, which is a pathway linked to neurovirulence.

3 This study demonstrated an association between CSF neopterin levels and the presence
4 and extent of MRI lesions. It is a promising finding because according to a recent meta-analysis
5 on outcomes following EV-A71 BE, a normal MRI may be a good prognostic sign (lower
6 cumulative incidence of sequelae or death) [4]. Moreover, many authors have reported a
7 statistically significant association between multiple area involvement on MRI and disease
8 severity [5,6], and hence the presence of lesions on MRI is not only useful for diagnosis but also
9 for prognosis. Because of equipment availability and the need for sedation in children, MRI is
10 not always feasible or is performed days after disease onset.

11 The main limitations of this study are the small sample size, the potential bias of a
12 single-center study and the potential confounding effect of lag time from fever onset to CSF
13 sampling, which has been illustrated in **Figure 1**. Twenty-four patients were excluded because
14 CSF was unavailable or insufficient, but those were comparable regarding epidemiologic and
15 clinical variables. No conclusions regarding the utility of neopterin as a biomarker of
16 neurological sequelae could be drawn as only three patients had a significant disability at day
17 30. Because CSF neopterin levels are generally performed in reference laboratories, the inability
18 to obtain timely results can limit their clinical utility.

19 To conclude, this study suggests an association between CSF neopterin levels and the
20 presence of inflammatory lesions on MRI. This finding must be further validated in larger
21 cohorts, which might allow deeper insights into the role of CSF neopterin as a biomarker of
22 disease severity.

REFERENCES

- 1
2
- 3 1. Casas-Alba D, de Sevilla MF, Valero-Rello A, et al. Outbreak of brainstem encephalitis
4 associated with enterovirus-A71 in Catalonia, Spain (2016): a clinical observational study in a
5 children's reference centre in Catalonia. *Clin Microbiol Infect.* 2017;23:874-881. DOI:
6 10.1016/j.cmi.2017.03.016
7
- 8 2. Prager P, Nolan M, Andrews IP, et al. Neurogenic pulmonary edema in enterovirus 71
9 encephalitis is not uniformly fatal but causes severe morbidity in survivors. *Pediatr Crit Care*
10 *Med.* 2003;4:377-81. DOI: 10.1097/01.PCC.0000074274.58997.FE
11
- 12 3. Cardosa J, Farrar J, Yeng C. A Guide to Clinical Management and Public Health Response
13 for Hand, Foot and Mouth Disease (HFMD).
14 <http://www.wpro.who.int/publications/docs/GuidancefortheclinicalmanagementofHFMD.pdf>.
15 Accessed December 18, 2018.
16
- 17 4. Jones E, Pillay TD, Liu F, et al. Outcomes following severe hand foot and mouth disease: A
18 systematic review and meta-analysis. *Eur J Paediatr Neurol.* 2018:1-11. DOI:
19 10.1016/j.ejpn.2018.04.007
20
- 21 5. Liu K, Zhou Y, Cui S, et al. Clinical Value of Dorsal Medulla Oblongata Involvement
22 Detected with Conventional MRI for Prediction of Outcome in Children with Enterovirus 71-
23 related Brainstem Encephalitis. *Pediatr Infect Dis J.* 2018:1. DOI:
24 10.1097/INF.0000000000002041
25
- 26 6. Long L, Xu L, Xiao Z, et al. Neurological complications and risk factors of cardiopulmonary
27 failure of EV-A71-related hand, foot and mouth disease. *Sci Rep.* 2016;6:1-9. DOI:
28 10.1038/srep23444

1

2 7. Hytönen J, Kortela E, Waris M, et al. CXCL13 and neopterin concentrations in cerebrospinal
3 fluid of patients with Lyme neuroborreliosis and other diseases that cause neuroinflammation. *J*
4 *Neuroinflammation*. 2014;11:1-11. DOI: 10.1186/1742-2094-11- 103.

5

6 8. Spudich S, Gisslen M, Hagberg L, et al. Central nervous system immune activation
7 characterizes primary human immunodeficiency virus 1 infection even in participants with
8 minimal cerebrospinal fluid viral burden. *J Infect Dis*. 2011;204:753-760. DOI:
9 10.1093/infdis/jir387.

10

11 9. Macdonald-Laurs E, Koirala A, Britton PN, et al. CSF neopterin, a useful biomarker in
12 children presenting with influenza associated encephalopathy? *Eur J Paediatr Neurol*. 2018;9.
13 DOI: 10.1016/j.ejpn.2018.09.009. [Epub ahead of print]

14

15

16 10. Huang A, Zhang Y-Y, Chen K, Hatakeyama K, Keaney JFJ. Cytokine-stimulated GTP
17 cyclohydrolase I expression in endothelial cells requires coordinated activation of nuclear
18 factor-kappaB and Stat1/Stat3. *Circ Res*. 2005;96:164-171. DOI:
19 10.1161/01.RES.0000153669.24827.DF

20

21 11. van Swieten JC, Koudstaal PJ, Visser MC, et al. Interobserver agreement for the assessment
22 of handicap in stroke patients. *Stroke*. 1988;19:604-607. DOI: 10.1161/01.STR.19.5.604

23

24 12. Batllori M, Molero-Luis M, Ormazabal A, Casado M, Sierra C, García-Cazorla A, et al.
25 Analysis of human cerebrospinal fluid monoamines and their cofactors by HPLC. *Nat Protoc*.
26 2017;12:2359-2375. DOI: 10.1038/nprot.2017.103

27

- 1 13. Molero-Luis M, Fernández-Ureña S, Jordán I, et al. Cerebrospinal fluid neopterin analysis
2 in neuropediatric patients: Establishment of a new cut off-value for the identification of
3 inflammatory-immune mediated processes. *PLoS One.* 2013;8:6-12. DOI:
4 10.1371/journal.pone.0083237
5
- 6 14. Kothur K, Wienholt L, Mohammad SS et al. Utility of CSF Cytokine/Chemokines as
7 Markers of Active Intrathecal Inflammation: Comparison of Demyelinating, Anti-NMDAR and
8 Enteroviral Encephalitis. *PLoS One.* 2016;8;11(8):e0161656. DOI:
9 10.1371/journal.pone.0161656.
10
- 11 15. Ong KC, Wong KT. Understanding enterovirus 71 neuropathogenesis and its impact on
12 other neurotropic enteroviruses. *Brain Pathol.* 2015;25:614-624. DOI: 10.1111/bpa.12279.
13
- 14 16. Yogarajah T, Ong KC, Perera D, et al. AIM2 Inflammasome-Mediated Pyroptosis in
15 Enterovirus A71-Infected Neuronal Cells Restricts Viral Replication. *Sci Rep.* 2017;7:1-16.
16 DOI: 10.1038/s41598-017-05589-2.

- 1 **FIGURE 1.** Graphic representation of CSF neopterin (nmol/L) and lag time from fever onset to
- 2 CSF sampling (days), in patients with/without lesions on MRI.
- 3
- 4 Footnote: *Patients with encephalomyelitis and persistent neurologic symptoms at day 30.

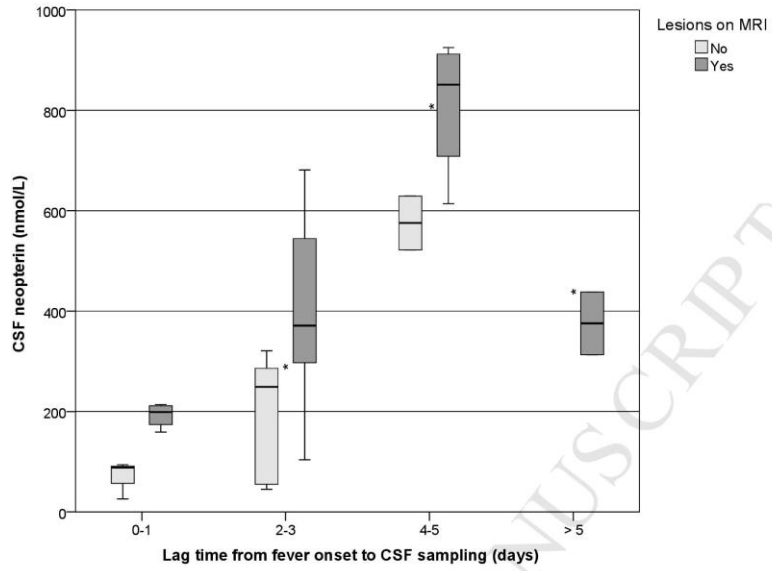
ACCEPTED MANUSCRIPT

1 **TABLE 1. Inflammatory markers in children with enterovirus-related brainstem encephalitis or**
 2 **encephalomyelitis.**
 3

	N	CSF neopterin, nmol/L ^a	CSF WBC count, cells*10 ³ /μL ^a	CSF protein, mg/dL ^a	Blood WBC count, cells*10 ³ /μL ^a	Blood lymphocyte count, cells*10 ³ /μL ^a	Blood neutrophil count, cells*10 ³ /μL ^a	Serum C-reactive protein, mg/L ^a
Lesions on brain and spine MRI								
Yes	18	371 (213-637)	165 (80-380)	42 (33-52)	12750 (11950-16175)	4000 (2475-4700)	8650 (6625-11125)	6 (3-12)
No	10	172 (53-371) p=0.027	153 (617-94) p=0.943	47 (38-65) p=0.270	12050 (8925-15150) p=0.172	3450 (2150-5325) p=0.792	6200 (4575-8625) p=0.084	3 (1-15) p=0.487
Extensive lesions on brain and spine MRI (> 2 areas)								
Yes	7	438 (189-899)	185 (50-220)	44 (35-45)	12600 (11600-17400)	4700 (2600-4700)	8700 (5000-11000)	6 (2-12)
No	21	286 (99-495) p=0.048	145 (100-420) p=0.671	46 (33-61) p=0.426	12600 (10750-15200) p=0.633	3200 (2100-4900) p=0.264	7200 (5650-9550) p=0.614	5 (2-12) p=0.750
Length of hospital stay > 7 days								
Yes	16	341 (204-559)	175 (108-348)	45 (37-47)	12650 (11875-15975)	4500 (2475-5325)	8400 (5775-10400)	5 (2-9)
No	20	358 (200-480) p=0.679	103 (43-203) p=0.108	39 (29-57) p=0.671	12100 (9075-13250) p=0.108	3800 (2750-5075) p=0.762	6450 (4575-8250) p=0.161	3 (2-12) p=0.962
NRL symptoms ≥ 30 days ^b								
Yes	3	438	50	45	17400	4700	9600	6
No	33	334 (174-529) p=0.317	145 (63-295) p=0.097	40 (31-55) p=0.841	12200 (9550-14600) p=0.052	3800 (2450-5350) p=0.242	7100 (4550-8900) p=0.241	5 (2-10) p=0.442

CSF, cerebrospinal fluid; WBC, white blood cell; MRI, magnetic resonance imaging; NRL, neurologic.
 Differences were considered significant at p<0.05 and these values are listed in bold type.
^a Median (p25-p75).
^b The three patients with clinical diagnosis of encephalomyelitis following the WHO definition were the same three patients with persistence of neurological symptoms with significant disability at day 30.

4



5.3.1 Resum del tercer article

Es tracta d'un estudi observacional prospectiu en el que es van incloure els pacients pediàtrics amb diagnòstic d'encefalitis de tronc i encefalomièlitis, amb detecció d'EV en alguna mostra i absència d'altra etiologia plausible entre abril de 2016 i març de 2017. Es van incloure els pacients amb mostra de LCR disponible i suficient per a la determinació de neopterina. Es van recollir dades clíniques, analítiques, radiològiques i microbiològiques. Les principals variables considerades per estimar la severitat van ser: diagnòstic d'encefalomièlitis, presència de lesions i lesions extenses (> 2 àrees afectades) a la RM cerebral i medul·lar, durada de l'estada hospitalària > 7 dies i persistència de símptomes neurològics amb discapacitat significativa als 30 dies. Es va realitzar una real-time RT-PCR PAN EV d'elaboració pròpia en plasma i LCR en tots els pacients. En cas de resultat negatiu, també es va realitzar en aspirat nasofaringi i mostra de femtes. Es va realitzar la tipificació a la Unitat d'EV del Centre Nacional de Microbiologia. Es van recollir cultius bacterians i es va realitzar real-time PCR per a VHS-1 i 2 en LCR. A més de la determinació de neopterina, es van analitzar altres paràmetres inflamatoris per tal de poder comparar els resultats (leucòcits i proteïnes en LCR; leucòcits, limfòcits i neutròfils en sang, proteïna C reactiva en plasma). Es va realitzar RM cerebral i medul·lar en els pacients amb encefalitis de tronc o encefalomièlitis, excepte milloria ràpida.

La determinació de neopterina en LCR es va realitzar en el Laboratori de Malalties Metabòliques Hereditàries de l'Hospital Sant Joan de Déu, que és referència a l'estat per l'estudi de patologies neurometabòliques.

Els resultats d'aquest tercer estudi són:

1. Característiques epidemiològiques i microbiològiques:

1.1. Van ingressar seixanta pacients amb encefalitis de tronc o encefalomièlitis i detecció d'EV durant el període d'estudi. Es van excloure vuit pacients perquè la punció lumbar es va realitzar en un altre centre, sense seguir les normes de conservació adequades, i setze pacients perquè la mostra de LCR

era insuficient per a la determinació de neopterina. Finalment, trenta-sis pacients van ser inclosos en l'estudi.

1.2. L'edat mitjana va ser de 2,2 anys (RIQ d'1,5 a 2,7 anys) i vint-i-un (58%) eren homes.

1.3. Seguint les definicions de l'OMS¹⁰¹, trenta-tres (92%) van presentar encefalitis de tronc i tres (8%) encefalomièlitis.

1.4. Es va poder tipificar una de les mostres positives per a EV en vint-i-set dels pacients inclosos. L'EV-A71 va ser el genotip més freqüent (25/27). En dos pacients es va trobar un EV de l'espècie A, però no es va poder identificar el genotip. El grup de pacients en que es va poder tipificar l'EV-A71 era comparable amb la resta de la cohort.

2. Troballes analítiques i radiològiques:

2.1. Es va realitzar RM cerebral i medul·lar a vint-i-vuit pacients, dels quals divuit (64%) van presentar alteracions.

2.2. Els nivells de neopterina en LCR van resultar elevats en 33/36 pacients (92%), amb una mitjana de 347 nmol/L (RIQ de 204 a 525 nmol/L).

3. Variables associades amb malaltia greu:

3.1. Nivells de neopterina en LCR més elevats es van correlacionar amb la presència de lesions a la RM. L'àrea sota la corba (AUC) va ser 0,76 (índex de confiança del 95% [IC 95%]:0,56-0,96; p=0,027). El valor llindar amb major sensibilitat i especificitat va ser > 94 nmol/L. El valor predictiu positiu va ser 78% i el valor predictiu negatiu va ser 100%.

3.2. Nivells de neopterina en LCR més elevats es van correlacionar amb la presència de lesions extenses a la RM. L'AUC va ser 0,76 (IC 95%:0,55-0,96;

$p=0,047$). El valor llindar amb major sensibilitat i especificitat va ser > 360 nmol/L. El valor predictiu positiu va ser 46% i el valor predictiu negatiu va ser 88%.

3.3. Els tres pacients amb encefalomièlitis va presentar discapacitat significativa el dia 30 (i persistència de lesions radiològiques als 12 mesos). La mitjana de nivells de neopterina en LCR va ser més elevada en aquest grup de pacients, però les diferències no van resultar estadísticament significatives.

3.4. Pel que fa a potencials variables confusores, no es va trobar cap associació significativa entre els nivells de neopterina en LCR i el sexe o l'edat. Els nivells de neopterina en LCR van presentar un pic en torn al quart-cinquè dia de febre i un descens posterior. El temps de demora en realitzar la punció lumbar no es va correlacionar amb la presència de lesions o lesions extenses a la RM ($p=0,28$).

3.5. La resta de marcadors inflamatoris no es van correlacionar amb les variables de gravetat.

5.4 Quart article

Extreme Hyperferritinemia in Dizygotic Twins With Human Parechovirus-3 Infection.

Casas-Alba D, Martínez-Monseny A, Monfort L, Muñoz-Almagro C, Cabrerizo M, Deyà À, Launes C.

Article publicat a:

Pediatr Infect Dis J. 2016 Des; 35 (12): 1366-1368.

- rods. In: Jorgensen J, Pfaller M, Carroll K, et al. eds. *Manual of Clinical Microbiology*. 11th ed. Washington, DC: ASM Press; 2015: 652–666.
- Wang TK, Wong SS. Streptobacillus moniliformis septic arthritis: a clinical entity distinct from rat-bite fever? *BMC Infect Dis*. 2007;7:56.
 - Graves MH, Janda JM. Rat-bite fever (Streptobacillus moniliformis): a potential emerging disease. *Int J Infect Dis*. 2001;5:151–155.
 - Rumley RL, Patrone NA, White L. Rat-bite fever as a cause of septic arthritis: a diagnostic dilemma. *Ann Rheum Dis*. 1992;51:411–412.
 - Anderson D, Marrie TJ. Septic arthritis due to Streptobacillus moniliformis. *Arthritis Rheum*. 1987;30:229–230.
 - Hagelskjaer L, Sorensen I, Randers E. Streptobacillus moniliformis infection: 2 cases and a literature review. *Scand J Infect Dis*. 1998;30:309–311.

EXTREME HYPERFERRITINEMIA IN DIZYGOTIC TWINS WITH HUMAN PARECHOVIRUS-3 INFECTION

Didac Casas-Alba, MD,* Antonio Martínez-Monseny, MD,* Laura Monfort, MD,* Carmen Muñoz-Almagro, MD, PhD,†‡,§ Maria Cabrerizo, PhD,§ Ángela Deyà, MD, PhD,¶ and Cristian Launes, MD, PhD*‡

Abstract: Human parechovirus-3 has been associated with severe clinical manifestations in infants, such as sepsis-like illness and meningoencephalitis. Nevertheless, the vast majority of patients have a favorable outcome. We report the occurrence of this infection in dizygotic infants with extreme hyperferritinemia and a transient impairment of natural killer cell cytotoxicity.

Key Words: human parechovirus-3, hyperferritinemia, hemophagocytic lymphohistiocytosis

Accepted for publication May 19, 2016.

From the *Pediatrics Department, and †Molecular Microbiology Department, Hospital Sant Joan de Deu, University of Barcelona, Barcelona, Spain; ‡Pediatric Infectious Diseases Research Group, Institut de Recerca Pediàtrica Hospital Sant Joan de Déu, Barcelona, Spain; CIBER Epidemiología y Salud Pública CIBERESP, Health Institute “Carlos III”, Madrid, Spain; §Enterovirus Unit, National Centre for Microbiology, Health Institute “Carlos III”, Madrid, Spain; and ¶Allergy and Clinical Immunology Department, Hospital Sant Joan de Deu, University of Barcelona, Barcelona, Spain. This study was partially supported by a grant from the Spanish National Health Institute (grant number PI12-00904).

The authors have no other conflicts of interest to disclose.

Address for correspondence: Cristian Launes, MD, PhD, Pediatrics Department, Pediatric Infectious Diseases Research Group, University Hospital Sant Joan de Deu, Pº Sant Joan de Déu, 2, 08950 Esplugues, Barcelona, Spain. E-mail: claunes@hsjdbn.org.

Copyright © 2016 Wolters Kluwer Health, Inc. All rights reserved.

DOI: 10.1097/INF.0000000000001333

Human parechoviruses (HPeVs) are members of the *Parechovirus* genus of the *Picornaviridae* family, which includes important pathogens, such as rhinoviruses and enteroviruses, among others. Human parechoviruses replicate mainly in intestinal cells and are transmitted by the fecal-oral route, although the respiratory route has also been described.¹ Human parechovirus infections typically target infants less than 2 years old and are associated with mild gastrointestinal and respiratory symptoms.² Current knowledge suggests that HPeV may be an important cause of fever without source in young infants too. Currently, 16 types of HPeV have been described. The most predominant type is HPeV-1 followed by HPeV-3.¹ Human parechovirus-1 rarely causes severe symptoms, but HPeV-3 has been associated more often with severe clinical manifestations in infants <3 months of age, such as sepsis-like illness, meningoencephalitis^{3,4} and hemophagocytic lymphohistiocytosis (HLH)-like

illness.⁵ Human parechovirus-3 has also been linked to white matter injury and neurological sequelae,⁶ but the vast majority of patients have a favorable outcome.³ Human parechovirus-3-specific diagnostic assays are not routinely available in most clinical practice settings; therefore, the real HPeV-3 incidence may be underestimated.¹

The article reports the occurrence of HPeV-3 infection in dizygotic twin infants with extremely high values of ferritin. Both had a benign and self-limited course of the disease despite this alarming analytical feature, which is often linked to severe hypercytokinemia and HLH.⁷

CASE REPORT

In July 2015, case 1, a 35-day-old male attended the Emergency Department of our institution with fever and irritability for the last 12 hours. He had a dizygotic twin, and they were born at the 38th week of gestation. Personal and family history was unremarkable. He had an axillary body temperature of 38.9°C. Physical examination showed no other abnormal findings. Low risk for invasive bacterial infection was estimated according to laboratory tests (Table 1). Blood and urine cultures were obtained, and the infant was hospitalized without antibiotic treatment while awaiting culture results.

Fever and irritability persisted, together with insidious skin changes that became more apparent on hospital day 4. On physical examination, an erythematous rash on palms, soles, upper chest and mild livedo reticularis were noted. He developed peripheral edema and minor abdominal distension. Because of the persistence of fever, a more extensive panel of serum assays was obtained. It showed leukopenia, elevation of alanine aminotransferase, aspartate aminotransferase (AST), lactate dehydrogenase (LDH) and extreme hyperferritinemia (26,890 µg/L), with normal C-reactive protein (CRP; Table 1). There was neither hepatomegaly nor splenomegaly and other HLH-2004 diagnostic analytical criteria were not fulfilled (cytopenias affecting at least 2 lineages in the peripheral blood or hypertriglyceridemia/hypofibrinogenemia).⁸ Blood and urine cultures revealed no bacterial growth. Hepatotropic virus (hepatitis B virus, hepatitis C virus, Epstein Barr virus and cytomegalovirus), parvovirus-B19 and enterovirus infections were excluded by the absence of detection of the viral genome using several real-time polymerase chain reaction assays in blood samples. Adenovirus was also negative by antigen detection in nasal swab. Bearing in mind the dermatologic and laboratory findings with high ferritin values, we considered HPeV-3 infection. Therefore, blood and pharyngeal swab samples were sent to the Spanish National Centre for Microbiology in Majadahonda (Madrid) for HPeV testing using a real-time polymerase chain reaction previously described.⁹ The high hyperferritinemia was followed, along with laboratory parameters related to HLH, while the patient remained febrile. We observed an increase of ferritin level up to 31,679 µg/L and hypertriglyceridemia (215 mg/dL, reference range 64–161, HLH-2004 diagnostic criteria >265), but complete blood count remained normal, and no hepatosplenomegaly was found. A complete immunologic evaluation for HLH was performed revealing an elevation of soluble interleukin-2 receptor (sIL2R/sCD25; 1659 IU/mL, reference range <1000 IU/mL, HLH-2004 diagnostic criteria >2400 IU/mL) and a natural killer (NK) function test was ordered. To assess the NK cell cytotoxicity, peripheral blood mononuclear cells containing NK cells were isolated and co-cultured with target cell K562 until an effector:target cell ratio of 50:1. Samples were analyzed by flow cytometry on a BD FACSCanto. The target cell killing was below 10% in all cultures; values far below the control activity. This result was reported after the patient started to improve at day 6 of hospital admission without specific treatment, remaining afebrile since then. Cranial and abdominal ultrasounds were normal. He was discharged on hospital

TABLE 1. Main Laboratory Data of 2 Heterozygotic Twins With HPeV-3 Infection

	Reference Range	Case 1		Case 2	
		On Admission	Day 4*	On Admission	Day 4*
Hemoglobin (g/dL)	9–13.5	10.3	10.2	10.8	11.2
Platelets (× 10 ⁹ /L)	150–500	380	247	492	369
WBC count (× 10 ⁹ /L)	7.5–13.5	4	5.5	3.1	9.5
Segmented neutrophil count (× 10 ⁹ /L)	1.5–5	1.5	1.1	1.9	7
Banded neutrophil count (× 10 ⁹ /L)	0–0.5	0.1	0.1	–	0
Lymphocyte count (× 10 ⁹ /L)	1.5–5	2.1	4.1	0.8	1.8
C-reactive protein (mg/L)	<15	19.8	1.5	11	–
Procalcitonin (ng/mL)	<0.5	0.22	–	0.12	–
Ferritin (µg/L)	10–200	–	31,679	672	47,710
Transferrin (mg/L)	1800–3500	–	874	1611	1255
LDH (IU/L)	<776	–	3179	–	3815
Triglycerides (mg/dL)	94–161	–	131	–	270
Fibrinogen (g/L)	1.5–3.5	–	2.2	–	2.9
ALT (IU/L)	2–37	–	116	15	298
AST (IU/L)	3–63	–	528	34	1008
Quick prothrombin time (%)	80–120	–	110	–	117
Total bilirubin (mg/dL)	0.2–1	–	0.2	–	–

ALT indicates alanine aminotransferase; AST, aspartate aminotransferase; LDH, lactate dehydrogenase; WBC, white blood cell.
*After the onset of fever.

day 9 with a ferritin that had decreased to 3141 µg/L and completely asymptomatic. All the abnormal laboratory values normalized 6 weeks later. NK cell cytotoxicity was repeated a month later, being normal, with a normal expression of perforin and NK-cell degranulation assay with normal results too.

Four days after the admission of case 1, his heterozygotic twin, case 2, a 38-day-old female attended the Emergency Department with similar symptoms. Personal history was noncontributory. Clinical and analytical data at admission were similar to case 1 (Table 1). She was also hospitalized without antibiotic treatment while awaiting culture results. Rash appeared at day 4 too, as well as abdominal distension. Blood and pharyngeal swab samples were obtained for HPeV detection. Considering that the highest values of ferritin in HPeV-3 infection had been reported on the 4th or 5th days of fever,¹⁰ we performed a blood test that showed elevation of alanine aminotransferase, AST and LDH and marked hyperferritinemia (47,710 µg/L). She also had hypertriglyceridemia (270 mg/dL). Cranial ultrasound was normal. No specific treatment was initiated. On hospital day 5, fever and irritability resolved. She was discharged on hospital day 6 with a decreasing ferritin and totally asymptomatic, with outpatient follow-up during the next days.

Human parechovirus RNA was positive in blood and pharyngeal swab samples of both cases. Molecular typing was carried out by VP3/VP1 amplification and sequencing. Three of the 4 HPeV-positive samples were typed as HPeV-3. One sample (pharyngeal swab) could not be typed because of the low viral load. A posthospitalization follow-up was performed, and patients were fully recovered and asymptomatic.

DISCUSSION

Herein we report 2 infants with a persistent febrile disease and severe hyperferritinemia, which could not be ascribed to the development of an HLH, but to an infection by HPeV-3. As it is reported in this article, HPeV-3 illness frequently begins with fever and irritability. Fever lasts a mean of 3 days. A palmar-plantar erythema that appears 3–5 days after fever onset, and abdominal distension with navel protrusion may be considered a diagnostic clue to HPeV-3 infection,¹⁵ although these aspects are not consistent across all reports. Other skin manifestations are rash in trunk and axillary area, livedo reticularis and peripheral edema.^{3,5} Laboratory findings

such as elevated ferritin levels and decreased leukocyte and platelet counts are other described features of HPeV-3 infection.¹⁰ C-reactive protein is not significantly elevated.⁵ Hypertriglyceridemia, elevated sIL2R and mild AST elevation have been reported in a few cases.⁵

We report the highest values of ferritin found in patients with HPeV-3 infection compared with previously published literature.^{3,5,10,11} After finding such an extraordinary hyperferritinemia in a pair of heterozygotic twins with fever without a source, we initially suspected viral sepsis-like illness and, with the distal rash and abdominal distension, HPeV-3 infection specifically. Despite the major immune system activation suggested by the analytical data, our approach was conservative because patients were not in bad general state, and they did not meet specific criteria for HLH.⁸ We want to underline that their illness showed a benign and self-limiting course, and no severe systemic symptoms were noted. Hemophagocytic lymphohistiocytosis is a challenging condition because of its nonspecific clinical presentation, bad outcome without treatment and toxicity of chemotherapy. Taking into account the need of a prompt treatment, Allen et al⁷ emphasized the importance of hyperferritinemia as a marker of HLH in the acute setting. This idea has led some authors to initiate corticoids and/or cyclosporine in infants with incomplete HLH criteria, a condition defined as HLH-like illness.^{5,10} However, one case of complete HLH because of HPeV-3 infection has been described.¹¹ As it has been noted by Castillo et al,⁸ the International Histiocyte Society has broadened its diagnostic criteria, and there is significant overlap between HLH, sepsis, systemic inflammatory response syndrome, multiorgan dysfunction syndrome and macrophage activation syndrome. Thus, extreme caution has to be exercised in applying HLH therapies. For instance, Shiota et al¹² reported a group of febrile infants with transitory hyperferritinemia, elevated LDH, triglycerides and sIL2R, which normalized within 3 weeks without immunosuppressive therapy. Macrophage activation triggered by viral infections through overresponse of the Toll-like receptor signaling pathway is the proposed pathogenesis of transient hyperferritinemia, but the exact mechanisms for HPeV-3 recognition by innate immunity system and its inhibition are unknown. We report for the first time a transient NK cytotoxicity impairment coinciding with HPeV-3 infection, excluding the only known case of complete HLH described.¹¹ Molecular identification of an HLH-associated gene mutation was not performed because the clinical course was

inconsistent with HLH diagnosis, and the NK cell cytotoxicity function was fully recovered after the viral infection. In our opinion, long follow-up of these and other similar cases is needed in order to detect severe manifestations with any other new febrile episode. However, hepatotoxicity by direct viral damage or immune-mediated damage has also been described in HPeV-3 infection, and it could also contribute to high ferritin levels.³

Allen et al⁷ described main causes of extreme hyperferritinemia (>10,000 µg/L) in pediatric patients. Besides HLH and HLH-like syndromes triggered by viral infections (herpesviruses chiefly), congenital hemochromatosis, other causes of liver failure and iron overload because of multiple transfusions have been related to such extreme ferritin values in neonates and very young infants.

Finally, we want to remark that HPeV-3 infection could be the most common cause of meningoencephalitis in infants <90-day old and mortality and sequelae are uncommon.⁴ Sequelae are correlated with the severity of white matter abnormalities in brain ultrasound or magnetic resonance imaging.⁶ In our cases, we did not observe neither neurologic symptoms nor changes in brain ultrasound. We feel that the need of long-term follow-up in neonates and young infants with HPeV-3 infection without seizures or other neurologic symptoms is yet to be defined.

ACKNOWLEDGMENTS

To the Immunology Division of the Department of Cell Biology, Physiology and Immunology of the Vall d'Hebron University Hospital (Barcelona) for their support in determining natural killer (NK) cell cytotoxic activity.

REFERENCES

- Esposito S, Rahamat-Langendoen J, Ascolese B, et al. Pediatric parechovirus infections. *J Clin Virol*. 2014;60:84–89.
- Harvala H, Wolthers KC, Simmonds P. Parechoviruses in children: understanding a new infection. *Curr Opin Infect Dis*. 2010;23:224–230.
- Khatami A, McMullan BJ, Webber M, et al. Sepsis-like disease in infants due to human parechovirus type 3 during an outbreak in Australia. *Clin Infect Dis*. 2015;60:228–236.
- Renaud C, Harrison CJ. Human parechovirus 3: the most common viral cause of meningoencephalitis in young infants. *Infect Dis Clin North Am*. 2015;29:415–428.
- Yuzurihara SS, Ao K, Hara T, et al. Human parechovirus-3 infection in nine neonates and infants presenting symptoms of hemophagocytic lymphohistiocytosis. *J Infect Chemother*. 2013;19:144–148.
- Verboon-Macolek MA, Groenendaal F, Hahn CD, et al. Human parechovirus causes encephalitis with white matter injury in neonates. *Ann Neurol*. 2008;64:266–273.
- Allen CE, Yu X, Kozinetz CA, et al. Highly elevated ferritin levels and the diagnosis of hemophagocytic lymphohistiocytosis. *Pediatr Blood Cancer*. 2008;50:1227–1235.
- Castillo L, Carcillo J. Secondary hemophagocytic lymphohistiocytosis and severe sepsis/ systemic inflammatory response syndrome/multiorgan dysfunction syndrome/macrophage activation syndrome share common intermediate phenotypes on a spectrum of inflammation. *Pediatr Crit Care Med*. 2009;10:387–392.
- Cabrero M, Calvo C, Rabella N, et al; study group of Enterovirus and parechovirus infections in children under 3 years-old, Spain (PI12-00904). Design and validation of a real-time RT-PCR for the simultaneous detection of enteroviruses and parechoviruses in clinical samples. *J Virol Methods*. 2014;208:125–128.
- Hara S, Kawada J, Kawano Y, et al. Hyperferritinemia in neonatal and infantile human parechovirus-3 infection in comparison with other infectious diseases. *J Infect Chemother*. 2014;20:15–19.
- Aviner S, Sofer D, Shulman LM, et al. Hemophagocytic lymphohistiocytosis associated with parechovirus 3 infection. *J Pediatr Hematol Oncol*. 2014;36:e251–e253.
- Shiota M, Kumakura A, Mizumoto H, et al. Depressed levels of interferon-gamma and HLA-DR+CD3+ T cells in infants with transient hyperferritinemia. *Pediatr Hematol Oncol*. 2011;28:209–216.

BRUCELLAR AORTITIS AND MENINGOENCEPHALITIS IN AN ADOLESCENT

Gulsum Iclal Bayhan,* Ibrahim Ece,† and Ahmet Faik Oner‡

Abstract: Brucellosis can affect any organ system and result in possible complications. We present an adolescent male who had brucellar aortitis and meningitis simultaneously. Brucellar aortic involvement is a rare complication of brucellosis and can occur without concomitant endocarditis. Here, the patient was managed with prolonged antibiotic therapy without any surgery.

Key Words: brucellosis, endocarditis, meningoencephalitis

Accepted for publication May 31, 2016.

From the *Department of Pediatric Infectious Disease, †Department of Cardiology, and ‡Department of General Pediatrics, Yuzuncu Yil University Medical Faculty, Van, Turkey.

The authors have no funding or conflicts of interest to disclose.

Address for correspondence: Gulsum Iclal Bayhan, Yuzuncu Yil University, Medical Faculty, Dursun Odabas Medical Center, Van, Turkey. E-mail: gibayhan@gmail.com.

Copyright © 2016 Wolters Kluwer Health, Inc. All rights reserved.

DOI: 10.1097/INF.0000000000001260

Brucellosis is still highly endemic and causes high morbidity in Turkey. Brucellosis may involve any organ system and can lead to several complications. Of these, meningitis and endocarditis are the most serious. Cardiovascular complications including endocarditis, myocarditis, pericarditis and arteritis occur in less than 2% of the patients with brucellosis. Endocarditis because of *Brucella* spp. accounts for a majority of the deaths related to brucellosis.¹ We report an adolescent male with brucellar aortitis and meningoencephalitis.

CASE

A 12-year-old boy with headache and difficulty in walking was referred to our hospital. The patient's history revealed aggressive behavior, constant talking and cursing, and poor sleep for 1 month. Additionally, he had fever, headache, knee pain and could not walk without assistance for 10 days. The patient and his family were involved with animal husbandry, and they reared sheep, goats and cattle; they sold milk and ate dairy products. The patient consumed unpasteurized dairy products. Further, his mother had a history of brucellosis. On physical examination, he was sluggish and appeared pale. He smiled constantly, which was incompatible with his health. He had a grade 3/6 cardiac murmur and neck stiffness with positive Kernig and Brudzinski signs. No spinal tenderness was observed. Laboratory-based tests revealed hemoglobin value of 10.9 g/dL (11–18 g/dL), white blood cell count of 6000/mm³ (4000–11,000/mm³), platelet count of 206,000/mm³ (150,000–400,000/mm³), C-reactive protein of 142 mg/L (0–5 mg/L) and erythrocyte sedimentation rate of 10 mm/h (1–20 mm/h). Anti-HIV enzyme-linked immunosorbent assay test was negative. Cerebrospinal fluid (CSF) examination revealed slightly cloudy fluid with white blood cell count of 200/mm³ (counted by using Thoma counting chamber) with 55% lymphocytes, 45% polymorphonuclear leukocytes, protein of 88 mg/dL (20–40 mg/dL) and glucose of 34 mg/dL (45–80 mg/dL). No bacteria were observed on Gram-stained smear of the CSF. The other laboratory-based findings were within the normal ranges. Transthoracic echocardiography revealed hyperechoic structures moving in the ascending aorta (Fig. 1). The patient was hospitalized and diagnosed with infective endocarditis

5.4.1 Resum del quart article

Durant el període 2015-2018, només vam detectar quatre pacients amb infecció per HPeV. El quart estudi és un article a propòsit de dos casos que descriu la infecció per HPeV-3 en dos bessons dizigòtics amb valors extremadament elevats de ferritina en plasma. Tot i que aquesta troballa freqüentment s'associa amb hipercitoquinèmia i limfocitòsi hemofagocítica, aquest no va ser el cas d'aquests pacients, doncs ambdós van presentar un curs benigne i autolimitat. Els altres dos pacients amb infecció per HPeV, no inclosos en aquest article, van presentar un quadre clínic típic¹³⁵.

Els resultats d'aquest quart estudi són:

1.1. Ambdós pacients, bessons dizigòtics, van ser portats a urgències amb 1 mes de vida per febre i irritabilitat de curta evolució. L'exploració física inicial era normal i els resultats analítics de sang i orina van mostrar baix risc d'infecció bacteriana potencialment greu.

1.2. El quart dia, persistien la febre i la irritabilitat i resultaven evidents una sèrie de troballes a l'exploració física que havien aparegut de forma progressiva: exantema eritematós a palmes, plantes i tòrax superior, cutis reticular lleu, edema perifèric i distensió abdominal.

1.3. Es van realitzar analítiques sanguínies successives que van mostrar leucopènia, hiperglicèridèmia i hiperferritinèmia extrema (màxima de 31.679 µg/L i 41.710 µg/L). En el primer cas, també es va observar elevació dels nivells de receptor soluble d'interleuquina 2 i disfunció NK.

1.4. El sisè dia va desaparèixer la febre i van presentar una milloria progressiva, sense haver administrat cap tractament específic. Tots els valors analítics es van normalitzar en el seguiment post-alta.

1.5. No van presentar hepato-esplenomegàlia i no es van complir els criteris de HLH-2004¹⁷⁰. Els cultius bacterians van resultar negatius. Es va descartar la infecció per virus hepatotrops, parvovirus B19, EV i adenovirus. Davant la sospita d'infecció per HPeV-3, es van recollir mostres de sang i aspirat nasofaringi i es van tipificar al Centre Nacional de Microbiologia (Institut de Salut Carles III).

1.6. Es va detectar HPeV en mostres de sang i aspirat nasofaringi d'ambdós casos. L'amplificació de la regió VP3/VP1 i seqüenciació de l'amplicó va identificar el genotip HPeV-3.

6 DISCUSSIÓ

6 DISCUSSIÓ

6.1 Brot d'encefalitis de tronc per EV-A71 (2016)

Els resultats del primer i segon article descriuen el brot d'encefalitis de tronc associat amb EV-A71 que va iniciar-se a Catalunya i va estendre's a la resta d'Espanya l'any 2016. En el nostre medi mai no s'havia descrit un brot d'infecció per EV amb aquestes característiques clíniques. Abans del brot d'encefalitis de tronc l'any 2016, Espanya era un dels països que havia comunicat la circulació d'EV-A71, si bé la intensitat era baixa i la simptomatologia associada era exclusivament lleu¹³. Es tracta doncs d'un patogen emergent en el nostre medi.

Aquests resultats són fruit del programa de vigilància d'EV, que tal i com s'ha exposat al llarg de la introducció és un dels sistemes complementaris acceptats per a intensificar la vigilància epidemiològica de la poliomièlitis⁶. En un escenari on l'amenaça de la poliomièlitis tot i minvar encara està present, cobra especial rellevància la vigilància d'altres patologies neurològiques i sistèmiques produïdes per ENP que també són causa important de morbiditat i mortalitat, com l'encefalitis de tronc per EV-A71.

6.1.1 Identificació de l'agent causal i demostració de neuroinfecció

Tal i com s'ha exposat en la secció de resultats, en l'estudi de pacients amb encefalitis de tronc mitjançant real-time RT-PCR es va observar baixa taxa de detecció d'EV en mostres invasives i alta taxa de detecció en mostres no invasives. En un pacient aïllat, la detecció d'EV en una mostra no invasiva no és criteri suficient per a establir la causalitat, ja que no es pot descartar l'estat de portador asimptomàtic. Segons la literatura prèvia, la taxa de detecció d'EV-A71 en LCR és de 0-5% mitjançant tècniques convencionals^{105,171}. És remarcable la similitud amb la poliomièlitis, on s'havia descrit una taxa de detecció en LCR de fins al 6%¹⁷². En el cas de l'EV-D68, la detecció en LCR és molt inferior, tot i que hi ha alguns casos descrits⁵⁵. Com a conseqüència, en brots previs d'EV-A71 i EV-D68 s'ha especulat que les manifestacions neurològiques podrien ser

secundàries a un mecanisme parainfecció o a coinfecció, més que a un efecte directe del virus.

El segon article que es presenta en aquesta Memòria de Tesi té el valor de confirmar la sospita que l'EV era l'agent causal del brot. En primer lloc, es presenten 20 pacients amb encefalitis de tronc, amb troballes clíniques i radiològiques típiques, en els quals es detecta EV mitjançant real-time RT-PCR en mostres no invasives en 20/20 (100%). En segon lloc, es detecta EV mitjançant PCR niada múltiple en LCR en 4/20 (20%), en uns casos que són clínica i radiològicament indistinguibles de la resta, reforçant la hipòtesi de la neuroinfecció. En tercer lloc, es descarta la coinfecció bacteriana i viral en aquests pacients. En quart i últim lloc, en aquest article ja s'indica que l'únic genotip identificat mitjançant amplificació de la regió VP1 i seqüenciació Sanger de l'amplicó en aquest grup de pacients amb encefalitis de tronc va ser l'EV-A71. A partir de l'experiència dels nostres resultats, considerem que el FA-M/E panel va ser una tècnica d'especial utilitat en l'abordatge diagnòstic inicial del brot, essent aquesta una estratègia que podria ser replicable en altres àmbits, o bé en casos aïllats.

El FA-M/E panel va detectar EV en LCR en 4/20 pacients amb encefalitis de tronc, en que la real-time RT-PCR havia resultat negativa. S'ha plantejat la hipòtesi que la baixa taxa de detecció de l'EV-A71 en LCR podria ser deguda a disminució ràpida de la càrrega viral en LCR després de la infecció¹⁷³. En la nostra sèrie, en el grup de pacients amb resultat positiu per a EV en LCR, la demora en l'obtenció del LCR respecte l'inici de la clínica va ser menor que en la resta, però les diferències no van ser estadísticament significatives. Tampoc no van observar-se diferències en la gravetat clínica. També s'ha plantejat la hipòtesi que la baixa detecció en LCR podria ser deguda a baixa càrrega viral¹⁷³. Hipotetitzem que els resultats de la nostra sèrie s'expliquen perquè el FA-M/E panel podria ser més sensible per a la detecció de càrregues virals baixes que les tècniques de real-time RT-PCR. En un estudi que analitzava la taxa de detecció d'EV (de diferents genotips) en LCR, la RT-PCR niada va resultar positiva en 25/105 casos, mentre que la real-time RT-PCR va resultar positiva en 14/105 casos¹⁷⁴. En un cas aïllat amb encefalitis de tronc per EV-A71, s'ha

reportat la positivitat de la RT-PCR niada en LCR, essent la real-time RT-PCR negativa¹⁷⁵. La mNGS clínica amb plataforma Illumina® també ha demostrat augmentar la taxa de detecció d'EV-A71 en LCR en l'encefalitis de tronc respecte la real-time RT-PCR¹⁷⁶. En aquest estudi també es va observar una baixa càrrega viral de l'EV-A71 en LCR¹⁷⁶.

Pel que fa a coinfecció per altres gèrmens, el FA-M/E panel només va detectar VHH-6 en 3 pacients amb encefalitis de tronc, negatius per a EV en LCR. El curs clínic d'aquests pacients va ser similar a la resta, no van presentar signes característics d'infecció per HHV-6 i es va descartar la presència de HHV-6 en aspirat nasofaringi i mostra de femtes, per la qual cosa es van interpretar els resultat com a latència viral en LCR. Pocs estudis han analitzat la coinfecció per altres gèrmens en l'encefalitis de tronc per EV-A71, tot i que és un fet conegut en la vigilància d'EV que diferents genotips i subgenotips co-circulen en un mateix període i àrea geogràfica, per la qual cosa és plausible la coinfecció per diferents EV¹³. En aquesta línia, destaca un estudi realitzat a Xina l'any 2012 en 99 pacients amb MBMP (de gravetat variable), en que es van realitzar cultius en diferents línies cel·lulars, identificant-se coinfecció per diferents genotips d'EV en 6 pacients¹⁷⁷. La mNGS clínica amb plataforma Illumina® ha demostrat ser més sensible en aquest àmbit, detectant coinfecció per altres virus en 3/10 pacients amb encefalitis de tronc per EV-A71 (un CVB a aspirat nasofaringi, un E-30 a aspirat nasofaringi i un VHH-7 a LCR)¹⁷⁶.

L'anàlisi de les dades de seqüenciació Sanger de la regió 3' de l'amplicó VP1 va mostrar que la majoria de soques d'EV-A71 pertanyien al subgenotip C1. Aquests resultats es van poder replicar en el cinquè article inclòs en l'annex, un estudi observacional prospectiu multicèntric desenvolupat a Espanya i Andorra i coordinat per la Unitat d'EV del Centre Nacional de Microbiologia, en que l'Hospital Sant Joan de Déu va tenir una participació destacada¹⁷⁸. En aquest estudi es va utilitzar l'anàlisi de les dades de seqüenciació Sanger de la regió 3' de l'amplicó VP1 i l'anàlisi de la regió 3Dpol¹⁷⁸. També es va arribar a la mateixa conclusió mitjançant la mNGS clínica amb plataforma Illumina®, a partir de la seqüenciació del genoma complet¹⁷⁶. A més, es va descartar la presència de

polimorfismes d'un sol nucleòtid no sinònims associats amb neurovirulència augmentada¹⁷⁶.

A més, una minoria de soques d'EV-A71 pertanyien al subgenotip C2. En la vigilància d'EV és freqüent que diferents genotips i subgenotips co-circulin en un mateix període i àrea geogràfica¹³. La distribució geogràfica i temporal dels subgenotips d'EV-A71 és complexa i canviant. Històricament, a Europa els subgenotips predominants són C1 i C2^{70,71}. A Espanya, abans del brot d'encefalitis de tronc l'any 2016, s'havia observat la circulació d'EV-A71 C2, si bé la intensitat era baixa i la simptomatologia associada era exclusivament lleu.

L'anàlisi filogenètica va mostrar que la soca d'EV-A71 C1 no s'havia identificat mai abans a Espanya, sinó que formava una subclasse de la soca variant alemanya detectada l'any 2015^{13,72,169}. Aquests resultats també s'han replicat en altres estudis^{176,179}. Durant l'any 2015 a Alemanya, el sistema de vigilància d'EV va detectar la soca variant d'EV-A71 C1 en 19 pacients⁷². La informació clínica relativa a aquests pacients és escassa, però se sap que la majoria eren menors de 5 anys, tots van ser hospitalitzats i van presentar febre, vòmits, rigidesa meníngia, mioclònies, atàxia, petèquies i enanemes, en diferents combinacions⁷². El cas més ben descrit a la literatura és el d'una pacient de 2 anys amb MBMP en l'estadi de fallada cardiopulmonar¹⁶⁹. S'hipotetitzava que aquesta nova variant es va originar per recombinació, que tal i com s'ha exposat al llarg de la introducció és un fenomen clau en l'aparició de nous subgenotips d'EV-A71^{31,169}. Sospitem que aquesta nova variant es va estendre des del Nord al Sud d'Europa, doncs també es va observar de forma concomitant França¹⁷⁸. A França l'any 2016 es van reportar 21 pacients amb EV-A71 (18 pacients amb la soca variant C1), que van presentar encefalitis, encefalitis de tronc i encefalomièlitis; un d'ells va ser èxitus per fallada cardiopulmonar¹⁷⁸.

6.1.2 Característiques clíniques i radiològiques

El brot va tenir lloc durant la primavera, seguint un patró estacional similar a altres EV a Espanya¹⁸⁰. Tot i que els primers casos es van descriure a Catalunya, durant els mesos successius es van reportar casos a la resta d'Espanya¹⁷⁹. A més, un brot menys nombrós es va descriure de forma

concomitant a França¹⁷⁸. L'Agència de Salut Pública de Catalunya va dur a terme una recerca epidemiològica i no va trobar cap associació entre els primers casos que suggerís un origen comú o una connexió propera entre els casos¹⁸¹. Tanmateix, a partir d'estudis realitzats en altres àmbits se sap que alguns factors de risc per a la infecció per EV-A71 són el contacte amb altres nens del veïnat, les visites a centres sanitaris, el contacte amb aglomeracions de gent i la manca d'higiene de mans, i que l'EV-A71 presenta una alta taxa de transmissió en convivents en el domicili^{182,183}.

Els pacients tenien edat de lactant o preescolar, al igual que brots previs en altres regions⁹⁹. En la nostra sèrie, 41/57 (72%) pacients van presentar encefalitis de tronc i 3/57 (5%) encefalomièlitis, dels quals 2/57 (3,5%) van presentar disfunció autonòmica (considerant a part altres diagnòstics). És interessant contrastar aquests resultats amb brots a altres regions. Per exemple, en el brot d'Austràlia l'any 2013, es van reportar 20/57 (35%) amb encefalitis de tronc, 23/57 (40%) amb encefalomièlitis i 4/57 (7%) amb disfunció autonòmica¹¹⁹; en el brot de Taiwan l'any 1998, es van reportar 39/96 (40%) pacients amb encefalitis/encefalitis de tronc, 2/96 (2%) amb encefalomièlitis i 37/96 (39%) amb disfunció autonòmica¹⁸⁴. Probablement part de les diferències es puguin explicar per les diferències socio sanitàries i la introducció del tractament amb IGIV. Tanmateix, en la comparació entre el brot d'Austràlia l'any 2013 i el de Catalunya l'any 2016 no van haver-hi aquestes diferències, així que la menor freqüència de casos d'encefalomièlitis probablement pugui explicar-se per una menor neurovirulència de la soca causal.

Vam trobar una taxa molt baixa de pacients amb manifestacions mucocutànies, fet que va dificultar el diagnòstic inicial. Tot i que és l'excepció a la norma, hi ha antecedents de brots d'infecció per EV-A71 amb escassos símptomes mucocutanis. Per exemple, al brot d'Hongria l'any 1978 només es van descriure 4 pacients amb MBMP d'un total de 323 pacients⁶⁴. En pacients amb meningitis per EV durant el període del brot, la duració de la febre va ser més breu, la pleocitosi va ser més significativa, i la detecció d'EV en LCR va resultar positiva amb major freqüència. Tanmateix, les manifestacions neurològiques durant les primeres 24 hores eren indistingibles amb les dels

pacients amb encefalitis de tronc o encefalomièlitis. En conseqüència, els pacients amb sospita de meningitis asèptica i febre persistent són candidats a observació clínica estreta. La majoria de pacients amb encefalitis de tronc es van classificar com estadi 2b grup 2 de la classificació de Vietnam¹¹². En un estudi que descriu el brot de MBMP per EV-A71 de Vietnam l'any 2011, es va reportar que la majoria de pacients (2750/3791, 73%) es van classificar com a estadi 2a. Aquesta diferència s'explica per una modificació en la classificació de Vietnam que s'introdueix l'any 2015, en que l'atàxia passa a considerar-se un criteri de classificació 2b grup 2¹⁸⁵. Durant l'ingrés, cap pacient va progressar a disfunció autonòmica. Tanmateix, en el brot de Vietnam l'any 2011 es va reportar que fins al 22% dels pacients inicialment classificats com estadi 2b van progressar a estadi 3 o 4¹¹¹. La major accessibilitat dels serveis d'Urgències i la major precocitat en iniciar el tractament amb IGIV en el nostre àmbit podrien explicar aquestes diferències.

En la nostra sèrie, vam descriure 25/47 (53%) pacients amb alteracions a la RM cerebral, 18/47 (38%) amb alteracions a la RM medul·lar. En el brot d'Austràlia l'any 2013, es descriu una freqüència similar de pacients amb alteracions a la RM cerebral (24/38, 63%), però una major freqüència d'alteracions a la RM medul·lar (27/34, 79%), probablement en relació amb la major freqüència de pacients amb encefalomièlitis¹¹⁹. Les troballes radiològiques més freqüents van ser la presència de lesions hiperintenses en seqüències ponderades en T2, localitzades a regió dorsal del pont, bulb, mesencèfal i dentats, de forma similar al que s'ha descrit en altres estudis¹¹⁹. Vam trobar una freqüència inesperada de pacients amb símptomes lleus i alteració radiològica bulbar. En contraposició, en un estudi recent que va incloure 46 pacients amb encefalitis de tronc per EV-A71 en que es va realitzar RM, es va identificar l'alteració radiològica bulbar com la variable més associada amb gravetat clínica¹¹⁷. En el nostre medi, tot i que la principal eina per a guiar el tractament va ser la valoració clínica, també es va recomanar considerar els resultats de la RM, seguint experiències prèvies¹¹⁹. Tanmateix, en alguns pacients la RM es va realitzar de forma demorada, quan es trobaven en fase de milloria clínica, i tot i presentar alteració radiològica no es va considerar indicat el tractament. Això

limita les conclusions que es puguin establir respecte al paper de la RM per a guiar el tractament.

Pel que fa a l'administració d'IGIV, no es poden establir conclusions sobre l'empitjorament de les manifestacions neurològiques en cas de no rebre el tractament, ja que tots els pacients amb malaltia greu en van rebre i cap d'ells no va empitjorar significativament. L'ús d'IGIV és estès a la pràctica clínica i està inclòs en la guia clínica de l'OMS, però les evidències que suporten el seu benefici són febles¹⁰¹. Estudis retrospectius suggereixen que l'administració precoç d'IGIV suposa un benefici clínic¹⁰⁶. A part, l'anàlisi de citoquines abans i després de l'administració d'IGIV també mostra una reducció de diverses citoquines proinflamatòries en pacients amb disfunció autonòmica¹²⁴.

Respecte a l'administració de corticoides, en el nostre estudi la majoria de pacients van rebre el tractament després de diversos dies de símptomes i cap d'ells no va empitjorar significativament. S'hipotetitzava que podrien ser beneficiosos per analogia amb les mielitis agudes virals, i de fet se n'ha reportat l'ús en diferents brots, com per exemple el d'Austràlia l'any 2013¹¹⁹. Tanmateix, els corticoides no estan recomanats per l'OMS i estudis tant en models de ratolí com en humans indiquen que l'administració precoç (primeres 72 hores) podria ser perjudicial^{125,126}. Es requereixen més estudis per investigar sobre l'efectivitat i seguretat de les IGIV i els corticoides.

6.1.3 Variables associades amb malaltia greu

En la cohort descrita en el primer article, vuit pacients (14%) van requerir ingrés a UCIP per disminució del nivell de consciència o xoc que va precisar ventilació mecànica i inotrops. En aquesta sèrie no es va reportar cap èxitus, però durant l'any 2016 a Catalunya va haver-hi algun cas d'èxitus en que l'EV-A71 va considerar-se l'agent causal¹⁸⁶. La taxa de fatalitat per cas pot considerar-se baixa en comparació amb altres regions, on s'ha estimat una taxa de fatalitat per cas de 1,7% en la MBMP associada amb EV-A71¹⁸⁷. Aquests bons resultats podrien ser conseqüència de l'ús estès d'IGIV en el nostre medi, però no pot descartar-se que siguin atribuïbles a una menor virulència de la soca viral.

L'edat menor de 12 mesos es va associar amb fallada cardiopulmonar. Chang et al. ja havien reportat una forta correlació inversa entre l'edat d'inici i la gravetat, situant la mitjana d'edat dels pacients amb fallada cardiopulmonar entorn a 8 mesos¹¹⁵. Els pacients amb fallada cardiopulmonar van presentar valors més elevats de leucòcits en plasma. Aquesta associació també havia estat reportada prèviament per Chang et al.¹¹⁵. En la nostra sèrie, valors més elevats de procalcitonina en plasma també es van associar amb fallada cardiopulmonar, tot i no confirmar cap altra coinfecció.

El diagnòstic d'encefalomielitis (independentment de la presència de fallada cardiopulmonar) es va associar amb la presència de seqüeles amb discapacitat significativa als 30 dies. Aquest estudi dona suport a la utilització de les definicions clíniques de la guia de l'OMS per establir el risc de seqüeles, seguint l'experiència del brot d'Austràlia l'any 2013¹¹⁹, així com d'una meta-anàlisi recent que ha correlacionat la gravetat segons aquesta classificació amb el pronòstic¹¹⁶.

6.2 Neopterina en LCR en l'encefalitis de tronc per EV-A71

Els resultats presentats en el tercer article representen la primera descripció en la literatura de l'elevació de nivells de neopterina en LCR en pacients amb encefalitis de tronc per EV, essent l'EV-A71 l'únic genotip identificat en aquesta sèrie de pacients. Prèviament s'havien reportat nivells més baixos de neopterina en el LCR de pacients amb meningitis per EV (mitjana < 40 nmol/L)¹⁶⁴. Es descriu una aproximació a la cinètica de la neopterina en l'encefalitis de tronc per EV, que augmenta de forma progressiva fins al quart-cinquè dia per baixar posteriorment, cosa que s'ha de tenir en compte per interpretar els resultats.

La neopterina és un marcador d'immunitat cel·lular, i la seva elevació en LCR s'ha correlacionat amb la gravetat de diverses infeccions del SNC. En l'encefalitis herpètica, la seva elevació s'ha associat amb seqüeles neurològiques i mortalitat¹⁶⁶. Els nivells de neopterina en LCR es troben invariablement elevats en pacients amb infecció per VIH sense tractament, i augmenten a mesura que disminueixen els nivells de CD4¹⁸⁸. Els pacients amb demència per VIH presenten nivells particularment elevats, tot i que els pacients

amb infeccions oportunistes del SNC també poden presentar nivells elevats¹⁸⁸. Disminueixen després de l'inici de la teràpia antiretroviral combinada¹⁸⁸. S'han correlacionat amb la càrrega viral en LCR en pacients amb infecció per VIH, però en el cas de l'encefalitis de tronc per EV-A71 no esperàvem trobar aquesta associació, ja que el virus rarament es detecta en LCR¹⁶⁵. En el cas de la neuroborreliosi, també s'ha observat un descens dels nivells de neopterina en LCR després d'administrar el tractament antibiòtic¹⁶⁴.

Tal i com s'ha descrit al llarg de la introducció, múltiples evidències donen suport al paper etiològic de l'EV-A71 en l'encefalitis de tronc/encefalomielitis, com per exemple l'observació de degeneració neuronal, necrosi i neuronofàgia, juntament amb la identificació d'antígens i RNA virals en neurones de pacients èxits amb encefalomielitis⁷⁸. A més l'EV-A71 activa múltiples vies inflamatòries que juguen un paper en limitar la replicació viral, però també tenen un efecte deleteri en el cervell³³. Hipotetitzem que la infecció viral indueix immunitat cel·lular, activació de la micròglia i síntesi de neopterina, que és una via relacionada amb la neurovirulència.

En aquest article es reporta per primera vegada l'associació entre els nivells de neopterina en LCR i la presència de lesions i lesions extenses a la RM cerebral i medul·lar, així com els respectius valors l·lindar. En un cas, els valors de neopterina en LCR es van trobar francament elevats en un moment en que la RM, realitzada de forma precoç, havia resultat normal; una segona RM realitzada dies després va resultar extensament alterada. Considerant que la neopterina augmenta de forma progressiva durant els primers dies, futurs estudis podrien tractar d'establir un nomograma per predir les lesions radiològiques i la seva gravetat. Aquestes troballes tenen un interès destacat, ja que s'estan sumant evidències en favor del paper de la RM no només per al diagnòstic sinó també per a establir el pronòstic de l'encefalitis de tronc per EV-A71. La normalitat de la RM s'ha correlacionat amb bon pronòstic, i la presència de lesions en múltiples àrees del SNC s'ha correlacionat amb mal pronòstic¹¹⁶⁻¹¹⁸.

Tot i les limitacions que s'exposaran més endavant, aquest estudi suggereix una associació entre els nivells de neopterina en LCR i la presència

de lesions radiològiques. Són necessaris futurs estudis en mostres més grans per a avaluar el paper de la neopterina en LCR com a biomarcadors de gravetat. En cas de demostrar-se útil, podria ajudar a guiar les exploracions complementàries o el tractament.

6.3 Infecció per HPeV-3 i hiperferritinèmia extrema

El quart article s'emmarca dins de l'objectiu general de descriure les característiques dels pacients pediàtrics ingressats per infeccions per HPeV amb manifestacions neurològiques i sistèmiques en el nostre medi. Es presenta en últim terme per considerar-se separat de la unitat temàtica que representa el brot d'encefalitis de tronc per EV-A71 de l'any 2016. Tanmateix, és el primer article des del punt de vista cronològic i el punt de partida real d'aquesta Memòria de Tesi, ja que representa la introducció de l'autor en el món de la vigilància epidemiològica d'EV i HPeV. Tal i com s'exposa a la introducció, la vigilància de HPeV sempre ha estat lligada a la vigilància d'EV, tant per motius històrics, doncs no va ser fins a principis dels anys 1990 que els HPeV van considerar-se un gènere independent dels EV, com per motius clínics, doncs són causa de patologies que se solapen amb les produïdes per EV.

Durant el període 2015-2018, en el nostre centre només es van identificar quatre pacients amb infecció per HPeV. En la pràctica clínica en el nostre medi, la detecció d'un cas d'infecció per HPeV depèn exclusivament de la sospita clínica, i no es disposa de tècniques moleculars ràpides per a la detecció de HPeV, per la qual cosa se sospita que la incidència real és superior a la observada.

En aquest article es descriuen dos lactants bessons dizigòtics amb febre persistent i hiperferritinèmia, que no es va associar amb limfocitosis hemofagocítica, sinó amb infecció per HPeV-3. A més de la febre i la irritabilitat, l'aparició d'un exantema palmo-plantar a partir del tercer-cinquè dia de febre, la distensió abdominal i la protrusió umbilical són claus per a la sospita de la infecció¹⁸⁹. Aquestes troballes clíniques, junt amb la presència d'hiperferritinèmia, van ser els signes guia que ens van portar al diagnòstic.

Si bé la hiperferritinèmia és una troballa freqüent en la infecció per HPeV-3¹⁹⁰, els valors de ferritina descrits en el present article són els més elevats reportats en la literatura. Tot i la important activació immune que tradueixen aquests resultats, es va mantenir una conducta conservadora perquè els pacients no van presentar mal estat general i no van complir criteris de limfohistiocitosi hemofagocítica¹⁷⁰. Aquest article també representa la primera descripció de la disfunció NK transitòria associada a la infecció de HPeV-3, excloent l'únic cas descrit de limfohistiocitosi hemofagocítica¹⁹¹.

6.4 Limitacions

Una de les principals limitacions dels estudis inclosos en aquest dossier és la reduïda mida mostral en general, així com el baix nombre de pacients amb malaltia greu en particular (encefalomielitis i disfunció autonòmica). En la mateixa línia, no es disposa de RM cerebral i medul·lar en aquells pacients que van presentar milloria ràpida. Tampoc no es disposa de LCR per a realitzar tots els estudis desitjats (tècniques de biologia molecular, determinació de neopterina) en aquells pacients que van consultar per primera vegada en un altre centre, o en aquells pacients amb mostra insuficient. A part, és una limitació per a la descripció de la cinètica dels nivells de neopterina en LCR el fet que només es disposa d'una mostra de cada individu, i no pas mostres en dies successius.

Aquests estudis representen l'experiència d'un sol centre, però es confirmen en un estudi multicèntric realitzat a Espanya i Andorra¹⁷⁹. Aquest fet, si bé limita la generalització dels resultats, augmenta la probabilitat que tots els pacients hagin sigut avaluats de forma similar des del punt de vista clínic, radiològic i microbiològic. Es tracta d'estudis observacionals, la qual cosa limita de forma significativa el control de la influència dels factors de confusió sobre els resultats. Per exemple, no es poden establir conclusions sobre l'efecte de l'administració d'IGIV o GC, ja que tots els pacients amb malaltia greu en van rebre. En últim terme, convé tenir present que moltes de les tècniques diagnòstiques de les que disposem en el nostre medi són poc accessibles en els països d'Àsia i Regió del Pacífic, on la MBMP presenta una major incidència, el que limita la replicació d'alguns resultats.

Algunes de les limitacions exposades són implícites en el maneig d'un brot amb gran exigència tècnica i professional. Podríem comparar-lo amb la pandèmia pel virus de la grip *A(H1N1)pdm9*, amb la diferència que en aquest cas la caracterització microbiològica s'havia fet mesos abans al continent americà¹⁹².

7 CONCLUSIONS

7 CONCLUSIONS

1. Durant l'any 2016, el genotip d'EV més freqüentment identificat va ser l'EV-A71. La circulació d'aquest genotip va condicionar l'aparició d'un brot d'encefalitis de tronc en pacients pediàtrics, en alguns casos amb afectació de medul·la espinal.
2. Tot i que l'EV-A71 havia circulat anteriorment en el nostre medi sense condicionar malaltia greu, la soca d'EV-A71 predominant durant el brot epidèmic de 2016 corresponia a una nova soca recombinant C1 detectada per primer cop a Alemanya l'any 2015.
3. L'únic genotip d'EV aïllat en els pacients amb encefalitis de tronc o encefalomièlitis, seguint les classificacions clíniques de l'OMS, va ser l'EV-A71.
4. Les mostres de femtes i d'aspirat nasofaringi van ser les més rentables per a la detecció d'EV mitjançant tècniques convencionals. En cap pacient amb encefalitis de tronc es va detectar EV en LCR mitjançant tècniques convencionals.
5. La PCR niada múltiple va permetre demostrar la presència d'EV en el LCR d'alguns pacients amb encefalitis de tronc, reforçant la hipòtesi de la neuroinfecció. En un d'aquests pacients es va poder identificar l'EV-A71 en LCR.
6. No es va trobar cap coinfecció bacteriana ni viral en aquests pacients, excepte el VHH-6, que donades les característiques clíniques i l'absència de replicació viral en altres mostres, es considerarà com a latència viral al SNC.
7. El perfil del pacient afecte d'encefalitis de tronc per EV-A71 corresponia a un lactant o pre-escolar. Destaca la baixa proporció de manifestacions mucocutànies. Les manifestacions neurològiques característiques van

aparèixer després de les primeres 24 hores de febre. La majoria van presentar encefalitis de tronc i només una minoria encefalomièlitis amb fallada cardiopulmonar.

8. Durant el període del brot, els pacients amb diagnòstic de meningitis per EV van presentar febre de menor duració i detecció d'EV en LCR amb major freqüència, en comparació amb els pacients amb encefalitis de tronc per EV.
9. L'edat menor de 12 mesos i els valors més elevats de leucòcits i procalcitonina en plasma es van associar amb fallada cardiopulmonar. La presència d'encefalomièlitis es va associar amb la persistència de seqüeles als 30 dies.
10. Donat que tots els pacients greus van rebre tractament, no podem inferir l'evolució d'aquests sense tractament ni, per tant, la seva utilitat clínica. Alguns pacients van ingressar a UCIP, però no va haver-hi cap èxitus.
11. Els nivells de neopterina en LCR estan elevats en la majoria de pacients amb encefalitis de tronc per EV, en un rang més elevat que el que s'havia descrit prèviament en pacients amb meningitis per EV. En pacients amb encefalitis de tronc, els nivells de neopterina en LCR augmenten progressivament fins al quart-cinquè dia de febre, per descendir posteriorment.
12. Nivells de neopterina en LCR més elevats es van correlacionar amb la presència de lesions i lesions extenses a la RM. No vam observar una correlació entre els nivells de neopterina en LCR i el diagnòstic d'encefalomièlitis o la persistència de símptomes neurològics als 30 dies.
13. Durant el període 2015-2018, es van identificar 4 pacients amb infecció per HPeV-3. En dos lactants amb infecció per HPeV-3 es va detectar hiperferritinèmia extrema, que no es va donar en el context de limfocitòsi hemofagocítica, sinó en el context d'una infecció de curs benigne i autolimitat.

8 BIBLIOGRAFIA

8 BIBLIOGRAFIA

1. Departament de Salut de la Generalitat de Catalunya. Comunicat de Salut [Internet]. 2016. Disponible a: <http://salutweb.gencat.cat/ca/inici/nota-premsa/?id=292080>
2. Moraga Felipe-Rucian A, Macaya-Ruiz A. Brote de enfermedad neurológica aguda asociada a enterovirus en Cataluña: aspectos neuropediátricos. Rev Neurol. 2016 Jul; 63 (01): 3-4.
3. Calvo C, Rodrigo C, Cabrerizo M, Casas I. Infecciones por Enterovirus. Revisión de la situación en España [Internet]. Sociedad Española de Infectología Pediátrica. 2016. Disponible a: <https://www.aeped.es/sites/default/files/documentos/enterovirusseip.pdf>
4. Subdirecció General de Vigilància i Resposta a Emergències de Salut Pública de la Generalitat de Catalunya. Protocol d'actuació davant casos d'enterovirus en població pediàtrica [Internet]. 2016. Disponible a: http://canalsalut.gencat.cat/web/.content/A-Z/E/enterovirus_cast/protoenterovirus.pdf
5. Mixoy A. Una nueva variante viral causó el brote de rombencefalitis en 2016. Diario Médico. 17 de maig de 2017. Microbiología y Enfermedades Infecciosas: 23.
6. Global Polio Eradication Initiative [Seu web]. Suïssa; World Health Organization; [últim accés 3 de març de 2019]. GPEI tools, protocols and guidelines. Disponible a: <http://polioeradication.org/tools-and-library/resources-for-polio-eradicators/gpei-tools-protocols-and-guidelines/>
7. Centro Nacional de Epidemiología y Centro Nacional de Microbiología. ISCIII. Plan Nacional de Erradicación de la Poliomiélitis. Vigilancia de la Parálisis Flácida Aguda y Vigilancia de Enterovirus, año 2016 [Internet]. 2016. Disponible a: http://www.isciii.es/ISCIII/es/contenidos/fd-servicios-cientifico-tecnicos/fd-vigilancias-alertas/fd-enfermedades/pdf_2016/Informe_PFA_y_Enterovirus_2016.pdf
8. Yakovenko ML, Gmyl AP, Ivanova OE, Eremeeva TP, Ivanov AP, Prostova MA, et al. The 2010 outbreak of poliomyelitis in Tajikistan: epidemiology and lessons learnt. Euro Surveill [Internet]. 2014 Feb; 19 (7): pii=20706. Disponible a: <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES2014.19.7.20706>

9. Luo H-M, Zhang Y, Wang X-Q, Yu W-Z, Wen N, Yan D-M, et al. Identification and control of a poliomyelitis outbreak in Xinjiang, China. *N Engl J Med*. 2013 Nov; 369 (21): 1981–90.
10. Hyypiä T, Horsnell C, Maaronen M, Khan M, Kalkkinen N, Auvinen P, et al. A distinct picornavirus group identified by sequence analysis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992 Sep; 89 (18): 8847–51.
11. Pallansch MA, Oberste MS, Lindsay Whitton J. Enteroviruses: Polioviruses, Coxsackieviruses, Echoviruses, and newer Enteroviruses. A: Fields BN, Knipe DM, Howley PM, editors. *Fields Virology*, 6a Edició. Filadèlfia: Lippincott Williams & Wilkins; 2013. p. 490–530.
12. Adams MJ, Lefkowitz EJ, King AMQ, Harrach B, Harrison RL, Knowles NJ, et al. Changes to taxonomy and the International Code of Virus Classification and Nomenclature ratified by the International Committee on Taxonomy of Viruses (2017). *Arch Virol*. 2017 Ago; 162 (8): 2505-2538.
13. Cabrerizo M, Tarrago D, Muñoz-Almagro C, Del Amo E, Dominguez-Gil M, Eiros JM, et al. Molecular epidemiology of enterovirus 71, coxsackievirus A16 and A6 associated with hand, foot and mouth disease in Spain. *Clin Microbiol Infect*. 2014 Mar; 20 (3): O150-6.
14. Yip CCY, Lau SKP, Woo PCY, Yuen K-Y. Human enterovirus 71 epidemics: what's next? *Emerg Health Threats J*. 2013 Set; 6: 19780.
15. Witsø E, Palacios G, Cinek O, Stene LC, Grinde B, Janowitz D, et al. High prevalence of human enterovirus A infections in natural circulation of human enteroviruses. *J Clin Microbiol*. 2006 Nov; 44 (11): 4095–100.
16. Sawyer MH. Enterovirus infections: Diagnosis and treatment. *Semin Pediatr Infect Dis*. 2002 Gen; 13 (1): 40–7.
17. Enteroviruses and parechoviruses. A: Sharland M, editor. *Manual of Childhood Infection: The Blue Book*, 4a Edició. Londres: Oxford University Press; 2016. p. 508-17.
18. Chung PW, Huang YC, Chang LY, Lin TY, Ning HC. Duration of enterovirus shedding in stool. *J Microbiol Immunol Infect*. 2001 Set; 34 (3): 167–70.
19. 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.

20. 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.
21. Narang HK, Codd AA. Action of commonly used disinfectants against enteroviruses. *J Hosp Infect*. 1983 Jun; 4 (2): 209–12.
22. Bigliardi L, Sansebastiano G. Study on inactivation kinetics of hepatitis A virus and enteroviruses with peracetic acid and chlorine. New ICC/PCR method to assess disinfection effectiveness. *J Prev Med Hyg*. 2006 Jun; 47 (2): 56–63.
23. Schürmann W, Eggers HJ. An experimental study on the epidemiology of enteroviruses: water and soap washing of poliovirus 1--contaminated hands, its effectiveness and kinetics. *Med Microbiol Immunol*. 1985; 174 (5): 221–36.
24. Hogle JM, Chow M, Filman DJ. Three-dimensional structure of poliovirus at 2.9 Å resolution. *Science*. 1985 Sep; 229 (4720): 1358–65.
25. 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.
26. Baggen J, Thibaut HJ, Strating JRPM, Van Kuppeveld FJM. The life cycle of non-polio enteroviruses and how to target it. *Nat Rev Microbiol*. 2018 Jun; 16 (6): 368–81.
27. 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): 535–46.
28. Drake JW, Holland JJ. Mutation rates among RNA viruses. *Proc Natl Acad Sci*. 1999 Nov; 96 (24): 13910–3.
29. Santti J, Hyypiä T, Kinnunen L, Salminen M. Evidence of recombination among enteroviruses. *J Virol*. 1999 Oct; 73 (10): 8741–9.
30. Hirst GK. Genetic recombination with Newcastle disease virus, polioviruses, and influenza. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*. 1962; 27: 303–9.
31. Leitch ECM, Cabrerizo M, Cardoso J, Harvala H, Ivanova OE, Koike S, et al. The Association of Recombination Events in the Founding and Emergence of Subgenogroup Evolutionary Lineages of Human. 2012 Feb; 86 (5):2676–85.

32. Lee M-S, Chiang P-S, Luo S-T, Huang M-L, Liou G-Y, Tsao K-C, et al. Incidence rates of enterovirus 71 infections in young children during a nationwide epidemic in Taiwan, 2008-09. *PLoS Negl Trop Dis* [Internet]. 2012 Feb; 6 (2): e1476. Disponible a: <https://journals.plos.org/plosntds/article?id=10.1371/journal.pntd.0001476>
33. Yogarajah T, Ong KC, Perera D, Wong KT. AIM2 Inflammasome-Mediated Pyroptosis in Enterovirus A71-Infected Neuronal Cells Restricts Viral Replication. *Sci Rep* [Internet]. 2017 Jul; 7 (1): 1–16. Disponible a: <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-017-05589-2>
34. McKinney REJ, Katz SL, Wilfert CM. Chronic enteroviral meningoencephalitis in agammaglobulinemic patients. *Rev Infect Dis*. 1987 Mar-Apr; 9 (2): 334–56.
35. Hober D, Sauter P. Pathogenesis of type 1 diabetes mellitus: interplay between enterovirus and host. *Nat Rev Endocrinol*. 2010 Mai; 6 (5): 279–89.
36. Rudolph H, Schrotten H, Tenenbaum T. Enterovirus Infections of the Central Nervous System in Children. *Pediatr Infect Dis J*. 2016 Mai; 35 (5): 567–9.
37. Pons-Salort M, Parker EPK, Grassly NC. The epidemiology of non-polio enteroviruses: recent advances and outstanding questions. *Curr Opin Infect Dis*. 2015 Oct; 28 (5): 479–87.
38. Regional Office for Europe of the World Health Organization. Enterovirus surveillance guidelines. Guidelines for enterovirus surveillance in support of the Polio Eradication Initiative [Internet]. 2017. Disponible a: http://www.euro.who.int/_data/assets/pdf_file/0020/272810/EnterovirusSurveillanceGuidelines.pdf
39. Romero JR. Reverse-transcription polymerase chain reaction detection of the enteroviruses. *Arch Pathol Lab Med*. 1999 Des; 123 (12): 1161–9.
40. Oberste MS, Maher K, Kilpatrick DR, Flemister MR, Brown BA, Pallansch MA. Typing of human enteroviruses by partial sequencing of VP1. *J Clin Microbiol*. 1999 Mai; 37 (5): 1288–93.
41. 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* [Internet]. 2018 Ago; 26 (6): e2002. Disponible a: <http://doi.wiley.com/10.1002/rmv.2002>

42. 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* [Internet]. 2017 Jun; 22 (26): pii=30565. Disponible a: <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2017.22.26.30565>
43. de Crom SCM, Rossen JWA, van Furth AM, Obihara CC. Enterovirus and parechovirus infection in children: a brief overview. *Eur J Pediatr*. 2016 Ago; 175 (8): 1023–9.
44. Abzug MJ, Keyserling HL, Lee ML, Levin MJ, Rotbart HA. Neonatal enterovirus infection: virology, serology, and effects of intravenous immune globulin. *Clin Infect Dis*. 1995 Mai; 20 (5): 1201–6.
45. Abzug MJ, Michaels MG, Wald E, Jacobs RF, Romero JR, Sánchez PJ, et al. A randomized, double-blind, placebo-controlled trial of pleconaril for the treatment of neonates with enterovirus sepsis. *J Pediatric Infect Dis Soc*. 2016 Mar; 5 (1): 53–62.
46. Lopalco PL. Wild and vaccine-derived poliovirus circulation, and implications for polio eradication. *Epidemiol Infect*. 2017 Feb; 145 (3): 413–9.
47. Eggers HJ. Milestones in early poliomyelitis research (1840 to 1949). *J Virol*. 1999 Jun; 73 (6): 4533–5.
48. World Health Organization. Certification of Poliomyelitis Eradication. Fifteenth meeting of the European Regional Certification Commission. 2002. Disponible a: http://www.euro.who.int/_data/assets/pdf_file/0003/79374/E88105.pdf
49. Bhutta ZA. The last mile in global poliomyelitis eradication. *Lancet*. 2011 Ago; 378 (9791): 549–52.
50. Greninger AL, Naccache SN, Messacar K, Clayton A, Yu G, Somasekar S, et al. A novel outbreak enterovirus D68 strain associated with acute flaccid myelitis cases in the USA (2012-14): a retrospective cohort study. *Lancet Infect Dis*. 2015 Jun; 15 (6): 671–82.
51. Schieble JH, Fox VL, Lennette EH. A probable new human picornavirus associated with respiratory diseases. *Am J Epidemiol*. 1967 Mar; 85 (2): 297–310.

52. Holm-Hansen CC, Midgley SE, Fischer TK. Global emergence of enterovirus D68: a systematic review. *Lancet Infect Dis* [Internet]. 2016 Mai; 16 (5): e64–75. Disponible a: [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(15\)00543-5](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(15)00543-5)
53. Cabrerizo M, Garcia-Iniguez JP, Munell F, Amado A, Madurga-Revilla P, Rodrigo C, et al. First Cases of Severe Flaccid Paralysis Associated With Enterovirus D68 Infection in Spain, 2015-2016. *Pediatr Infect Dis J*. 2017 Des; 36 (12): 1214–6.
54. Schuster JE, Selvarangan R, Hassan F, Briggs KB, Hays L, Miller JO, et al. Clinical Course of Enterovirus D68 in Hospitalized Children. *Pediatr Infect Dis J*. 2017 Mar; 36 (3): 290–5.
55. Sejvar JJ, Lopez AS, Cortese MM, Leshem E, Pastula DM, Miller L, et al. Acute Flaccid Myelitis in the United States, August-December 2014: Results of Nationwide Surveillance. *Clin Infect Dis*. 2016 Sep; 63 (6): 737–45.
56. Okumura A, Mori H, Fee P, Kira R, Torisu H, Yasumoto S. Serial MRI findings of acute flaccid myelitis during an outbreak of enterovirus D68 infection in Japan. *Brain Dev* [Internet]. 2018 Des; pii=S0387-7604(18)30496-0. Disponible a: <https://doi.org/10.1016/j.braindev.2018.12.001>
57. Sun L, Meijer A, Froeyen M, Zhang L, Thibaut HJ, Baggen J, et al. Antiviral Activity of Broad-Spectrum and Enterovirus-Specific Inhibitors against Clinical Isolates of Enterovirus D68. *Antimicrob Agents Chemother*. 2015 Des; 59 (12): 7782–5.
58. Messacar K, Sillau S, Hopkins SE, Otten C, Wilson-Murphy M, Wong B, et al. Safety, tolerability, and efficacy of fluoxetine as an antiviral for acute flaccid myelitis. *Neurology* [Internet]. 2018 Nov; pii=10.1212/WNL.0000000000006670. Disponible a: <https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000006670>
59. Tee KK, Lam TT-Y, Chan YF, Bible JM, Kamarulzaman A, Tong CYW, et al. Evolutionary genetics of human enterovirus 71: origin, population dynamics, natural selection, and seasonal periodicity of the VP1 gene. *J Virol*. 2010 Abr; 84 (7): 3339–50.
60. Bessaud M, Razafindratsimandresy R, Nougairede A, Joffret M-L, Deshpande JM, Dubot-Peres 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* [Internet]. 2014 Mar; 9 (3): e90624. Disponible a: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0090624>

61. Schmidt NJ, Lennette EH, Ho HH. An Apparently New Enterovirus Isolated from Patients with Disease of the Central Nervous System. *J Infect Dis.* 1974 Mar; 129 (3): 304–9.
62. Van Der Sanden S, Koopmans M, Uslu G, Van Der Avoort H. Epidemiology of enterovirus 71 in the Netherlands, 1963 to 2008. *J Clin Microbiol.* 2009 Set; 47 (9): 2826–33.
63. Chumakov M, Voroshilova M, Shindarov L, Lavrova I, Gracheva L, Koroleva G, et al. Enterovirus 71 isolated from cases of epidemic poliomyelitis-like disease in Bulgaria. *Arch Virol.* 1979; 60 (3–4): 329–40.
64. Nagy G, Takatsy S, Kukan E, Mihaly I, Domok I. Virological diagnosis of enterovirus type 71 infections: experiences gained during an epidemic of acute CNS diseases in Hungary in 1978. *Arch Virol.* 1982; 71 (3): 217–27.
65. 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 Set; 341(13):929–35.
66. Yang F, Ren L, Xiong Z, Li J, Xiao Y, Zhao R, et al. Enterovirus 71 outbreak in the People’s Republic of China in 2008. *J Clin Microbiol.* 2009 Jul; 47 (7): 2351–2.
67. Abzug MJ. The enteroviruses: problems in need of treatments. *J Infect.* 2014 Gen;68 Suppl 1:S108-14.
68. Yi E-J, Shin Y-J, Kim J-H, Kim T-G, Chang S-Y. Enterovirus 71 infection and vaccines. *Clin Exp Vaccine Res [Internet].* 2017 Gen; 6 (1): 4. Disponible a: <https://synapse.koreamed.org/DOLx.php?id=10.7774/cevr.2017.6.1.4>
69. Sanders SA, Herrero LJ, McPhie K, Chow SSW, Craig ME, Dwyer DE, et al. Molecular epidemiology of enterovirus 71 over two decades in an Australian urban community. *Arch Virol.* 2006 Mai; 151 (5): 1003–13.
70. Mirand A, Schuffenecker I, Henquell C, Billaud G, Jugie G, Falcon D, et al. Phylogenetic evidence for a recent spread of two populations of human enterovirus 71 in European countries. *J Gen Virol.* 2010 Set; 91 (Pt 9): 2263–77.
71. Hassel C, Mirand A, Lukashev A, TerletskaiaLadwig E, Farkas A, Schuffenecker I, et al. Transmission patterns of human enterovirus 71 to, from and among European countries, 2003 to 2013. *Euro Surveill [Internet].* 2015; 20

(34): pii=30005. Disponible a: <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2015.20.34.30005>

72. Bottcher S, Obermeier PE, Neubauer K, Diedrich S. Recombinant Enterovirus A71 Subgenogroup C1 Strains, Germany, 2015. Vol. 22, Emerg Infect Dis. 2016 Oct; 22 (10): 1843–6.

73. Vallet S, Legrand-Quillien MC, Dailland T, Podeur G, Gouriou S, Schuffenecker I, et al. Fatal case of enterovirus 71 infection, France, 2007. Emerg Infect Dis. 2009 Nov; 15 (11): 1837–40.

74. Bible JM, Iturriza-Gomara M, Megson B, Brown D, Pantelidis P, Earl P, et al. Molecular epidemiology of human enterovirus 71 in the United Kingdom from 1998 to 2006. J Clin Microbiol. 2008 Oct; 46 (10): 3192–200.

75. Huang P-N, Shih S-R. Update on enterovirus 71 infection. Curr Opin Virol [Internet]. 2014 Abr; 5: 98–104. Disponible a: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1879625714000674>

76. Yamayoshi S, Yamashita Y, Li J, Hanagata N, Minowa T, Takemura T, et al. Scavenger receptor B2 is a cellular receptor for enterovirus 71. Nat Med. 2009 Jul; 15 (7): 798–801.

77. Hirata T, Merrill-Skoloff G, Aab M, Yang J, Furie BC, Furie B. P-Selectin glycoprotein ligand 1 (PSGL-1) is a physiological ligand for E-selectin in mediating T helper 1 lymphocyte migration. J Exp Med. 2000 Des; 192(11): 1669–76.

78. Ong KC, Wong KT. Understanding enterovirus 71 neuropathogenesis and its impact on other neurotropic enteroviruses. Brain Pathol. 2015 Set; 25 (5): 614–24.

79. Muehlenbachs A, Bhatnagar J, Zaki SR. Tissue tropism, pathology and pathogenesis of enterovirus infection. J Pathol. 2015 Gen; 235 (2): 217–28.

80. Chan KP, Goh KT, Chong CY, Teo ES, Lau G, Ling AE. Epidemic hand, foot and mouth disease caused by human enterovirus 71, Singapore. Emerg Infect Dis. 2003 Gen; 9 (1): 78–85.

81. He Y, Ong KC, Gao Z, Zhao X, Anderson VM, McNutt MA, et al. Tonsillar crypt epithelium is an important extra-central nervous system site for viral replication in EV71 encephalomyelitis. Am J Pathol. 2014 Mar; 184 (3): 714–20.

82. Chan LG, Parashar UD, Lye MS, Ong FG, Zaki SR, Alexander JP, et al. Deaths of children during an outbreak of hand, foot, and mouth disease in sarawak, malaysia: clinical and pathological characteristics of the disease. For the Outbreak Study Group. *Clin Infect Dis*. 2000 Set; 31 (3): 678–83.
83. Chen C-S, Yao Y-C, Lin S-C, Lee Y-P, Wang Y-F, Wang J-R, et al. Retrograde Axonal Transport: a Major Transmission Route of Enterovirus 71 in Mice. *J Virol* [Internet]. 2007; 81 (17): 8996–9003. Disponible a: <http://jvi.asm.org/cgi/doi/10.1128/JVI.00236-07>
84. Chang C-Y, Li J-R, Ou Y-C, Chen W-Y, Liao S-L, Raung S-L, et al. Enterovirus 71 infection caused neuronal cell death and cytokine expression in cultured rat neural cells. *IUBMB Life* [Internet]. 2015 Oct; 67(10):789–800. Disponible a: <https://doi.org/10.1002/iub.1434>
85. Ye N, Gong X, Pang LL, Gao WJ, Zhang YT, Li X Le, et al. Cytokine responses and correlations thereof with clinical profiles in children with enterovirus 71 infections. *BMC Infect Dis* [Internet]. 2015 Gen; 15 (1): 1–9. Disponible a: <http://dx.doi.org/10.1186/s12879-015-0965-1>
86. Kao SJ, Yang FL, Hsu YH, Chen HI. Mechanism of fulminant pulmonary edema caused by enterovirus 71. *Clin Infect Dis*. 2004 Gen; 38 (12): 1784–8.
87. Pathinayake PS, Hsu AC-Y, Wark PAB. Innate Immunity and Immune Evasion by Enterovirus 71. *Viruses*. 2015 Des; 7 (12): 6613–30.
88. Fitzgerald KA, McWhirter SM, Faia KL, Rowe DC, Latz E, Golenbock DT, et al. IKKepsilon and TBK1 are essential components of the IRF3 signaling pathway. *Nat Immunol*. 2003 Mai; 4 (5): 491–6.
89. Wang B, Xi X, Lei X, Zhang X, Cui S, Wang J, et al. Enterovirus 71 protease 2Apro targets MAVS to inhibit anti-viral type I interferon responses. *PLoS Pathog* [Internet]. 2013 Mar;9(3):e1003231. Disponible a: <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003231>
90. Lei X, Sun Z, Liu X, Jin Q, He B, Wang J. Cleavage of the adaptor protein TRIF by enterovirus 71 3C inhibits antiviral responses mediated by Toll-like receptor 3. *J Virol*. 2011 Set; 85 (17): 8811–8.
91. Kontsek P. Human type I interferons: structure and function. *Acta Virol*. 1994 Des; 38 (6): 345–60.

92. Lupfer C, Malik A, Kanneganti T-D. Inflammasome control of viral infection. *Curr Opin Virol.* 2015 Gen; 12: 38–46.
93. Feng Q, Langereis MA, Lork M, Nguyen M, Hato S V, Lanke K, et al. Enterovirus 2Apro targets MDA5 and MAVS in infected cells. *J Virol.* 2014 Mar; 88 (6): 3369–78.
94. Lei X, Liu X, Ma Y, Sun Z, Yang Y, Jin Q, et al. The 3C protein of enterovirus 71 inhibits retinoid acid-inducible gene I-mediated interferon regulatory factor 3 activation and type I interferon responses. *J Virol.* 2010 Ago; 84 (16): 8051–61.
95. Lei X, Zhang Z, Xiao X, Qi J, He B, Wang J. Enterovirus 71 Inhibits Pyroptosis through Cleavage of Gasdermin D. *J Virol.* 2017 Set; 91 (18).
96. Yeh M-T, Wang S-W, Yu C-K, Lin K-H, Lei H-Y, Su I-J, et al. A single nucleotide in stem loop II of 5'-untranslated region contributes to virulence of enterovirus 71 in mice. *PLoS One* [Internet]. 2011; 6 (11): e27082. Disponible a: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0027082>
97. Chang L-Y, Chang I-S, Chen W-J, Huang Y-C, Chen G-W, Shih S-R, et al. HLA-A33 is associated with susceptibility to enterovirus 71 infection. *Pediatrics.* 2008 Des; 122 (6): 1271–6.
98. Huang W-C, Shih W-L, Yang S-C, Yen T-Y, Lee J-T, Huang Y-C, et al. Predicting severe enterovirus 71 infection: Age, comorbidity, and parental behavior matter. *J Microbiol Immunol Infect.* 2017 Feb; 50 (1): 10–6.
99. Ooi MH, Wong SC, Lewthwaite P, Cardoso MJ, Solomon T. Clinical features, diagnosis, and management of enterovirus 71. *Lancet Neurol.* 2010 Nov; 9 (11): 1097–105.
100. Prager P, Nolan M, Andrews IP, Williams GD. Neurogenic pulmonary edema in enterovirus 71 encephalitis is not uniformly fatal but causes severe morbidity in survivors. *Pediatr Crit Care Med.* 2003 Jul; 4 (3): 377–81.
101. World Health Organization Western Pacific Region. A Guide to Clinical Management and Public Health Response for Hand, Foot and Mouth Disease (HFMD) [Internet]. 2011. Disponible a: <http://www.wpro.who.int/publications/docs/GuidancefortheclinicalmanagementofHFMD.pdf>

102. Long D-L, Zhu S-Y, Li C-Z, Chen C-Y, Du W-T, Wang X. Late-Onset Nail Changes Associated with Hand, Foot, and Mouth Disease: A Clinical Analysis of 56 Cases. *Pediatr Dermatol*. 2016 Jul; 33 (4): 424–8.
103. Lu H-K, Lin T-Y, Hsia S-H, Chiu C-H, Huang Y-C, Tsao K-C, et al. Prognostic implications of myoclonic jerk in children with enterovirus infection. *J Microbiol Immunol Infect*. 2004 Abr; 37 (2): 82–7.
104. Wang S-M, Lei H-Y, Huang M-C, Wu J-M, Chen C-T, Wang J-N, et al. Therapeutic efficacy of milrinone in the management of enterovirus 71-induced pulmonary edema. *Pediatr Pulmonol*. 2005 Mar; 39 (3): 219–23.
105. Mong HO, Solomon T, Podin Y, Mohan A, Akin W, Yusuf MA, et al. Evaluation of different clinical sample types in diagnosis of human enterovirus 71-associated hand-foot-and-mouth disease. *J Clin Microbiol*. 2007 Jun; 45 (6): 1858–66.
106. Ooi MH, Wong SC, Mohan A, Podin Y, Perera D, Clear D, et al. Identification and validation of clinical predictors for the risk of neurological involvement in children with hand, foot, and mouth disease in Sarawak. *BMC Infect Dis*. 2009 Gen; 9: 3. Disponible a: <https://doi.org/10.1186/1471-2334-9-3>
107. Chang L, Huang L, Gau SS, Wu Y, Hsia S, Fan T, et al. Neurodevelopment and Cognition in Children after Enterovirus 71 Infection. 2007 Mar; 356 (12): 1226-34.
108. Fu YC, Chi CS, Chiu YT, Hsu SL, Hwang B, Jan SL, et al. Cardiac complications of enterovirus rhombencephalitis. *Arch Dis Child*. 2004 Abr; 89 (4): 368–73.
109. Lin M-T, Wang J-K, Lu FL, Wu E-T, Yeh S-J, Lee W-L, et al. Heart rate variability monitoring in the detection of central nervous system complications in children with enterovirus infection. *J Crit Care*. 2006 Set; 21 (3): 280–6.
110. Chang LY, Lin TY, Hsu KH, Huang YC, Lin KL, Hsueh C, et al. Clinical features and risk factors of pulmonary oedema after enterovirus-71-related hand, foot, and mouth disease. *Lancet*. 1999 Nov; 354 (9191): 1682–6.
111. Khanh TH, Sabanathan S, Thanh TT, Thoa LPK, Thuong TC, Hang V thi T, et al. Enterovirus 71-associated hand, foot, and mouth disease, southern Vietnam, 2011. *Emerg Infect Dis*. 2012 Des; 18 (12): 2002–5.
112. Qui PT, Khanh TH, Trieu HT, Giang PT, Bich NN, Thoa LPK, et al. Intravenous magnesium sulfate for the management of severe hand, foot, and

mouth disease with autonomic nervous system dysregulation in Vietnamese children: Study protocol for a randomized controlled trial. *Trials*. 2016 Feb; 17:98.

113. Wang S-M, Lei H-Y, Huang K-J, Wu J-M, Wang J-R, Yu C-K, et al. Pathogenesis of enterovirus 71 brainstem encephalitis in pediatric patients: roles of cytokines and cellular immune activation in patients with pulmonary edema. *J Infect Dis*. 2003 Ago; 188 (4): 564–70.

114. Huang Y-F, Chiu P-C, Chen C-C, Chen Y-Y, Hsieh K-S, Liu Y-C, et al. Cardiac troponin I: a reliable marker and early myocardial involvement with meningoencephalitis after fatal enterovirus-71 infection. *J Infect*. 2003 Mai; 46 (4): 238–43.

115. Huang CC, Liu CC, Chang YC, Chen CY, Wang ST, Yeh TF. Neurologic complications in children with enterovirus 71 infection. *N Engl J Med*. 1999 Set; 341 (13): 936–42.

116. Jones E, Pillay TD, Liu F, Luo L, Bazo-Alvarez JC, Yuan C, et al. Outcomes following severe hand foot and mouth disease: A systematic review and meta-analysis. *Eur J Paediatr Neurol*. 2018 Set; 22:763-773.

117. Liu K, Zhou Y, Cui S, Song J, Ye P, Xiang W, et al. Clinical Value of Dorsal Medulla Oblongata Involvement Detected with Conventional MRI for Prediction of Outcome in Children with Enterovirus 71-related Brainstem Encephalitis. *Pediatr Infect Dis J [Internet]*. 2019 Feb; 38 (2): 99-103.

118. Long L, Xu L, Xiao Z, Hu S, Luo R, Wang H, et al. Neurological complications and risk factors of cardiopulmonary failure of EV-A71-related hand, foot and mouth disease. *Sci Rep [Internet]*. 2016 Mar; 6: 23444. Disponible a: <https://doi.org/10.1038/srep23444>

119. Teoh H-L, Mohammad SS, Britton PN, Kandula T, Lorentzos MS, Booy R, et al. Clinical Characteristics and Functional Motor Outcomes of Enterovirus 71 Neurological Disease in Children. *JAMA Neurol*. 2016 Mar; 73 (3): 300–7.

120. Lian Z, Huang B, He S, Liang C, Guo Y. Diffusion-weighted imaging in the diagnosis of enterovirus 71 encephalitis. *Acta Radiol*. 2012 Mar; 53 (2): 208–13.

121. Hu Y, Jiang L, Peng H. Clinical Analysis of 134 Children with Nervous System Damage Caused by Enterovirus 71 Infection. *Pediatr Infect Dis J*. 2015 Jul; 34 (7): 718–23.

122. Gau SS-F, Chang L-Y, Huang L-M, Fan T-Y, Wu Y-Y, Lin T-Y. Attention-deficit/hyperactivity-related symptoms among children with enterovirus 71 infection of the central nervous system. *Pediatrics* [Internet]. 2008 Ago;122 (2): e452-8. Disponible a: www.pediatrics.org/cgi/doi/10.1542/peds.2007-3799
123. Zhu F, Xu W, Xia J, Liang Z, Liu Y, Zhang X, et al. Efficacy, Safety, and Immunogenicity of an Enterovirus 71 Vaccine in China. *N Engl J Med*. 2014 Feb; 370 (9): 818–28.
124. Wang S-M, Lei H-Y, Huang M-C, Su L-Y, Lin H-C, Yu C-K, et al. Modulation of cytokine production by intravenous immunoglobulin in patients with enterovirus 71-associated brainstem encephalitis. *J Clin Virol*. 2006 Set; 37 (1): 47–52.
125. Shen F-H, Shen T-J, Chang T-M, Su I-J, Chen S-H. Early dexamethasone treatment exacerbates enterovirus 71 infection in mice. *Virology*. 2014 Set; 464–465:218–27.
126. He Y, Yang J, Zeng G, Shen T, Fontaine RE, Zhang L, et al. Risk factors for critical disease and death from hand, foot and mouth disease. *Pediatr Infect Dis J*. 2014 Set; 33 (9): 966–70.
127. Olijve L, Jennings L, Walls T. Human Parechovirus: an Increasingly Recognized Cause of Sepsis-Like Illness in Young Infants. *Clin Microbiol Rev*. 2018 Jan; 31(1).
128. Wigand R, Sabin AB. Properties of ECHO types 22, 23 and 24 viruses. *Arch Gesamte Virusforsch*. 1961; 11: 224–47.
129. Cumming G, Khatami A, McMullan BJ, Musto J, Leung K, Nguyen O, et al. Parechovirus Genotype 3 Outbreak among Infants, New South Wales, Australia, 2013-2014. *Emerg Infect Dis*. 2015 Jul; 21 (7): 1144–52.
130. Westerhuis B, Kolehmainen P, Benschop K, Nurminen N, Koen G, Koskiniemi M, et al. Human parechovirus seroprevalence in Finland and the Netherlands. *J Clin Virol*. 2013 Set; 58 (1): 211–5.
131. Janes VA, Minnaar R, Koen G, van Eijk H, Dijkman-de Haan K, Pajkrt D, et al. Presence of human non-polio enterovirus and parechovirus genotypes in an Amsterdam hospital in 2007 to 2011 compared to national and international published surveillance data: a comprehensive review. *Euro Surveill* [Internet]. 2014 Nov; 19 (46): pii=20964. Disponible a: <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES2014.19.46.20964>

132. Wildenbeest JG, Benschop KSM, Bouma-de Jongh S, Wolthers KC, Pajkrt D. Prolonged Shedding of Human Parechovirus in Feces of Young Children after Symptomatic Infection. *Pediatr Infect Dis J*. 2016 Mai;35 (5): 580–3.
133. Kalynych S, Palkova L, Plevka P. The Structure of Human Parechovirus 1 Reveals an Association of the RNA Genome with the Capsid. *J Virol*. 2016 Feb; 90 (3): 1377–86.
134. Harvala H, Wolthers KC, Simmonds P. Parechoviruses in children: understanding a new infection. *Curr Opin Infect Dis*. 2010 Jun; 23(3): 224–30.
135. Khatami A, McMullan BJ, Webber M, Stewart P, Francis S, Timmers KJ, et al. Sepsis-like disease in infants due to human parechovirus type 3 during an outbreak in Australia. *Clin Infect Dis*. 2015 Gen; 60 (2): 228–36.
136. Verboon-Macielek MA, Groenendaal F, Hahn CD, Hellmann J, van Loon AM, Boivin G, et al. Human parechovirus causes encephalitis with white matter injury in neonates. *Ann Neurol*. 2008 Set; 64 (3): 266–73.
137. Alam MM, Khurshid A, Shaukat S, Sharif S, Rana MS, Angez M, et al. Identification of human parechovirus genotype, HPeV-12, in a paralytic child with diarrhea. *J Clin Virol*. 2012 Des; 55 (4): 339–42.
138. Crom SCM De, Obihara CC, Moor RA De, Veldkamp EJM, Furth AM Van, Rossen JWA. Prospective comparison of the detection rates of human enterovirus and parechovirus RT-qPCR and viral culture in different pediatric specimens. *J Clin Virol*. 2013 Oct; 58(2): 449–54.
139. Cabrerizo M, Diaz-Cerio M, Munoz-Almagro C, Rabella N, Tarrago D, Romero MP, et al. Molecular epidemiology of enterovirus and parechovirus infections according to patient age over a 4-year period in Spain. *J Med Virol*. 2017 Mar; 89 (3): 435–42.
140. Perera D, Podin Y, Akin W, Tan CS, Cardoso MJ. Incorrect identification of recent Asian strains of coxsackievirus A16 as human enterovirus 71: Improved primers for the specific detection of human enterovirus 71 by RT PCR. *BMC Infect Dis* [Internet]. 2004; 4:1–11. Disponible a: <https://doi.org/10.1186/1471-2334-4-11>
141. Cassinotti P, Mietz H, Siegl G. Suitability and clinical application of a multiplex nested PCR assay for the diagnosis of herpes simplex virus infections. *J Med Virol*. 1996 Set; 50 (1): 75–81.

142. Xiao X-L, He Y-Q, Yu Y-G, Yang H, Chen G, Li H-F, et al. Simultaneous detection of human enterovirus 71 and coxsackievirus A16 in clinical specimens by multiplex real-time PCR with an internal amplification control. *Arch Virol*. 2009; 154 (1): 121–5.
143. Demogines A, Fouch S, Everhart K, Leber A, Barney T, Daly JA, et al. Multi-Center Clinical Evaluation of a Multiplex Meningitis / Encephalitis PCR Panel for Simultaneous Detection of Bacteria , Yeast , and Viruses in Cerebrospinal Fluid Specimens. *J Clin Microbiol*. 2015 Set; 54 (9): 2251–61.
144. Glaser CA, Honarmand S, Anderson LJ, Schnurr DP, Forghani B, Cossen CK, et al. Beyond viruses: clinical profiles and etiologies associated with encephalitis. *Clin Infect Dis*. 2006 Des; 43 (12): 1565–77.
145. Mailles A, Vaillant V, Stahl J-P. [Infectious encephalitis in France from 2000 to 2002: the hospital database is a valuable but limited source of information for epidemiological studies]. *Med Mal Infect*. 2007 Feb; 37 (2): 95–102.
146. Chan BK, Wilson T, Fischer KF, Kriesel JD. Deep sequencing to identify the causes of viral encephalitis. *PLoS One*. 2014 Abr; 9 (4): e93993. Disponible a: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0093993>
147. Mullis KB, Faloona FA. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol*. 1987; 155: 335–50.
148. Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, et al. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*. 1988 Gen; 239 (4839): 487–91.
149. Baltimore D. RNA-dependent DNA polymerase in virions of RNA tumour viruses. *Nature*. 1970 Gen; 226 (5252): 1209–11.
150. Mackay IM, Arden KE, Nitsche A. Real-time PCR in virology. 2002;30(6):1292–305.
151. Selva L, Martinez-Planas A, Garcia-Garcia J-J, Casadevall R, Luaces C, Munoz-Almagro C. Comparison of an in-house real-time RT-PCR assay with a commercial assay for detection of enterovirus RNA in clinical samples. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2012 Mai; 31 (5): 715–9.
152. Gelmini S, Orlando C, Sestini R, Vona G, Pinzani P, Ruocco L, et al. Quantitative polymerase chain reaction-based homogeneous assay with

fluorogenic probes to measure c-erbB-2 oncogene amplification. *Clin Chem.* 1997 Mai; 43 (5): 752–8.

153. Rhein J, Bahr NC, Hemmert AC, Cloud JL, Oswald C, Lo E, et al. Diagnostic performance of a multiplex PCR assay for meningitis in an HIV-infected population in Uganda. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2016 Mar;84(3):268-73.

154. Ririe KM, Rasmussen RP, Wittwer CT. Product differentiation by analysis of DNA melting curves during the polymerase chain reaction. *Anal Biochem.* 1997 Feb; 245 (2): 154–60.

155. Muldrew KL. Molecular diagnostics of infectious diseases. *Curr Opin Pediatr.* 2009 Feb; 21 (1): 102–11.

156. Shendure J, Balasubramanian S, Church GM, Gilbert W, Rogers J, Schloss JA, et al. DNA sequencing at 40: past, present and future. *Nature* [Internet]. 2017 Oct; 550 (7676): 345-353. Disponible a: <http://dx.doi.org/10.1038/nature24286>

157. Cabrerizo M, Echevarria JE, Gonzalez I, de Miguel T, Trallero G. Molecular epidemiological study of HEV-B enteroviruses involved in the increase in meningitis cases occurred in Spain during 2006. *J Med Virol.* 2008 Gen; 80 (6): 1018–24.

158. Casas I, Palacios GF, Trallero G, Cisterna D, Freire MC, Tenorio A. Molecular characterization of human enteroviruses in clinical samples: Comparison between VP2, VP1, and RNA polymerase regions using RT nested PCR assays and direct sequencing of products. *J Med Virol.* 2001 Set; 65 (1): 138–48.

159. Deurenberg RH, Bathoorn E, Chlebowicz MA, Couto N, Ferdous M, Garcia-Cobos S, et al. Application of next generation sequencing in clinical microbiology and infection prevention. *J Biotechnol.* 2017 Feb; 243: 16–24.

160. Goodwin S, McPherson JD, McCombie WR. Coming of age: ten years of next-generation sequencing technologies. *Nat Rev Genet.* 2016 May; 17 (6): 333–51.

161. Deamer D, Akeson M, Branton D. Three decades of nanopore sequencing. *Nat Biotechnol.* 2016; 34 (5): 518–24.

162. Huang A, Zhang Y-Y, Chen K, Hatakeyama K, Keaney JFJ. Cytokine-stimulated GTP cyclohydrolase I expression in endothelial cells requires coordinated activation of nuclear factor-kappaB and Stat1/Stat3. *Circ Res*. 2005 Feb; 96 (2): 164–71.
163. Eisenhut M. Neopterin in Diagnosis and Monitoring of Infectious Diseases. *J Biomarkers* [Internet]. 2013;2013:1–10. Disponible a: <http://www.hindawi.com/journals/jbm/2013/196432/>
164. Hytönen J, Kortela E, Waris M, Puustinen J, Salo J, Oksi J. CXCL13 and neopterin concentrations in cerebrospinal fluid of patients with Lyme neuroborreliosis and other diseases that cause neuroinflammation. *J Neuroinflammation*. 2014 Gen; 11: 103. Disponible a: <https://doi.org/10.1186/1742-2094-11-103>
165. Spudich S, Gisslen M, Hagberg L, Lee E, Liegler T, Brew B, et al. Central nervous system immune activation characterizes primary human immunodeficiency virus 1 infection even in participants with minimal cerebrospinal fluid viral burden. *J Infect Dis*. 2011 Set; 204 (5): 753–60.
166. Bociaga-Jasik M, Ciesla A, Kalinowska-Nowak A, Skwara P, Garlicki A, Mach T. Role of IL-6 and neopterin in the pathogenesis of herpetic encephalitis. *Pharmacol Rep*. 2011; 63 (5): 1203–9.
167. Fuchs D, Chiodi F, Albert J, Asjo B, Hagberg L, Hausen A, et al. Neopterin concentrations in cerebrospinal fluid and serum of individuals infected with HIV-1. *AIDS*. 1989 Mai; 3 (5): 285–8.
168. Batllori M, Molero-Luis M, Ormazabal A, Casado M, Sierra C, García-Cazorla A, et al. Analysis of human cerebrospinal fluid monoamines and their cofactors by HPLC. *Nat Protoc*. 2017 Oct; 12 (11): 2359–75.
169. Karrasch M, Fischer E, Scholten M, Sauerbrei A, Henke A, Renz DM, et al. A severe pediatric infection with a novel enterovirus A71 strain, Thuringia, Germany. *J Clin Virol*. 2016 Nov; 84: 90–5.
170. Henter J-I, Horne A, Arico M, Egeler RM, Filipovich AH, Imashuku S, et al. HLH-2004: Diagnostic and therapeutic guidelines for hemophagocytic lymphohistiocytosis. *Pediatr Blood Cancer*. 2007 Feb; 48 (2): 124–31.
171. Wang Y, Altmeyer R, Wang X, Zou G, Xia A, Zeng M, et al. Enterovirus 71 infection in children with hand, foot, and mouth disease in Shanghai, China: epidemiology, clinical feature and diagnosis. *Virol J* [Internet]. 2015; 12 (1): 83. Disponible a: <http://dx.doi.org/10.1186/s12985-015-0308-2>

172. World Health Organization. Routine tests of CSF for poliovirus surveillance give low yield. Polio Laboratory Network Quarterly Update. 1998; 4(3): 1-2. Disponible a: <http://archives.who.int/vaccines/en/poliolab/1998/43.pdf>
173. Perez-Velez 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 Oct; 45 (8): 950–7.
174. Shen XX, Qiu FZ, Zhao HL, Yang MJ, Hong L, Xu ST, et al. A novel and highly sensitive real-time nested RT-PCR assay in a single closed tube for detection of enterovirus. Diagn Microbiol Infect Dis. 2018 Mar; 90 (3): 181-185.
175. Fujimoto T, Yoshida S, Munemura T, Taniguchi K, Shinohara M, Nishio O, et al. Detection and quantification of enterovirus 71 genome from cerebrospinal fluid of an encephalitis patient by PCR applications. Jpn J Infect Dis. 2008 Nov; 61 (6): 497–9.
176. Leon KE, Casas-Alba D, Ramesh A, Khan LM, Launes C, Sample HA, et al. Pediatric Brainstem Encephalitis Outbreak Investigation with Metagenomic Next- Generation Sequencing. bioRxiv 414979 [Preprint]. 2018 Set. Disponible a: <https://doi.org/10.1101/414979>
177. Han JF, Zhang Y, Hou PQ, Zhu SY, Wu XY, Zhao H, et al. Human enterovirus co-infection in severe HFMD patients in China. J Clin Virol. 2014 Des; 61 (4): 621–2.
178. Antona D, Kossorotoff M, Schuffenecker I, Mirand A, Leruez-Ville M, Bassi C, et al. Severe paediatric conditions linked with EV-A71 and EV-D68, France, May to October 2016. Euro Surveill. 2016 Nov; 21 (46): pii=30402. Disponible a: <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2016.21.46.30402>
179. González-sanz R, Casas-alba D, Launes C, Muñoz-almagro C. Molecular epidemiology of an enterovirus A71 outbreak associated with severe neurological disease, Spain , 2016. Euro Surveill. 2019; 24 (7): pii=1800089. Disponible a: <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2019.24.7.1800089>
180. Roda D, Perez-Martinez E, Cabrerizo M, Trallero G, Martinez-Planas A, Luaces C, et al. Clinical characteristics and molecular epidemiology of Enterovirus infection in infants <3 months in a referral paediatric hospital of Barcelona. Eur J Pediatr. 2015 Nov; 174 (11): 1549–53.

181. Subdirecció General de Vigilància i Resposta a Emergències de Salut Pública. Informe final de la investigació epidemiològica de quadres neurològics aguts per enterovirus en població pediàtrica [Internet]. 2017. Disponible a: http://canalsalut.gencat.cat/web/.content/_A-Z/E/enterovirus/neurologics_enterovirus.pdf
182. Ruan F, Yang T, Ma H, Jin Y, Song S, Fontaine RE, et al. Risk factors for hand, foot, and mouth disease and herpangina and the preventive effect of hand-washing. *Pediatrics* [Internet]. 2011 Abr; 127 (4): e898-904. Disponible a: www.pediatrics.org/cgi/doi/10.1542/peds.2010-1497
183. Chang L-Y, Tsao K-C, Hsia S-H, Shih S-R, Huang C-G, Chan W-K, et al. Transmission and clinical features of enterovirus 71 infections in household contacts in Taiwan. *JAMA*. 2004 Gen; 291 (2): 222–7.
184. Lin T-Y, Chang L-Y, Hsia S-H, Huang Y-C, Chiu C-H, Hsueh C, et al. The 1998 enterovirus 71 outbreak in Taiwan: pathogenesis and management. *Clin Infect Dis*. 2002 Mai; 34 Suppl 2: S52-7.
185. Chea S, Cheng Y-B, Chokephaibulkit K, Chotpitayasunondh T, Rogier van Doorn H, Hafy Z, et al. Workshop on use of intravenous immunoglobulin in hand, foot and mouth disease in Southeast Asia. *Emerg Infect Dis*. 2015 Gen; 21 (1).
186. Departament de Salut de la Generalitat de Catalunya. Comunicat del Departament de Salut sobre enterovirus. 2016. Disponible a: <https://govern.cat/salaprensa/notes-premsa/295325/comunicat-del-departament-salut-sobre-enterovirus>
187. Zhao YY, Jin H, Zhang XF, Wang B. Case-fatality of hand, foot and mouth disease associated with EV71: A systematic review and meta-analysis. *Epidemiol Infect* [Internet]. 2015 Oct; 143 (14): 3094–102. Disponible a: <https://doi.org/10.1017/S095026881500028X>
188. Hagberg L, Cinque P, Gisslen M, Brew BJ, Spudich S, Bestetti A, et al. Cerebrospinal fluid neopterin: an informative biomarker of central nervous system immune activation in HIV-1 infection. *AIDS Res Ther*. 2010 Gen; 7: 15.
189. Esposito S, Rahamat-Langendoen J, Ascolese B, Senatore L, Castellazzi L, Niesters HGM. Pediatric parechovirus infections. *J Clin Virol*. 2014 Gen; 60 (2): 84–9.
190. Hara S, Kawada J, Kawano Y, Yamashita T, Minagawa H, Okumura N, et al. Hyperferritinemia in neonatal and infantile human parechovirus-3 infection

in comparison with other infectious diseases. *J Infect Chemother Off J Japan Soc Chemother.* 2014 Gen; 20 (1): 15–9.

191. Aviner S, Sofer D, Shulman LM, Bibi H, Weitzman S. Hemophagocytic lymphohistiocytosis associated with parechovirus 3 infection. *J Pediatr Hematol Oncol.* 2014 Mai; 36 (4): e251-3. Disponible a: <https://doi.org/10.1007/s10156-012-0420-9>

192. Launes C, Garcia-Garcia JJ, Jordan I, Selva L, Rello J, Munoz-Almagro C. Viral load at diagnosis and influenza A H1N1 (2009) disease severity in children. *Influenza Other Respi Viruses.* 2012 Nov;6(6):e89-92. Dispnoible a: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4941704/pdf/IRV-6-0e89.pdf>

9 ANNEX DE RESULTATS

9 ANNEX DE RESULTATS

En el transcurs de la realització dels estudis que componen aquesta Memòria de Tesi, el doctorand ha participat en altres projectes, vinculats amb la línia d'investigació de les infeccions per Enterovirus i Parechovirus que produeixen patologies neurològiques i sistèmiques en el pacient pediàtric.

El primer treball que es presenta en l'annex d'aquest dossier pretenia analitzar les característiques microbiològiques del brot de patologia neurològica associat amb EV-A71 que es va iniciar a Catalunya i posteriorment es va estendre a la resta d'Espanya l'any 2016. Es tracta d'un estudi multicèntric observacional prospectiu coordinat per la Unitat d'EV del Centre Nacional de Microbiologia, que es va dur a terme entre gener i desembre de l'any 2016.

El segon treball pretenia analitzar el LCR de 20 pacients afectes pel brot (10 pacients amb encefalitis de tronc o encefalomièlitis i 10 pacients amb meningitis o encefalitis) mitjançant mNGS clínica amb plataforma Illumina®, i comparar els resultats amb les tècniques convencionals. Es tracta d'un estudi observacional retrospectiu que vam realitzar en col·laboració amb la Universitat de Califòrnia, San Francisco.

Cinquè article:

Molecular epidemiology of an enterovirus A71 outbreak associated with severe neurological disease, Spain, 2016.

Gonzalez-Sanz R, **Casas-Alba D**, Launes C, Muñoz-Almagro C, Ruiz-García MM, Alonso M, Gonzalez-Abad MJ, Megías G, Rabella N, del Cuerpo M, Gozalo-Margüello M, González-Praetorius A, Martínez-Sapiña A, Goyanes-Galán MJ, Pilar Romero MP, Calvo C, Antón A, Imaz M, Aranzamendi M, Hernandez Á, Moreno-Docón A, Rey-Cao S, Navascuences A, Otero A, Cabrerizo M.

Euro Surveill. 2019 Feb; 24 (7): pii=1800089.

ISI Journal Citation Reports Ranking © 2017: Decil 1.

Impact factor 2017: 7,127.

Sisè article:

Pediatric Brainstem Encephalitis Outbreak Investigation with Metagenomic Next-Generation Sequencing.

Leon KE, **Casas-Alba D**, Ramesh A, Khan LM, Launes C, Sample HA, Zorn CK, Valero-Rello A, Langelier C, Muñoz-Almagro C, DeRisi JL, Wilson MR.

Manuscrit en preparació: bioRxiv 414979 [Preprint]. 2018 Set. Disponible a: <https://doi.org/10.1101/414979>

9.1 Cinquè article

Molecular epidemiology of an enterovirus A71 outbreak associated with severe neurological disease, Spain, 2016.

Gonzalez-Sanz R, Casas-Alba D, Launes C, Muñoz-Almagro C, Ruiz-García M, Gonzalez-Abad MJ, Alonso M, Megias G, Rabella N, del Cuerpo M, Gozalo-Margüello M, González-Praetorius A, Martínez-Sapiña A, Goyanes-Galán MJ, Pilar Romero MP, Calvo C, Antón A, Imaz M, Aranzamendi M, Hernandez Á, Moreno-Docón A, Cao SR, Navascuences A, Otero A, Cabrerizo M.

Article publicat a:

Euro Surveill. 2019 Feb; 24 (7): pii=1800089.

RESEARCH

Molecular epidemiology of an enterovirus A71 outbreak associated with severe neurological disease, Spain, 2016

Rubén González-Sanz¹, Dídac Casas-Alba², Cristian Launes^{2,20}, Carmen Muñoz-Almagro^{2,19,20}, María Montserrat Ruiz-García³, Mercedes Alonso⁴, María José González-Abad⁴, Gregoria Megías⁵, Nuria Rabella⁶, Margarita del Cuerdo⁶, Mónica Gozalo-Margüello⁷, Alejandro González-Praetorius⁸, Ana Martínez-Sapiña⁹, María José Goyanes-Galán¹⁰, María Pilar Romero^{11,21}, Cristina Calvo^{11,21}, Andrés Antón¹², Manuel Imaz¹³, Maitane Aranzamendi¹⁴, Águeda Hernández-Rodríguez¹⁵, Antonio Moreno-Docón¹⁶, Sonia Rey-Cao¹⁷, Ana Navascués¹⁸, Almudena Otero^{11,21}, María Cabrerizo^{11,20,21}

1. Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain
2. Institut de Recerca Sant Joan de Déu, Barcelona, Spain
3. Hospital General de Elche, Alicante, Spain
4. Hospital Infantil Universitario Niño Jesús, Madrid, Spain
5. Complejo Hospitalario de Burgos, Burgos, Spain
6. Hospital Santa Creu i Sant Pau, Barcelona, Spain
7. Hospital Universitario Marqués de Valdecilla, Santander, Spain
8. Hospital Universitario de Guadalajara, Guadalajara, Spain
9. Hospital Miguel Servet, Zaragoza, Spain
10. Hospital Gregorio Marañón, Madrid, Spain
11. Hospital Universitario La Paz, Fundación IdiPaz, Madrid, Spain
12. Hospital Universitari Vall d'Hebron, Barcelona, Spain
13. Hospital de Basurto, Bilbao, Spain
14. Hospital de Cruces, Bilbao, Spain
15. Microbiology Service, University Hospital "Germans Trias i Pujol", Department of Genetics and Microbiology, Autonomous University of Barcelona, Badalona, Spain
16. Hospital Universitario Virgen de la Arrixaca, Murcia, Spain
17. Hospital General de Vigo, Vigo, Spain
18. Complejo Hospitalario de Navarra, Pamplona, Spain
19. Universitat Internacional de Catalunya, Barcelona, Spain
20. CIBER de epidemiología y Salud Pública, CIBERESP, Madrid, Spain
21. Translational Research Network in Paediatric Infectious Diseases (RITIP), IdiPaz, Madrid, Spain

Correspondence: Rubén González-Sanz (ruben.gs@isciii.es)

Citation style for this article:

González-Sanz Rubén, Casas-Alba Dídac, Launes Cristian, Muñoz-Almagro Carmen, Ruiz-García María Montserrat, Alonso Mercedes, González-Abad María José, Megías Gregoria, Rabella Nuria, del Cuerdo Margarita, Gozalo-Margüello Mónica, González-Praetorius Alejandro, Martínez-Sapiña Ana, Goyanes-Galán María José, Romero María Pilar, Calvo Cristina, Antón Andrés, Imaz Manuel, Aranzamendi Maitane, Hernández-Rodríguez Águeda, Moreno-Docón Antonio, Rey-Cao Sonia, Navascués Ana, Otero Almudena, Cabrerizo María. Molecular epidemiology of an enterovirus A71 outbreak associated with severe neurological disease, Spain, 2016. *Euro Surveill.* 2019;24(7):pii=1800089. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2019.24.7.1800089>

Article submitted on 27 Feb 2018 / accepted on 09 Jul 2018 / published on 14 Feb 2019

Introduction: Enterovirus A71 (EV-A71) is an emerging pathogen that causes a wide range of disorders including severe neurological manifestations. In the past 20 years, this virus has been associated with large outbreaks of hand, foot and mouth disease with neurological complications in the Asia-Pacific region, while in Europe mainly sporadic cases have been reported. In spring 2016, however, an EV-A71 outbreak associated with severe neurological cases was reported in Catalonia and spread further to other Spanish regions. **Aim:** Our objective was to investigate the epidemiology and clinical characteristics of the outbreak. **Methods:** We carried out a retrospective study which included 233 EV-A71-positive samples collected during 2016 from hospitalised patients. We analysed the clinical manifestations associated with EV-A71 infections and performed phylogenetic analyses of the 3'-VP1 and 3Dpol regions from all Spanish strains and a set of EV-A71 from other countries. **Results:** Most EV-A71 infections were reported in children (mean age: 2.6 years) and the highest incidence was between May

and July 2016 (83%). Most isolates (218/233) were classified as subgenogroup C1 and 217 of them were grouped in one cluster phylogenetically related to a new recombinant variant strain associated with severe neurological diseases in Germany and France in 2015 and 2016. Moreover, we found a clear association of EV-A71-C1 infection with severe neurological disorders, brainstem encephalitis being the most commonly reported. **Conclusion:** An emerging recombinant variant of EV-A71-C1 was responsible for the large outbreak in 2016 in Spain that was associated with many severe neurological cases.

Introduction

Enterovirus 71 (EV-A71) is a small, non-enveloped, single-stranded RNA virus that belongs to the species Enterovirus A along with 24 other serotypes within the Enterovirus genus [1]. According to the VP1 protein sequence, EV-A71 is classified into six genogroups (A–F) and a number of subgenogroups (Bo–B5, C1–C5) [2]. Although EV-A71 infection is often asymptomatic,

FIGURE 1

Phylogenetic analysis of 3'-VP1 sequences of enterovirus-A71, Spain, 2016 (n = 233) and representatives of different genogroups worldwide



A: Alicante; AV: Ávila; B: Barcelona; CC: Cáceres; EV: enterovirus; M: Madrid; MU: Murcia; Z: Zaragoza.

MEGA 7.0 software was used to construct the neighbour-joining and maximum composite likelihood tree. Bootstrap values > 70% are indicated in the branch nodes. CV-A16 prototype strain G-10 was used as the outgroup. Sequences are labelled with their GenBank accession number, country and year of isolation. Spanish sequences from 2016 are represented by black circles and labelled with identification number, country abbreviation, month and year of isolation and province.

it can cause disorders with a wide range of clinical manifestations from non-specific febrile illness, aseptic meningitis and mild mucocutaneous symptoms to severe neurological diseases such as brainstem encephalitis and acute flaccid paralysis (AFP) [3,4].

EV-A71 is distributed worldwide. However, the largest outbreaks associated with hand, foot and mouth disease (HFMD) with subsequent neurological and cardiopulmonary complications have been described in the Asia-Pacific region, especially in the past 20 years [2,5-7]. These outbreaks have been connected to the circulation of different subgenogroups (B3, B4, C1, C2 and C4) [8-14]. In Europe, although outbreaks of polio-like disease occurred in Hungary and Bulgaria in the 1970s [15,16], only sporadic cases have been reported from several countries in recent years, mainly caused by the C1 and C2 subgenogroups [2,17].

In 2015, a new recombinant EV-A71 variant was identified that affected at least 19 young children in different areas of Germany [18]. This infection was associated with neurological manifestations (cerebral seizures, myoclonia and ataxia) that required hospitalisation. There were no reports of fatal cases or clinical sequelae after hospital discharge. Moreover, a well-documented case, a 2-year-old girl, required hospitalisation and was diagnosed with brainstem encephalitis and cardiopulmonary complications with an outcome of a probable persistent neurological impairment [19]. In addition, 18 cases of severe neurological disease associated with EV-A71 infection, and phylogenetically closely related to the strains described in Germany, were reported in France between May and October 2016. Patients presented with rhombencephalitis, encephalitis or encephalomyelitis, and one fatal case of acute cardiac failure was reported [20]. The same strain was also involved in a sporadic case of encephalitis in Poland during summer 2016 [21].

In Spain, EV-A71 was circulating at a very low rate until 2015 [22,23]. In the spring of 2016, however, a large outbreak associated with severe neurological diseases was reported in the region of Catalonia [24-26] and further disseminated to the rest of the country.

In the present study, we investigated the clinical manifestations of EV-A71 infections and the molecular epidemiology and geographical spread of the strains detected in Spain in 2016, comparing them to strains circulating in Spain and other countries in recent years.

Methods

Enterovirus surveillance system

The Spanish National Reference Laboratory for Enterovirus (SNRLE) conducts the EV surveillance system at a national level. The system is voluntary and EV-positive clinical samples are received for characterisation from patients of all ages admitted to hospitals throughout the country. Each specimen

FIGURE 2

Phylogenetic analysis of 3Dpol sequences of enterovirus-A71, Spain, 2016 (n = 187) and representatives of different members of Enterovirus A species



A: Alicante; AV: Ávila; B: Barcelona; EV: enterovirus; M: Madrid; MU: Murcia; Z: Zaragoza.

MEGA 7.0 software was used to construct the neighbour-joining and maximum composite likelihood tree. Bootstrap values >70% are indicated in the branch nodes. EV-D68 prototype strain Fermon was used as the outgroup. Sequences are labelled with the GenBank accession number, country and year of isolation. Spanish sequences from 2016 are represented by black circles and labelled with country abbreviation, month and year of isolation and province.

is sent with information on patient demographics, clinical diagnosis and date of sample collection. For the purposes of this study, more detailed information about the severity of the symptoms, final diagnosis and outcome was subsequently collected from hospitals for patients with neurological disease. EV-positive samples from paediatric patients who were enrolled in a prospective and multicentre project (Pl15CIII-0020) were also included in the study after informed consent from parents or legal guardians. This project includes 13 representative hospitals in Spain that perform active surveillance of children with neurological and systemic diseases associated with EV and parechovirus infections. In addition, they provide us with extended clinical information about the patients. The procedure to collect and send samples to the SNRLE does not differ from the routine EV surveillance system.

Clinicians defined the severity of the neurological disorders according to their hospital's protocols. For this study, a consensus was reached to define severe neurological diseases according to clinical manifestations; it included encephalitis (encephalitis, meningoencephalitis and brainstem encephalitis), AFP/myelitis, and other motor disorders (ataxia, instability, cerebellitis). Mild neurological disease included patients with aseptic meningitis with a good evolution on their own.

Enterovirus characterisation and phylogenetic analysis

RNA was extracted from clinical samples using the QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN, Germany). EV genotyping was performed using four specific nested RT-PCRs for the species EV-A, B, C and D and further sequencing of the 3'-VP1 region as previously described [27]. In EV-A71-positive samples, the 3Dpol region was amplified and sequenced by specific nested RT-PCR as previously described [28].

We carried out phylogenetic analysis based on 3'-VP1 (359 bp) sequences of EV-71-positive samples. In addition, we performed 3Dpol (738 bp) analysis to confirm possible recombination events [28,29]. Multiple sequence alignments were done in the ClustalW programme. Genetic distances were calculated using the maximum composite likelihood nucleotide distance model, and statistical significance of phylogenies was estimated by bootstrap analysis with 1,000 replicates. Phylogenetic trees were constructed following the neighbour-joining method using MEGA 7.0 software. In the case of 3'VP1, EV-A71 sequences from 2016 were compared with EV-A71 sequences available in GenBank belonging to the C1 and C2 subgenogroups circulating in Spain and other European countries in recent years, along with representative members of the genogroups A, B, C, D, E and F. The coxsackievirus (CV) A16 G-10 prototype strain (CAU05876), a member of Enterovirus A species, was included as an outgroup. For the phylogenetic analysis of 3Dpol, we compared EV-A71 sequences from 2016 with EV-A71 sequences

belonging to subgenogroups C1 and C2 as well as sequences of members of the Enterovirus A species with which recombination events normally occur. The EV-D68 Fermon prototype strain (AY426531), a member of Enterovirus D species, was included as an outgroup.

The sequences obtained in this study have been deposited in GenBank under accession numbers MH394906–MH395138 (VP1 sequences) and MH394719–MH394905 (3Dpol sequences).

Statistical analysis

Significant variations between groups were evaluated using the chi-squared test. A difference with p value < 0.05 was considered to be statistically significant.

Results

Virological findings

During 2016, the SNRLE received 1,113 EV-positive samples (mainly CSF, serum, stools and respiratory samples) from 1,029 patients admitted to different Spanish hospitals with clinical pictures of fever without source (FWS) ($n = 174$; 16.9%), HFMD/exanthema ($n = 52$; 5.1%), respiratory illnesses ($n = 270$; 26.2%), the neurological diseases described above ($n = 470$; 45.7%), and others ($n = 63$; 6.1%). In the case of 84 patients from whom two different positive clinical samples were received, only the specimen with the oldest collection date was included in the study.

After discarding duplicates, 777 EV were typed, EV-A71 being the most common serotype ($n = 233$; 30.0%). The following five most frequent serotypes were EV-D68 ($n = 148$; 19.0%), echovirus (E)-30 ($n = 113$; 14.5%), E-5 ($n = 67$; 8.6%), CV-A6 ($n = 30$; 3.8%) and E-7 ($n = 23$; 3.0%). Three EV-A71-positive patients were co-infected with EV-D68, one with E-7 and one with E-11.

Epidemiological data of patients with enterovirus A71

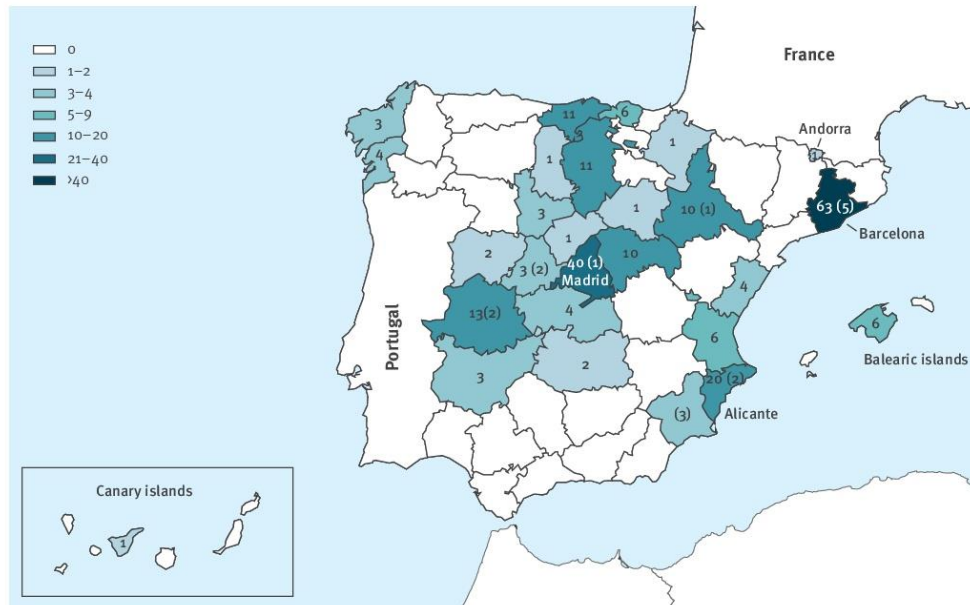
Specimens of EV-A71 were isolated mainly from respiratory ($n = 150$, 64.4%) and stool samples ($n = 71$, 30.5%) but were also detected in cerebrospinal fluid ($n = 8$, 3.4%) and serum ($n = 4$, 1.7%). Both a respiratory and a stool sample were available in 34 EV-A71 cases. EV-A71 was only successfully genotyped from both samples in 15 of these cases. Patients' ages ranged from 1 day to 63 years, with a mean of 2.6 years ($n = 231$ with available information on age; standard deviation (SD) = 5.35; median = 1.86; 95th percentile = 5.9). The male/female sex ratio was 1.5/1. The period from symptom onset to collection date was only provided in 36 cases with a mean of 3.3 days (SD = 1.9; median = 3).

Phylogenetic analysis of enterovirus-A71

The VP1 phylogenetic analysis revealed that most of the Spanish sequences from 2016 (218/233) belonged to subgenogroup C1. Of these, 217 formed a separate group within the C1 cluster together with

FIGURE 3

Geographical distribution of enterovirus-A71 cases, Spain, 2016 (n = 233)



The figure shows the total number of EV-A71 cases reported in each province. EV-A71 cases that were not genotyped as EV-A71-C1 variant are shown in brackets.

sequences from a new recombinant variant described in Germany in 2015 (bootstrap value >95%) (Figure 1, Supplementary Figure S1) [18], while one C1 isolate grouped with EV-A71-C1 sequences from previous years. The remaining 15 sequences were grouped within the subgenogroup C2 cluster.

Because of insufficient sample volume or unsuccessful sequencing, only 187 sequences were available for the 3Dpol phylogenetic analysis. Similarly to the VP1 analysis, most sequences appeared in one differentiated cluster which again included the sequences from Germany in 2015 (bootstrap value >76%) (Figure 2, Supplementary Figure S2). Interestingly, the same sequences that were grouped in the C2 subgenogroup cluster according to the VP1 sequence, were also grouped separately in an interspersed cluster together with C1 and C2 subgenogroups sequences.

Temporal and geographical distribution of enterovirus-A71

The total of 233 EV-A71-positive samples were collected from 45 different hospitals in 26 of the 50 Spanish provinces and from Andorra. Barcelona and Madrid, the most populated provinces in Spain, were the two with the highest number of cases (Figure 3). The first

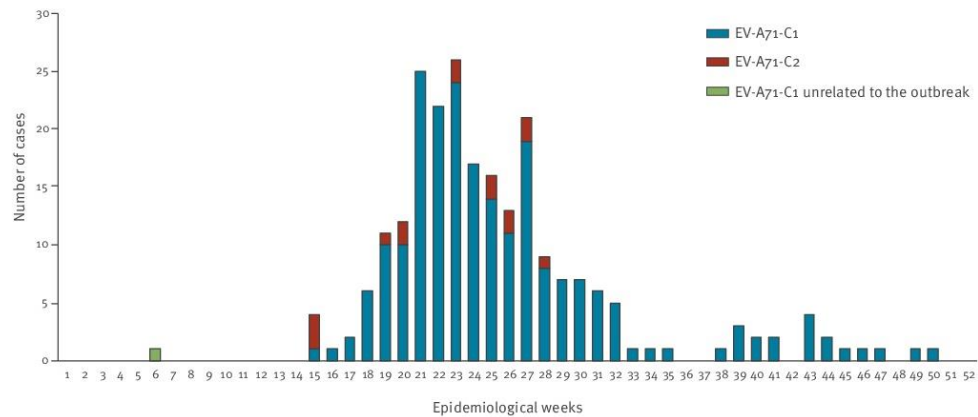
cases of the outbreak (subgenogroup C1-variant) were described in Catalonia in April 2016. From May onwards, the number of cases increased, most of them concentrated between May and July (Figure 4), and spread throughout the country. The last two cases were reported in December. A sporadic case associated to subgenogroup C1 but unrelated to the outbreak was reported in February 2016. The cases associated with the subgenogroup C2 were distributed from April to July (Figure 4).

Clinical presentations of enterovirus-A71 infections

Patients involved in the outbreak (EV-A71-C1-variant; n = 217) were diagnosed with HFMD or herpangina (n=8; 3.7%), FWS (n=14; 6.5%), lower respiratory tract infection (n=17; 7.8%), neurological symptoms (n=167; 77.0%) and other symptoms (n=11; 5.1%) (Table). There was a significantly higher proportion of neurological manifestations with EV-A71-C1-variant infection with severe symptomatology (n=140; 64.5%) compared with those with mild symptomatology (n=27; 12.4%) (p<0.0001) (Table). Among the patients infected with EV-A71-C2, five had mild neurological disease, five had severe neurological disease, three had lower respiratory tract infection and two had FWS.

FIGURE 4

Temporal distribution of enterovirus-A71 cases, by epidemiological week, Spain, 2016 (n = 233)



Data are represented according to the specimen collection date.

The remaining non-outbreak-related EV-A71-C1 case was reported as having FWS (Table).

According to the data provided by hospitals, 22.9% (33/144) of the children with severe neurological diseases required admission to a paediatric intensive care unit and 65.3% of them (94/144) received some treatment (intravenous gamma globulin or/and corticoids). After 90 days of follow-up, 88.2% (n = 127) of them had no significant sequelae.

To confirm the association of EV-A71-C1-variant infection with severity, we analysed the total of severe neurological infections positive for EV during 2016 (n=190). Meningoencephalitis was the most common clinical manifestation (n=79; 41.6%) followed by brainstem encephalitis (n=58; 30.5%), encephalitis (n=26; 13.7%), AFP/myelitis (n=17; 8.9%) and other motor disorders (n=10; 5.3%). EV-A71-C1-variant was responsible for most cases (n=140; 73.7%) compared with EV-A71-C2 (n=5; 2.6%) and other EV types that included EV-D68, E-30, CV-B3, E-5, E-7, CV-A6, E-18, CV-A10, CV-A4, CV-B1, E-20, E-6 and E-9 (n=45; 23.7%) (p<0.001).

Discussion

This study presents the clinical and virological characterisation of the EV-A71 strains reported in Spain in 2016. We identified EV-A71 subgenogroup C1 as responsible for a large outbreak that affected young children throughout Spain in 2016 and the clear association of this infection with severe neurological diseases.

Since the outbreaks of polio-like disease in Bulgaria and Hungary in 1975 and 1978 [15,16], the number of EV-A71-associated neurological diseases has been low

in Europe compared with the Asia-Pacific region, and most documented EV-A71 infections included sporadic cases of febrile illness, HFMD and meningitis [5,6]. However, several cases of EV-A71 infections associated with severe neurological disorders in children were reported in Germany and France during 2015 and 2016 [18-20]. In Spain, an increasing number of EV-A71 infections was noticed in 2016 compared with previous years. From 2000 to 2015, the SNLRE had identified an average of two isolates of EV-A71 per year with a maximum of seven cases in 2012 [22,23,30].

Regarding specimen types, EV-A71 was mainly detected in either respiratory samples or stools (or both). This is in agreement with several studies that claim that EVs are isolated from CSF only in a minority of patients, whereas recovery from peripheral sites such as throat, stool/rectum and vesicle fluid is more common [3,29]. This finding suggests that in severe neurological disease, respiratory and stool specimens, in addition to the CSF and serum samples, should be submitted for EV testing.

According to the 3'-VP1 sequence, most EV-A71 sequences in Spain during 2016 (217/233) showed a high similarity with the German strains reported in 2015 and were classified as subgenogroup C1. The fact that according to the 3Dpol sequence our strains also grouped together with the German strains indicates that it is very probably the same recombinant variant, although whole genome sequencing would be necessary to confirm this hypothesis.

We found an association between infection with this recombinant variant and the severity of the neurological manifestations, consistent with the German and

TABLE

Clinical manifestations among enterovirus-A71 patients, Spain, 2016 (n = 233)

		Number of cases	%	p value	HFMD-associated	
Patients infected with EV-A71-C1 variant (n = 217)						
Neurological disorders	Severe	Brain stem encephalitis	53	64.5	Not applicable	4
		Meningoencephalitis	47			1
		Encephalitis	18			
		AFP/myelitis	12			
		Other motor disorders	10			3
	Mild	Aseptic meningitis	25	12.4	<0.001	4
		Other	2			
Lower respiratory tract infection		17	7.8	<0.001		
Mucocutaneous symptoms		8	3.7	<0.001		
Fever without source		14	6.5	<0.001		
Other		11	5.0	<0.001		
Patients infected with EV-A71-C1 or C2 (n = 16)						
Neurological disorders	Severe	Brain stem encephalitis	2	31.2	Not applicable	
		Meningoencephalitis	3			
	Mild	Aseptic meningitis	5	31.2	0.069	1
Lower respiratory tract infection		3	18.8	0.195		
Fever without source		3	18.8	0.195		

AFP: acute flaccid paralysis; EV: enterovirus; HFMD: hand, foot and mouth disease.

Significant variations between groups were evaluated by chi-squared test; p values comparing the number of cases with severe neurological disorders with the remaining clinical manifestations are shown.

French reports [18-20]. In addition, most patients did not present HFMD before developing neurological manifestations (Table), also in agreement with the German and French reports but not with the numerous publications from outbreaks in Asia-Pacific in recent years [31-34]. Several clinical features such as young age or fever have been associated with severe neurological EV-A71 disease [3]. On the other hand, the absence of mucocutaneous ulcers that we saw in patients in our study has not been related to the development of complicated or fatal cases by other studies [3]. Interestingly, most of the 15 EV-A71-C2 cases and the one EV-A71-C1 case unrelated to the outbreak were not associated with severe neurological disease. Since no particular genogroup has been conclusively associated with greater virulence or certain clinical manifestations [5,35] and taking into account that in most cases, host factors play a determining role in the development of the disease, further experiments would need to be performed in order to describe the viral determinants responsible for this new recombinant strain being associated with severe neurological pathology.

The reason why the same recombinant variant caused such a large outbreak in Spain, while only a limited number of cases were reported in Germany and France, remains unknown. Large epidemics have been associated with genogroup replacement [5,36,37]. This would be in agreement with the low circulation of subgenogroup C1 in Spain before 2016 [22,23,30] in contrast to the situation in Germany and France [2,17,38,39]. Low seroprevalence against EV-A71 in a

specific area may facilitate the emergence of a strain that causes an outbreak, especially in young children [40]. However, as non-polio EV infection is not a notifiable disease in Spain and asymptomatic strains may have been circulating during recent years, the real number of EV-A71 infections could be underestimated. Unfortunately, no seroprevalence studies are available in Spain to confirm this hypothesis. It is important to highlight that we have identified sporadic cases associated with this EV-A71-C1 variant in 2017 and 2018 (data not shown), indicating that this variant is still circulating in Spain, but with lower incidence. The seasonality of the cases during 2016, including C1 and C2 subgenogroups, was similar to previously described epidemics of EV in Spain [22,23,30]. Moreover, the geographical distribution of the outbreak indicates that it was not restricted to the region of Catalonia, but distributed throughout Spain.

As more severe neurological cases occurred during this outbreak, there was concern among the population, the media and health professionals. Because of this concern, there was constant communication among microbiologists, epidemiologists and clinical paediatricians at national level, in which the National Centre for Microbiology was involved. For this reason, we strongly believe that we studied a large and representative number of cases although we have the limitation of not being able to know with certainty the final number of cases of the outbreak. In addition, it should be noted that we were informed that most severe cases were diagnosed virologically, and only some

mild cases were missed [41]. On the other hand, since the Spanish surveillance system is voluntary, there is a risk of having a bias because hospitals are more likely to send samples of severe patients. As mentioned above, 777 EV-positive samples were genotyped at the SNLRE during 2016. Of those, only 190 (25%) belonged to patients with severe neurological disorders. The fact that most samples received in the laboratory during 2016 were from patients with mild symptoms, as well as in previous years, minimises this risk.

Another limitation of our study could be that hospitals may have a bias towards reporting cases in children. Since EV infections are clearly associated with children, it seems that this is a bias that cannot be prevented; however, samples from patients of all ages were received in 2016. Our laboratory has previously described the association of some serotypes with different age groups [23]. Our results suggest an association of infection with EV-A71-C1 variant in young children.

Finally, more Spanish regions could have been affected for which we may not have had data, either because some hospitals did not send samples or because some samples received from reference hospitals, mostly in Barcelona and Madrid, belonged to patients admitted from the surrounding regions. For the purposes of this study, we selected the affected regions according to the hospitals that sent the clinical samples. This is the reason why, for instance, Barcelona is the only province of the region of Catalonia in which the cases were reported.

Conclusion

In summary, our results show that an emerging EV-A71-C1 strain was responsible for the outbreak in Spain during 2016 and was associated with many severe neurological cases, the largest outbreak in Europe in recent years. This is the first time that this EV-A71-C1 variant has been detected in Spain and it could have its origin in strains from other European countries such as Germany or France. Since poliovirus eradication is a reasonable goal in the short term, surveillance of non-polio EV associated with neurological implications becomes crucial, especially in cases such as EV-A71 infection where no treatments or vaccines are available. In this sense, the recently established European Non-Polio-Enterovirus Network [29] can contribute to standardising methods for EV detection and typing, clarifying the most adequate specimens for testing according to the clinical presentation and, ultimately, monitoring the global circulation of EV types. Our findings highlight the importance of EV surveillance in order to identify new recombinant forms of known EV types and monitor their associated disease burden, their molecular epidemiology and geographical distribution.

Acknowledgements

We wish to thank I Bustillo, H del Pozo and P Higuera for their technical assistance. We also sincerely wish to thank all technical staff from microbiology departments and medical staff from paediatrics departments from all participating hospitals. Some of the samples are included in an ongoing project (P15CIII-00020) which was supported by a grant by the Health Research System (AES).

Conflict of interest

None declared.

Authors' contributions

M^a Montserrat Ruiz-García, María José González-Abad, Mercedes Alonso, Gregoria Megías, Nuria Rabella, Margarita del Cuerpo, Mónica Gozalo-Margüello, Alejandro González-Praetorius, Ana Martínez-Sapiña, María José Goyanes-Galán, María Pilar Romero, Andrés Antón, Manuel Imaz, Maitane Aranzamendi, Antonio Moreno-Docón, Sonia Rey Cao and Ana Navascués: contribution of samples and clinical data, performance of the experiments. Didac Casas-Alba and Águeda Hernández-Rodríguez: contribution of samples and clinical data and revising the article. Cristian Launes, Carmen Muñoz-Almagro and Cristina Calvo: study concept and design, contribution of samples and clinical data and revising the article. Almudena Otero: performance of the experiments. Rubén González-Sanz and María Cabrerizo: study concept and design, performance of the experiments, analysis of the data and preparation of manuscript.

References

1. Zell R, Delwart E, Gorbalenya AE, Hovi T, King AMQ, Knowles NJ, et al. ICTV virus taxonomy profile: Picornaviridae. *J Gen Virol.* 2017;98(10):2421-2. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.000911> PMID: 28884666
2. Hassel C, Mirand A, Lukashev A, TerletskaiaLadwig E, Farkas A, Schuffenecker I, et al. Transmission patterns of human enterovirus 71 to, from and among European countries, 2003 to 2013. *Euro Surveill.* 2015;20(34):30005. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2015.20.34.30005> PMID: 26530407
3. Doi MH, Wong SC, Lewthwaite P, Cardoso MJ, Solomon T. Clinical features, diagnosis, and management of enterovirus 71. *Lancet Neurol.* 2010;9(11):1097-105. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(10\)70209-X](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(10)70209-X) PMID: 20965438
4. Lee KY. Enterovirus 71 infection and neurological complications. *Korean J Pediatr.* 2016;59(10):395-401. <https://doi.org/10.3345/kjpp.2016.59.10.395> PMID: 27826325
5. Yip CC, Lau SK, Woo PC, Yuen KY. Human enterovirus 71 epidemics: what's next? *Emerg Health Threats J.* 2013;6(1):19780. <https://doi.org/10.3402/ehlt.v6i0.19780> PMID: 24119538
6. McMinn PC. Recent advances in the molecular epidemiology and control of human enterovirus 71 infection. *Curr Opin Virol.* 2012;2(2):199-205. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2012.02.009> PMID: 22482716
7. Tee KK, Lam TT, Chan YF, Bible JM, Kamarulzaman A, Tong CY, et al. Evolutionary genetics of human enterovirus 71: origin, population dynamics, natural selection, and seasonal periodicity of the VP1 gene. *J Virol.* 2010;84(7):3339-50. <https://doi.org/10.1128/JVI.01019-09> PMID: 20089660
8. Cardoso MJ, Perera D, Brown BA, Cheon D, Chan HM, Chan KP, et al. Molecular epidemiology of human enterovirus 71 strains and recent outbreaks in the Asia-Pacific region: comparative analysis of the VP1 and VP4 genes. *Emerg Infect Dis.* 2003;9(4):461-8. <https://doi.org/10.3201/eid0904.020395> PMID: 12702227
9. Chan KP, Goh KT, Chong CY, Teo ES, Lau G, Ling AE. Epidemic hand, foot and mouth disease caused by human enterovirus 71, Singapore. *Emerg Infect Dis.* 2003;9(1):78-85. <https://doi.org/10.3201/eid1301.020112> PMID: 12533285
10. McMinn P, Lindsay K, Perera D, Chan HM, Chan KP, Cardoso MJ. Phylogenetic analysis of enterovirus 71 strains isolated during linked epidemics in Malaysia, Singapore, and Western Australia. *J Virol.* 2001;75(16):7732-8. <https://doi.org/10.1128/JVI.75.16.7732-7738.2001> PMID: 11462047

11. Donato C, Hoi T, Hoa NT, Hoa TM, Van Duyet L, Dieu Ngan TT, et al. Genetic characterization of Enterovirus 71 strains circulating in Vietnam in 2012. *Virology*. 2016;495:1-9. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2016.04.026> PMID: 27148893
12. AbuBakar S, Sam IC, Yusof J, Lim MK, Misbah S, MatRahim N, et al. Enterovirus 71 outbreak, Brunei. *Emerg Infect Dis*. 2009;15(3):79-82. <https://doi.org/10.3201/eid1501.080264> PMID: 19116058
13. Fujimoto T, Chikahira M, Yoshida S, Ebara H, Hasegawa A, Totsuka A, et al. Outbreak of central nervous system disease associated with hand, foot, and mouth disease in Japan during the summer of 2000: detection and molecular epidemiology of enterovirus 71. *Microbiol Immunol*. 2002;46(9):621-7. <https://doi.org/10.1111/j.1348-0421.2002.tb02743.x> PMID: 12437029
14. Chang PC, Chen SC, Chen KT. The current status of the disease caused by enterovirus 71 infections: epidemiology, pathogenesis, molecular epidemiology, and vaccine development. *Int J Environ Res Public Health*. 2016;13(9):E890. <https://doi.org/10.3390/ijerph13090890> PMID: 27618078
15. Chumakov M, Voroshilova M, Shindarov L, Lavrova I, Gracheva L, Koroleva G, et al. Enterovirus 71 isolated from cases of epidemic poliomyelitis-like disease in Bulgaria. *Arch Virol*. 1979;60(3-4):329-40. <https://doi.org/10.1007/BF01317504> PMID: 228639
16. Nagy G, Takátsy S, Kukán E, Mihály I, Dömök I. Virological diagnosis of enterovirus type 71 infections: experiences gained during an epidemic of acute CNS diseases in Hungary in 1978. *Arch Virol*. 1982;71(3):217-27. <https://doi.org/10.1007/BF01314873> PMID: 6285858
17. Mirand A, Schuffenecker I, Henquell C, Billaud G, Jugie G, Falcon D, et al. Phylogenetic evidence for a recent spread of two populations of human enterovirus 71 in European countries. *J Gen Virol*. 2010;91(Pt 9):2263-77. <https://doi.org/10.1099/vir.0.021741-0> PMID: 20505012
18. 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;22(10):1843-6. <https://doi.org/10.3201/eid2210.160357> PMID: 27439117
19. Karrasch M, Fischer E, Scholten M, Sauerbrei A, Henke A, Renz DM, et al. A severe pediatric infection with a novel enterovirus A71 strain, Thuringia, Germany. *J Clin Virol*. 2016;84:90-5. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2016.09.007> PMID: 27771495
20. Antona D, Kossorotoff M, Schuffenecker I, Mirand A, Leruez-Ville M, Bassi C, et al. Severe paediatric conditions linked with EV-A71 and EV-D68, France, May to October 2016. *Euro Surveill*. 2016;21(46):30402. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2016.21.46.30402> PMID: 27918268
21. Wiecek M, Purzyńska M, Krzysztośzek A, Ciąćka A, Figas A, Szeborn L. Genetic characterization of enterovirus A71 isolates from severe neurological cases in Poland. *J Med Virol*. 2018;90(2):372-6. <https://doi.org/10.1002/jmv.24958> PMID: 28960454
22. Cabrerizo M, Tarragó D, Muñoz-Almagro C, Del Amo E, Domínguez-Gil M, Eiros JM, et al. Molecular epidemiology of enterovirus 71, coxsackievirus A16 and A6 associated with hand, foot and mouth disease in Spain. *Clin Microbiol Infect*. 2014;20(3):O150-6. <https://doi.org/10.1111/1469-0691.12361> PMID: 24033818
23. Cabrerizo M, Díaz-Cerio M, Muñoz-Almagro C, Rabella N, Tarragó D, Romero MP, et al. Molecular epidemiology of enterovirus and parechovirus infections according to patient age over a 4-year period in Spain. *J Med Virol*. 2017;89(3):435-42. <https://doi.org/10.1002/jmv.24658> PMID: 27505281
24. Casas-Alba D, de Sevilla MF, Valero-Rello A, Fortuny C, García-García JJ, Ortez C, et al. Outbreak of brainstem encephalitis associated with enterovirus-A71 in Catalonia, Spain (2016): a clinical observational study in a children's reference centre in Catalonia. *Clin Microbiol Infect*. 2017;23(11):874-81. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2017.03.016> PMID: 28344164
25. European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). Outbreak of enterovirus A71 with severe neurological symptoms among children in Catalonia, Spain. 14 June 2016. Stockholm: ECDC. 2016. Available from: <http://ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/07-06-2016-RRA-Enterovirus%2071-Spain.pdf>
26. European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). Rapid risk assessment. Enterovirus detection associated with severe neurological symptoms in children and adults in European countries. Stockholm: ECDC. 2016. Available from: <http://ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/01-08-2016-RRA-Enterovirus%2071-Spain,%20France,%20Netherlands.pdf>
27. Casas I, Tenorio A, Echevarría JM, Klapper PE, Cleator GM. Detection of enteroviral RNA and specific DNA of herpesviruses by multiplex genome amplification. *J Virol Methods*. 1997;66(1):39-50. [https://doi.org/10.1016/S0166-0934\(97\)00035-9](https://doi.org/10.1016/S0166-0934(97)00035-9) PMID: 9220389
28. McWilliam Leitch EC, Cabrerizo M, Cardoso J, Harvala H, Ivanova OE, Koike S, et al. The association of recombination events in the founding and emergence of subgroup evolutionary lineages of human enterovirus 71. *J Virol*. 2012;86(5):2676-85. <https://doi.org/10.1128/JVI.06065-11> PMID: 22205739
29. Harvala H, Broberg E, Benschop K, Berginc N, Ladhani S, Susi P, et al. Recommendations for enterovirus diagnostics and characterisation within and beyond Europe. *J Clin Virol*. 2018;101:11-7. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2018.01.008> PMID: 29414181
30. Trallero G, Avellon A, Otero A, De Miguel T, Pérez C, Rabella N, et al. Enteroviruses in Spain over the decade 1998-2007: virological and epidemiological studies. *J Clin Virol*. 2010;47(2):170-6. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2009.11.013> PMID: 20007023
31. Ho M, Chen ER, Hsu KH, Twu SJ, Chen KT, Tsai SF, et al. An epidemic of enterovirus 71 infection in Taiwan. *N Engl J Med*. 1999;341(13):929-35. <https://doi.org/10.1056/NEJM199909233411301> PMID: 10498487
32. Koh WM, Bogich T, Siegel K, Jin J, Chong EY, Tan CY, et al. The epidemiology of hand, foot and mouth disease in Asia: a systematic review and analysis. *Pediatr Infect Dis J*. 2016;35(10):e285-300. <https://doi.org/10.1097/INF.0000000000001242> PMID: 27273688
33. Zhu FC, Meng FY, Li JX, Li XL, Mao QY, Tao H, et al. Efficacy, safety, and immunology of an inactivated alum-adsorbed enterovirus 71 vaccine in children in China: a multicentre, randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet*. 2013;381(9882):2024-32. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(13\)61049-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(13)61049-1) PMID: 23726161
34. Duong V, Mey C, Eloit M, Zhu H, Danet L, Huang Z, et al. Molecular epidemiology of human enterovirus 71 at the origin of an epidemic of fatal hand, foot and mouth disease cases in Cambodia. *Emerg Microbes Infect*. 2016;5(9):e104. <https://doi.org/10.1038/emmi.2016.101> PMID: 27651091
35. Bible JM, Pantelidis P, Chan PK, Tong CY. Genetic evolution of enterovirus 71: epidemiological and pathological implications. *Rev Med Virol*. 2007;17(6):371-9. <https://doi.org/10.1002/rmv.538> PMID: 17487831
36. Solomon T, Willison H. Infectious causes of acute flaccid paralysis. *Curr Opin Infect Dis*. 2003;16(5):375-81. <https://doi.org/10.1097/00001432-200310000-00002> PMID: 14501988
37. NikNadia N, Sam IC, Rampal S, WanNorAmalina W, NurAtifah G, Verasahib K, et al. Cyclical patterns of hand, foot and mouth disease caused by enterovirus A71 in Malaysia. *PLoS Negl Trop Dis*. 2016;10(3):e0004562. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004562> PMID: 27010319
38. Rabenau HF, Richter M, Doerr HW. Hand, foot and mouth disease: seroprevalence of Coxsackie A16 and Enterovirus 71 in Germany. *Med Microbiol Immunol (Berl)*. 2010;199(1):45-51. <https://doi.org/10.1007/s00430-009-0133-6> PMID: 19941005
39. Schuffenecker I, Mirand A, Antona D, Henquell C, Chomel JJ, Archimbaud C, et al. Epidemiology of human enterovirus 71 infections in France, 2000-2009. *J Clin Virol*. 2011;50(1):50-6. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2010.09.019> PMID: 21035387
40. Akhmadshina LV, Govorukhina MV, Kovalev EV, Nenadskaya SA, Ivanova OE, Lukashev AN. Enterovirus A71 meningoencephalitis outbreak, Rostov-on-Don, Russia, 2013. *Emerg Infect Dis*. 2015;21(8):1440-3. <https://doi.org/10.3201/eid2108.141084> PMID: 26196217
41. Wörner N, Rodrigo R, Castellarnau E, Sanz-Santaeufemia FJ, Ferrer G, Rincón López E, et al. First outbreak of enterovirus related brainstem encephalitis in western Europe: characterization, management and evolution of the patients (ESP17-0352). Annual ESPID Meeting, Madrid, 2017.

License and copyright

This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution (CC BY 4.0) Licence. You may share and adapt the material, but must give appropriate credit to the source, provide a link to the licence, and indicate if changes were made.

This article is copyright of the authors or their affiliated institutions, 2019.

9.1.1 Resum del cinquè article

Es tracta d'un estudi observacional prospectiu multicèntric (70 hospitals de 35 províncies d'Espanya i Andorra) coordinat per la Unitat d'EV del Centre Nacional de Microbiologia, en el que es van incloure els pacients ingressats amb patologies neurològiques i sistèmiques amb detecció d'EV en alguna mostra i absència d'altra etiologia plausible, entre gener i desembre de 2016. La inclusió dels pacients des de cadascun dels hospitals participants va ser voluntària. Es van recollir dades epidemiològiques i clíniques. Es van classificar les patologies neurològiques en greus (encefalitis, meningoencefalitis, encefalitis de tronc, PFA i altres alteracions motores) i lleus (meningitis asèptica). Es van analitzar les manifestacions clíniques associades amb EV-A71. Es va realitzar l'anàlisi filogenètica de la regió 3'-VP1 i 3Dpol d'EV-A71 de les soques espanyoles i d'un nombre representatiu de soques d'altres països.

El Laboratori Nacional Espanyol de Referència per EV (Centre Nacional de Microbiologia, Institut de Salut Carles III) coordina la vigilància d'EV a nivell nacional.

Els resultats d'aquest cinquè estudi són:

1. Troballes microbiològiques:

1.1. El Laboratori Nacional Espanyol de Referència per a EV va rebre 1113 mostres positives per a EV de 1029 pacients amb febre sense focus, MBMP, patologies respiratòries i neurològiques.

1.2. Es van poder tipificar 777 EV. L'EV-A71 va ser el genotip més freqüent (n=233, 30%), seguit per EV-D68 (n=148, 19%), E-30 (n=113, 15%), E-5 (n=67, 9%), CV-A6 (n=30, 4%) i E-7 (n=23, 3%).

1.3. Tres pacients amb EV-A71 estaven coinfectats per EV-D68, E-7 i E-11, respectivament.

1.4. L'EV-A71 es va aïllar de mostres respiratòries (n=150, 64%) i fecals (n=71, 31%), però també de LCR (n=8, 3,4%) i plasma (1,7%).

1.5. Entre els pacients amb infecció per EV-A71, l'edat mitja va ser de 2,6 anys (desviació estàndard 5,4) i la taxa home/dona va ser de 1,5/1.

2. Tipificació i anàlisi filogenètica de l'EV-A71:

2.1. L'anàlisi de la regió 3'-VP1 va mostrar que la majoria de soques d'EV-A71 (218/233) pertanyien al subgenotip C1. A més, l'anàlisi filogenètica va permetre identificar que la majoria de soques d'EV-A71 C1 (217/218) formaven una subclasse de la soca variant alemanya detectada l'any 2015^{72,169}. La resta de soques pertanyien al subgenotip C2 (15/233).

2.2. L'anàlisi filogenètica de la regió 3Dpol va mostrar resultats similars, excepte pel que fa a les seqüències agrupades en el subgenotip C2 mitjançant anàlisi de 3'-VP1, que van quedar agrupades en un punt mig entre C1 i C2.

3. Distribució geogràfica i temporal de l'EV-A71:

3.1. Durant l'any 2016, es van analitzar 233 mostres positives per a EV-A71, provinents de 45 hospitals de 26 províncies d'Espanya i Andorra. Barcelona i Madrid van aportar la majoria de casos.

3.2. Els primers casos del brot (subgenotip C1) es van descriure a Catalunya a l'abril. Entre maig i juliol van tenir lloc la majoria de casos i el brot es va estendre a la resta del país.

4. Manifestacions clíniques de l'EV-A71:

4.1. Els pacients afectes pel brot d'infecció per EV-A71 van presentar patologia neurològica (n=167, 77%), infecció respiratòria de vies baixes (n=17, 8%), febre sense focus (n=14, 7%) i MBMP o herpangina (n=8, 4%).

4.2. L'EV-A71 C1 va ser responsable de la majoria de casos de patologies neurològiques greus, comparat amb l'EV-A71 C2 i la resta de genotips d'EV ($p < 0,001$).

4.3. Entre els pacients amb patologia neurològica greu per EV-A71 C1, el 23% va precisar ingrés a UCI-P i el 65% va rebre tractament amb IGIV i/o corticoides. Després de 90 dies de seguiment, el 88% no presentava seqüeles neurològiques.

4.4. Entre els pacients amb infecció per EV-A71 C2 ($n=15$), cinc (33%) van presentar patologies neurològiques lleus, cinc (33%) patologies neurològiques greus, tres infecció respiratòria de vies baixes (20%) i dos (13%) febre sense focus.

9.2 Sisè article:

Pediatric Brainstem Encephalitis Outbreak Investigation with Metagenomic Next-Generation Sequencing.

Leon KE, **Casas-Alba D**, Ramesh A, Khan LM, Launes C, Sample HA, Zorn CK, Valero-Rello A, Langelier C, Muñoz-Almagro C, DeRisi JL, Wilson MR.

Manuscrit en preparació: bioRxiv 414979 [Preprint]. 2018 Set. Disponible a:
<https://doi.org/10.1101/414979>

1 **TITLE: Pediatric Brainstem Encephalitis Outbreak Investigation with Metagenomic Next-**
2 **Generation Sequencing**

3

4 Kristoffer E. Leon, B.S.^a, Didac Casas-Alba, M.D.^b, Akshaya Ramesh, Ph.D.^{c,d}, Lillian M. Khan,
5 B.S.^e, Cristian Launes, M.D., Ph.D.^{b,f,g}, Hannah A. Sample, B.S.^e, Kelsey C. Zorn, M.H.S.^e, Ana
6 Valero-Rello, Ph.D.^b, Charles Langelier, M.D.^h, Carmen Muñoz-Almagro, M.D., Ph.D.^{b,f,i}, Joseph L.
7 DeRisi, Ph.D.^{e,j}, Michael R. Wilson, M.D., M.A.S.^{c,d#}

8

9 **Affiliations:**

10 ^aMedical Scientist Training Program, University of California, San Francisco

11 ^bInstitut de Recerca Pediàtrica Hospital Sant Joan de Déu, Barcelona, Spain

12 ^cUCSF Weill Institute for Neurosciences, San Francisco, CA, USA

13 ^dDepartment of Neurology, University of California, San Francisco, CA, USA

14 ^eDepartment of Biochemistry and Biophysics, University of California, San Francisco, CA, USA

15 ^fCIBER Epidemiología y Salud Pública (CIBERESP), Health Institute Carlos III, Madrid, Spain

16 ^gDepartment of Pediatrics, Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain

17 ^hDivision of Infectious Diseases, Department of Medicine, University of California, San
18 Francisco, CA, USA

19 ⁱDepartment of Medicine. Universitat Internacional de Catalunya, Barcelona. Spain

20 ^jChan Zuckerberg Biohub, San Francisco, CA, USA

21

22 **Keywords:** Metagenomic Next-Generation Sequencing, Enterovirus A-71, Brainstem

23 Encephalitis, Viral meningitis, Viral encephalitis

24

25 **Running title: mNGS of Pediatric Brainstem Encephalitis**

26

27 #Corresponding Author

28 Michael Wilson

29 675 Nelson Rising Lane, Campus Box 3206

30 San Francisco, CA

31 michael.wilson@ucsf.edu

32 Phone: 415-502-7429

33 Manuscript Word Count: 2639 | Abstract Word Count: 249

34

35

36

37

38

39

40

41

42

43

44 **Abstract**

45 In 2016, Catalonia experienced a pediatric brainstem encephalitis outbreak caused by
46 enterovirus A71 (EV-A71). Conventional testing identified EV in peripheral body sites, but EV
47 was rarely identified in cerebrospinal fluid (CSF). RNA was extracted from CSF (n=20), plasma
48 (n=9), stool (n=15) and nasopharyngeal samples (n=16) from 10 children with brainstem
49 encephalitis or encephalomyelitis and 10 contemporaneous pediatric controls with presumed
50 viral meningitis or encephalitis. Unbiased complementary DNA libraries were sequenced, and
51 microbial pathogens were identified using a custom bioinformatics pipeline. Full-length virus
52 genomes were assembled for phylogenetic analyses. Metagenomic next-generation sequencing
53 (mNGS) was concordant with qRT-PCR for all samples positive by PCR (n=25). In virus-negative
54 samples (n=35), mNGS detected virus in 28.6% (n=10), including 5 CSF samples. mNGS co-
55 detected EV-A71 and another EV in 5 patients. Overall, mNGS increased the proportion of EV-
56 positive samples from 42% (25/60) to 57% (34/60) (McNemar's test; p-value = 0.0077). For CSF,
57 mNGS doubled the number of pathogen-positive samples (McNemar's test; p-value = 0.074).
58 Using phylogenetic analysis, the outbreak EV-A71 clustered with a neuroinvasive German EV-
59 A71 isolate. Brainstem encephalitis specific, non-synonymous EV-A71 single nucleotide variants
60 were not identified. mNGS demonstrated 100% concordance with clinical qRT-PCR of EV-
61 related brainstem encephalitis and significantly increased the detection of enteroviruses. Our
62 findings increase the probability that neurologic complications observed were virus-induced
63 rather than para-infectious. A comprehensive genomic analysis confirmed that the EV-A71
64 outbreak strain was closely related to a neuroinvasive German EV-A71 isolate. There were no

65 clear-cut viral genomic differences that discriminated between patients with differing
66 neurologic phenotypes.

67 **Introduction**

68 In early 2016, an outbreak of enterovirus A71 (EV-A71) in Catalonia caused more than 100
69 pediatric cases of neurological disease, ranging from aseptic meningitis to brainstem
70 encephalitis with or without myelitis (1). Virological studies of peripheral body fluids (excluding
71 cerebrospinal fluid [CSF]) identified EV-A71 in almost all patients, but other EVs were also found
72 by EV quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (qRT-PCR) during the
73 outbreak, including echovirus-30 (E-30), coxsackievirus (CV)-B1, and CV-A10. The EV-A71 strain
74 was subtyped as subgenogroup C1, and phylogenetic analyses showed it was closely related to
75 an EV-A71 strain associated with a 2015 case of brainstem encephalitis (2, 3). Similar outbreaks
76 occurred in France and Denmark around the same time period (4, 5). EV-A71 was identified
77 from the CSF of 0.02% of patients in the German study, 3% in the Danish study, and 14% in the
78 French study.

79 Despite this information, questions remained about the Catalonia outbreak. In particular,
80 the EV-A71 subgenotype was only identified by standard testing in the CSF of 11% of patients,
81 all of whom had aseptic meningitis (1, 6), raising the possibility that although almost all the
82 children had a documented systemic EV-A71 infection, their neurological sequelae may have
83 been caused by a para-infectious mechanism or by an unidentified co-infection. In addition,
84 standard qRT-PCR assays only recovered a small segment of the EV-A71 genome, limiting the
85 ability to assess for mutations in the virus genome that may have conferred increased
86 neurovirulence.

87 Metagenomic next-generation sequencing (mNGS) of CSF is an assay that can
88 simultaneously identify a broad range of infectious agents – viruses, fungi, bacteria and
89 parasites – in patients with neurological symptoms. As opposed to traditional pathogen-specific
90 PCR assays which amplify only limited regions of a microbe’s genome, the entire genome of a
91 pathogen can often be rapidly surveyed with mNGS, making it possible to identify genomic
92 changes in the virus that may correlate with increased neurovirulence or reveal strain
93 divergence (7). Here, we deployed unbiased mNGS of CSF, nasopharyngeal (NP) samples,
94 plasma and stool obtained from affected children during the Catalonia brainstem encephalitis
95 outbreak to screen for additional pathogens (including co-infections) and to compare EV
96 genomes in patients with brainstem encephalitis to patients with more benign neurologic
97 disease (i.e. meningitis with or without encephalitis with self-limited and short-lasting
98 symptoms).

99

100 **Methods**

101 *Cohort*

102 The first 10 cases diagnosed with brainstem encephalitis or encephalomyelitis with
103 available residual specimen were included as cases, and the first 10 patients with aseptic
104 meningitis or uncomplicated encephalitis diagnosed during the same period were selected as
105 controls. All of these children were admitted to a tertiary pediatric hospital (Hospital Sant Joan
106 de Deu, University of Barcelona) from April to June 2016. Hospital Sant Joan de Deu is a 300-
107 bed tertiary care hospital for high-complexity patients across a catchment area with a pediatric

108 population of ~300,000 and has participated in a Spanish EV molecular surveillance network
109 since 2010.

110 EV-related neurological disease was defined as the detection of EV in any sample in the
111 absence of other causes. The clinical diagnostic approach during the outbreak was previously
112 described (1). The World Health Organization's Guide to Clinical Management and Public Health
113 Response for Hand-Foot-and-Mouth Disease case definitions were used to assign cases and
114 controls, with case definitions defined in Table 1 (8).

115 Patient demographics and clinical syndromes are described in Table 2. De-identified
116 samples from brainstem encephalitis cases (n=10) were obtained including CSF (n=10), plasma
117 (n=7), NP samples (n=9) and stool (n=9). In addition, de-identified samples from controls (n=10)
118 including CSF (n=10), plasma (n=2), NP samples (n=7), and stool (n=6) were transferred to the
119 University of California, San Francisco for research-based mNGS testing (Supplementary Figure
120 1). Among these 60 samples, 35 were EV-negative by clinical Pan-EV qRT-PCR. The Pan-EV qRT-
121 PCR is a one-step RT-PCR amplification with EV primers and probes targeted at a conserved
122 region of the 5' untranslated region, with a limit of detection of 592 genomic equivalents/mL of
123 CSF (9, 10). Patients 1, 3-7 and 9-10, defined as cases, were also negative by the BioFire
124 FilmArray Meningitis/Encephalitis panel (11). All EV-positive patients (by clinical PCR assay)
125 were genotyped at the Enterovirus Unit of the Spanish National Centre for Microbiology using a
126 RT-nested PCR in the 3'-VP1 region specific for species EV-A, B and C, and Sanger sequenced
127 according to a previously described procedure (results reported in Supplemental Figure 1) (12).

128

129 *Metagenomic Sequencing Library Preparation*

130 Samples were received frozen and stored at -80°C. RNA isolation from CSF, serum and NP
131 samples was performed using the RNeasy Micro kit (Qiagen, Germantown, MD). Serum, stool
132 and NP samples were first homogenized with OMNI-International's 2.8mm ceramic bead kit and
133 the TissueLyzer II (Qiagen) for 5 min at 15Hz. Stool was extracted using the RNeasy
134 PowerMicrobiome Kit (Qiagen) on a Qiacube (Qiagen). Sequencing libraries were prepared with
135 New England Biolabs' (NEB; Ipswich, MA) NEBNext RNA First Strand Synthesis Module (E7525)
136 and NEBNext Ultra Directional RNA Second Strand Synthesis Module (E7550) to generate
137 complementary DNA (cDNA). The cDNA was converted to Illumina (San Diego, CA) libraries
138 using the NEBNext Ultra II DNA library preparation kit (E7645) and amplified with 11 PCR cycles.
139 Pre-amplification steps were automated on a Beckman-Coulter Biomek liquid handling robot.
140 The libraries were subjected to Depletion of Abundant Sequences by Hybridization (DASH),
141 described previously, to remove human mitochondrial cDNA (13). The pooled library was size-
142 selected using Ampure beads, and concentration and quality was determined using a Fragment
143 Analyzer (Advanced Analytical Technologies, Inc, Ankeny, IA). Samples were sequenced on an
144 Illumina HiSeq 4000 instrument using 140/140 base pair (bp) paired-end sequencing.

145

146 *Bioinformatics*

147 Sequences were analyzed using a rapid pathogen identification computational pipeline
148 developed by the DeRisi Laboratory, described previously in detail (14). Sequences that mapped
149 to the EV genus were collected and *de novo* assembled using the Geneious and/or St.
150 Petersburg genome Assembler (SPAdes) algorithms (15). Phylogenetic trees were created in
151 Geneious v10.2.3 using a MUltiple Sequences Comparison by Log-Expectation (MUSCLE) or

7

152 Multiple Alignment using Fast Fourier Transform (MAFFT) alignment algorithm followed by the
153 Geneious Tree Builder tool, using the Neighbor-Joining build method (16, 17). Bootstrap
154 analysis for each tree was performed with 100 replicates. For single nucleotide variant (SNV)
155 analysis, Bowtie2 v2.3.3 was used to map reads to a reference and then analyzed using VarScan
156 v2.3.4 (18, 19). Statistics on the degree of concordance between research-based mNGS results
157 and standard clinical diagnostic testing results were performed using McNemar's statistical test.

158 **Results**

159 **Clinical Testing vs mNGS**

160 We obtained an average of 21.8 million (4.53-61.1 million) 140 bp paired-end reads per sample
161 (Supplemental Figure 1). The non-human sequence reads from each sample have been
162 deposited at the National Center for Biotechnology Information (NCBI) Sequence Read Archive,
163 BioProject (pending). The water controls for CSF and NP samples contained no EV reads. The
164 water control for the stool samples had 0.7 EV rpm when it was pooled and sequenced
165 together with many high EV titer stool samples. To differentiate whether the EV reads present
166 in the stool water control stemmed from physical cross contamination or from bioinformatic
167 contamination due to barcode misassignment (that still occurs at very low levels despite a dual
168 index barcoding strategy) (20), we re-sequenced the same stool water control library separate
169 from high EV titer samples. When sequenced separately, we found no EV reads in this water
170 control. This suggested that the small number of EV reads in the first dataset stemmed from
171 barcode misassignment from the high EV titer samples and not from physical cross
172 contamination. In addition, we re-sequenced the patient samples (NP samples from patients 1,
173 9, 16 and 18) whose EV read abundance fell below the abundance level of the stool water

174 control on the first sequencing run to similarly determine whether the EV reads were present
175 due to barcode misassignment. Unlike the stool water control, when these patient samples
176 were re-sequenced, they retained EV reads, providing evidence that EV was indeed present in
177 these samples.

178 Of the 10 cases and 10 controls investigated, EVs were detected in CSF, NP and stool
179 samples via mNGS (Figure 1). Overall, mNGS was concordant with the positive qRT-PCR results
180 for EVs (25 of 25). In the samples found to be EV-negative by clinical Pan-EV qRT-PCR (n=35),
181 pathogens were detected in 28.6% (n=10) of the samples. This included the detection of
182 additional pathogens in 5 CSF samples, including 4 cases of EV-A71 and 1 case of human
183 herpesvirus 7 (HHV-7). Overall, EV-A71 was found in 80% of patients (n=16), E-30 in 25% (n=5),
184 CV-B in 15% (n=3) and HHV-7 in the CSF of 1 patient. Furthermore, 5 patients with EV-A71
185 infection had another EV detected by mNGS that could not be distinguished by the Pan-EV qRT-
186 PCR assay. Three of these patients had 2 different EVs detected in a single sample (Patients 6,
187 13 and 20). Overall, mNGS increased the proportion of EV-positive samples from 42% (25/60) to
188 57% (34/60) (McNemar's test; p-value = 0.0077). For CSF in particular, mNGS doubled the
189 number of pathogen-positive samples from 5 (25%) to 10 (50%) (McNemar's test; p-value =
190 0.074).

191

192 **Phylogenetics**

193 Six full-length EV-A71, 4 E30 and 1 CV-B virus genomes (22-2,296x average coverage depth,
194 Genbank MH484066-MH484076) were assembled as described in Methods. All 6 EV-A71
195 genomes were nearly identical to the German neuroinvasive EV-A71 strain (Genbank

196 KX139462.1, 99.3—99.4% nucleotide similarity and 99.7-99.8% amino acid similarity) (Figure
197 2b). In addition, we corroborated the previously published phylogenetic analysis that used a
198 Sanger sequence of 360 bases in the 3' end of the VP1 region, by comparing the entire VP1
199 gene from our full-length EV-A71 genomes to the VP1 sequences from 11 German
200 neuroinvasive EV-A71 strains, 17 neurovirulent Chinese EV-A71 strains, 6 contemporary,
201 neurovirulent African strains and 26 EV-A71 strains associated with hand foot and mouth
202 disease in Spain (21-24).

203 Next, 8,841 full length EV genomes were clustered at 95% similarity to create a list of 535
204 sequences. The EV-A71, E-30 and CV-B strains were aligned to the clustered list using a MAFFT
205 alignment algorithm, followed by phylogenetic analysis. All 3 viruses appropriately clustered
206 within their own species (Figure 2C).

207 Lastly, SNV analysis was performed on the full-length EV-A71 genomes (3 from patients with
208 brainstem encephalitis, 2 from patients with meningitis and 1 from a patient with encephalitis)
209 to identify SNVs unique to brainstem encephalitis patients. We identified 55 inter-host SNVs
210 that were unique to the EV-A71s associated with brainstem encephalitis. Only 2 of those SNVs
211 were common to all 3 viruses (Supplemental Figure 2). However, both of these SNVs were
212 synonymous mutations located in the 3A and 3D genes, and thus the biological significance of
213 these mutations, if any, is uncertain (25).

214 **Discussion**

215 The original description of the 2016 pediatric brainstem encephalitis outbreak in Catalonia
216 identified EV-A71 as the likely etiologic agent. However, this conclusion was tempered because
217 1) there were multiple other co-circulating EVs present during the outbreak, and 2) EV-A71 was

218 not identified in the CSF of the vast majority of patients with brainstem encephalitis. Identifying
219 EVs in peripheral body sites of patients with severe neurologic disease but failing to find it in
220 the CNS mirrors both the recent North American outbreak of acute flaccid myelitis associated
221 with EV-D68 (26) and in an EV-A71 outbreak in the early 2000s (27) . As a result, others have
222 hypothesized that the severe neurologic sequelae experienced by children in both outbreaks
223 may have been due to a para-infectious mechanism (or a co-infection) rather than as a direct
224 effect of the virus. Here, we utilized mNGS to further investigate patient samples from the
225 Catalonia outbreak to address these hypotheses.

226 In contrast to EV-specific qRT-PCR, mNGS identified EV-A71 in the CSF of 4 patients (20%), 1
227 with brainstem encephalitis, 1 with simple encephalitis, and 2 with meningitis alone. EV-A71
228 abundance levels in the CSF were very low (0.03-0.55 rpm), and only 3.6% (2/56) of reads
229 mapped to the 5'UTR (the area of the EV genome targeted by the clinical qRT-PCR assay). This
230 may explain the lower sensitivity of the clinical qRT-PCR assay and the BioFire FilmArray panel
231 (1, 6).

232 With regard to co-infections, we identified HHV-7 in the CSF of 1 patient with brainstem
233 encephalitis who also had EV-A71 identified in the NP sample and stool. There is controversy
234 about the neuro-pathogenicity of HHV-7, although there are a number of reported cases of
235 HHV-7 encephalitis both in immunocompromised and immunocompetent children, including
236 children with brainstem encephalitis (28). In addition, mNGS also identified 5 patients co-
237 infected by 2 different EVs, and 2 of these patients had severe clinical phenotypes, raising the
238 possibility that co-infection may have contributed to disease severity. These findings highlight
239 that in the midst of an outbreak, mNGS can identify patients with alternate or co-infections that

240 produce clinical phenotypes mimicking or contributing to the phenotype associated with the
241 outbreak pathogen.

242 A limitation of this paper is that, due to sample availability, we did not perform orthogonal
243 confirmation of the mNGS-only virus identifications. As a result, our evaluation of the
244 performance of the mNGS assay is vulnerable to incorporation bias because the gold standard
245 by which we are evaluating its performance includes the mNGS results (29). However, for
246 reasons described above in Results, we are confident that even the low levels of virus detected
247 by mNGS were not due to physical contamination and/or barcode misassignment.

248 Through mNGS, we were able to recover significantly more genetic information about the
249 EV-A71 outbreak strain, including 6 full-length genomes. This additional information
250 corroborated that the EV-A71 strain was nearly identical to the 2015 neuroinvasive German
251 strain as opposed to the much more common outbreaks of EV-A71-associated brainstem
252 encephalitis seen throughout Asia (Figure 2b-c). Indeed, we found that the strain circulating in
253 Catalonia was more closely related to recently reported contemporary West African strains
254 than Chinese strains (21) (Figure 2b). Despite having full-length genomes, we were unable to
255 identify the presence of any novel or previously known SNVs that might be associated with
256 increased neurovirulence in this limited cohort. Of note, mutations in the 3A (membrane
257 binding protein important in replication) and 3D (the RNA-dependent RNA polymerase) genes
258 have been identified as important regions for adaption to a neuroblastoma cell line (25). In
259 these 2 genes, we identified 1 synonymous SNV in each, common to 3 EV-A71 genomes from
260 brainstem encephalitis patients but not found in meningitis/encephalitis patients. We also
261 searched for a VP1-31G SNV recently reported to be associated with EV-A71 strains with

262 neuroinvasive potential (30). This SNV was not identified in any of the 6 EV-A71 genomes.
263 Despite this, we believe these data will serve as a valuable resource for future studies that seek
264 to identify the genetic determinants of neuroinvasive EV-A71 infections.

265 While there have been many case reports and small case series documenting the ability of
266 mNGS to detect a variety of pathogens in the CSF (14, 31-33), there have been very few reports
267 on the actual diagnostic yield of mNGS of CSF compared to traditional assays, including
268 pathogen-specific PCR and the BioFire FilmArray. This study demonstrates that in a cohort of
269 patients with a variety of viral CNS infections, a single mNGS assay was concordant with positive
270 pathogen-specific PCR results and indeed, more sensitive for the detection of EV across all
271 sample types, especially in the CSF. Furthermore, identifying EV-A71 in the CSF of 4 additional
272 patients provides circumstantial evidence that this strain was may be neuroinvasive and that a
273 para-infectious etiology is a less likely explanation for the neurological phenotypes observed
274 during the outbreak. Lastly, the rich viral genomic datasets generated by mNGS enabled more
275 sophisticated analyses about the origins of the outbreak strain and the search for possible
276 neurovirulence factors. While the experiments described herein utilized a research-based CSF
277 mNGS assay, a clinically validated CSF mNGS assay with a 3-7 day turnaround time was recently
278 evaluated in a multi-center prospective study and is now clinically available (34). Thus, this type
279 of unbiased diagnostic approach is no longer relegated only to research settings, and its role in
280 individual patient care and public health outbreak investigations will likely expand.

281

282

283

284

285 **Acknowledgements:**

286 Sandler and William K. Bowes Jr Foundations (MRW, JLD, LMK), Rachleff Family
287 Foundation (MRW), National Institute of Neurological Disorders and Stroke of the National
288 Institutes of Health under award K08NS096117 (MRW) supported this study. This study was
289 partially supported by a grant from the Spanish National Health Institute [grant number
290 PI15CIII-00020] and The European Regional Development Fund (FEDER funds).

291 We would like to recognize Amy Kistler, Ph.D. for their intellectual discussions, and Dr.
292 Maria Cabrerizo from Enterovirus Unit of the Spanish National Centre for Microbiology for
293 routine EV genotyping of samples. We thank the patients and their families for their
294 participation in the research study.

295 *Availability of data and material*

Sample Accession Number

4N	MH484066
5N	MH484067
6N	MH484068
11N	MH484069
16F	MH484070
17F	MH484071
15L	MH484072
18L	MH484073
19L	MH484074
20L	MH484075

296 [Non-human read deposition in progress]

297

References

- 298 1. Casas-Alba D, de Sevilla MF, Valero-Rello A, Fortuny C, García-García J-, Ortez C, Muchart J,
299 Armangué T, Jordan I, Luaces C, Barrabeig I, González-Sanz R, Cabrerizo M, Muñoz-Almagro C,
300 Launes C. 2017. Outbreak of brainstem encephalitis associated with enterovirus-A71 in
301 Catalonia, Spain (2016): a clinical observational study in a children's reference centre in
302 Catalonia. *Clin Microbiol Infect* 23:874-881. [10.1016/j.cmi.2017.03.016](https://doi.org/10.1016/j.cmi.2017.03.016).
- 303 2. Karrasch M, Fischer E, Scholten M, Sauerbrei A, Henke A, Renz DM, Mentzel H, Böer K,
304 Böttcher S, Diedrich S, Krumbholz A, Zell R. 2016. A severe pediatric infection with a novel
305 enterovirus A71 strain, Thuringia, Germany. *Journal of Clinical Virology* 84:90-95.
306 [10.1016/j.jcv.2016.09.007](https://doi.org/10.1016/j.jcv.2016.09.007).
- 307 3. Böttcher S, Obermeier PE, Neubauer K, Diedrich S. Recombinant Enterovirus A71
308 Subgenogroup C1 Strains, Germany, 2015. *Emerging Infectious Diseases*. .
309 [10.3201/eid2210.160357](https://doi.org/10.3201/eid2210.160357).
- 310 4. Midgley SE, Nielsen AG, Trebbien R, Poulsen MW, Andersen PH, Fischer TK. 2017. Co-
311 circulation of multiple subtypes of enterovirus A71 (EV- A71) genotype C, including novel
312 recombinants characterised by use of whole genome sequencing (WGS), Denmark 2016.
313 *Eurosurveillance* 22:30565. [10.2807/1560-7917.ES.2017.22.26.30565](https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2017.22.26.30565).
- 314 5. Antona D, Kossorotoff M, Schuffenecker I, Mirand A, Leruez-Ville M, Bassi C, Aubart M,
315 Moulin F, Lévy-Bruhl D, Henquell C, Lina B, Desguerre I. 2016. Severe paediatric conditions
316 linked with EV-A71 and EV-D68, France, May to October 2016. *Euro Surveill* 21:. [10.2807/1560-7917.ES.2016.21.46.30402](https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2016.21.46.30402).

15

- 318 6. Launes C, Casas-Alba D, Fortuny C, Valero-Rello A, Cabrerizo M, Muñoz-Almagro C. 2017.
319 Utility of FilmArray Meningitis/Encephalitis Panel during Outbreak of Brainstem Encephalitis
320 Caused by Enterovirus in Catalonia in 2016. *J Clin Microbiol* 55:336-338. 10.1128/JCM.01931-
321 16.
- 322 7. Dudas G, Carvalho LM, Bedford T, Tatem AJ, Baele G, Faria NR, Park DJ, Ladner JT, Arias A,
323 Asogun D, Bielejec F, Caddy SL, Cotten M, D'Ambrozio J, Dellicour S, Di Caro A, Dclaro JW,
324 Duraffour S, Elmore MJ, Fakoli LS, Faye O, Gilbert ML, Gevao SM, Gire S, Gladden-Young A,
325 Gnirke A, Goba A, Grant DS, Haagmans BL, Hiscox JA, Jah U, Kugelman JR, Liu D, Lu J, Malboeuf
326 CM, Mate S, Matthews DA, Matranga CB, Meredith LW, Qu J, Quick J, Pas SD, Phan MVT,
327 Pollakis G, Reusken CB, Sanchez-Lockhart M, Schaffner SF, Schieffelin JS, Sealfon RS, Simon-
328 Lorie E, Smits SL, Stoecker K, Thorne L, Tobin EA, Vandi MA, Watson SJ, West K, Whitmer S,
329 Wiley MR, Winnicki SM, Wohl S, Wölfel R, Yozwiak NL, Andersen KG, Blyden SO, Bolay F, Carroll
330 MW, Dahn B, Diallo B, Formenty P, Fraser C, Gao GF, Garry RF, Goodfellow I, Günther S, Happi
331 CT, Holmes EC, Kargbo B, Keita S, Kellam P, Koopmans MPG, Kuhn JH, Loman NJ, Magassouba N,
332 Naidoo D, Nichol ST, Nyenswah T, Palacios G, Pybus OG, Sabeti PC, Sall A, Ströher U, Wurie I,
333 Suchard MA, Lemey P, Rambaut A. 2017. Virus genomes reveal factors that spread and
334 sustained the Ebola epidemic. *Nature* 544:309-315. 10.1038/nature22040.
- 335 8. World Health Organization. Regional Office for the Western Pacific, Regional Emerging
336 Diseases Intervention (REDI) Centre. 2011. A guide to clinical management and public health
337 response for hand, foot and mouth disease (HFMD). Manila : WHO Regional Office for the
338 Western Pacific.

- 339 9. Selva L, Martínez-Planas A, García-García J-, Casadevall R, Luaces C, Muñoz-Almagro C. 2012.
340 Comparison of an in-house real-time RT-PCR assay with a commercial assay for detection of
341 enterovirus RNA in clinical samples. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 31:715-719. 10.1007/s10096-
342 011-1364-1.
- 343 10. Verstrepen WA, Kuhn S, Kockx MM, Van De Vyvere, M. E., Mertens AH. 2001. Rapid
344 detection of enterovirus RNA in cerebrospinal fluid specimens with a novel single-tube real-
345 time reverse transcription-PCR assay. *J Clin Microbiol* 39:4093-4096. 10.1128/JCM.39.11.4093-
346 4096.2001.
- 347 11. Leber AL, Everhart K, Balada-Llasat J, Cullison J, Daly J, Holt S, Lephart P, Salimnia H,
348 Schreckenberger PC, DesJarlais S, Reed SL, Chapin KC, LeBlanc L, Johnson JK, Soliven NL, Carroll
349 KC, Miller J, Dien Bard J, Mestas J, Bankowski M, Enomoto T, Hemmert AC, Bourzac KM. 2016.
350 Multicenter Evaluation of BioFire FilmArray Meningitis/Encephalitis Panel for Detection of
351 Bacteria, Viruses, and Yeast in Cerebrospinal Fluid Specimens. *J Clin Microbiol* 54:2251-2261.
352 10.1128/JCM.00730-16.
- 353 12. Cabrerizo M, Echevarria JE, González I, de Miguel T, Trallero G. 2008. Molecular
354 epidemiological study of HEV-B enteroviruses involved in the increase in meningitis cases
355 occurred in Spain during 2006. *J Med Virol* 80:1018-1024. 10.1002/jmv.21197.
- 356 13. Gu W, Crawford ED, O'Donovan BD, Wilson MR, Chow ED, Retallack H, DeRisi JL. 2016.
357 Depletion of Abundant Sequences by Hybridization (DASH): using Cas9 to remove unwanted
358 high-abundance species in sequencing libraries and molecular counting applications. *Genome*
359 *Biol* 17:41. 10.1186/s13059-016-0904-5.

- 360 14. Wilson MR, O'Donovan BD, Gelfand JM, Sample HA, Chow FC, Betjemann JP, Shah MP,
361 Richie MB, Gorman MP, Hajj-Ali RA, Calabrese LH, Zorn KC, Chow ED, Greenlee JE, Blum JH,
362 Green G, Khan LM, Banerji D, Langelier C, Bryson-Cahn C, Harrington W, Lingappa JR, Shanbhag
363 NM, Green AJ, Brew BJ, Soldatos A, Strnad L, Doernberg SB, Jay CA, Douglas V, Josephson SA,
364 DeRisi JL. 2018. Chronic Meningitis Investigated via Metagenomic Next-Generation Sequencing.
365 *JAMA Neurol* . 10.1001/jamaneurol.2018.0463.
- 366 15. Bankevich A, Nurk S, Antipov D, Gurevich AA, Dvorkin M, Kulikov AS, Lesin VM, Nikolenko SI,
367 Pham S, Pribelski AD, Pyshkin AV, Sirotkin AV, Vyahhi N, Tesler G, Alekseyev MA, Pevzner PA.
368 2012. SPAdes: A New Genome Assembly Algorithm and Its Applications to Single-Cell
369 Sequencing. *Journal of Computational Biology* 19:455-477. 10.1089/cmb.2012.0021.
- 370 16. Katoh K, Misawa K, Kuma K, Miyata T. 2002. MAFFT: a novel method for rapid multiple
371 sequence alignment based on fast Fourier transform. *Nucleic acids research* 30:3059-3066.
372 10.1093/nar/gkf436.
- 373 17. Robert C. Edgar. 2004. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high
374 throughput. *Nucleic Acids Research* 32:1792-1797. 10.1093/nar/gkh340.
- 375 18. Langmead B, Salzberg SL. 2012. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nature Methods*
376 9:357. 10.1038/nmeth.1923.
- 377 19. Koboldt DC, Chen K, Wylie T, Larson DE, McLellan MD, Mardis ER, Weinstock GM, Wilson
378 RK, Ding L. 2009. VarScan: variant detection in massively parallel sequencing of individual and
379 pooled samples. *Bioinformatics* 25:2283-2285. 10.1093/bioinformatics/btp373.
- 380 20. Wilson MR, Fedewa G, Stenglein MD, Olejnik J, Rennick LJ, Nambulli S, Feldmann F, Duprex
381 WP, Connor JH, Mühlberger E, DeRisi JL. 2016. Multiplexed Metagenomic Deep Sequencing To

- 382 Analyze the Composition of High-Priority Pathogen Reagents. *mSystems* 1:
383 10.1128/*mSystems*.00058-16.
- 384 21. Fernandez-Garcia MD, Volle R, Joffret M, Sadeuh-Mba SA, Gouandjika-Vasilache I, Kebe O,
385 Wiley MR, Majumdar M, Simon-Loriere E, Sakuntabhai A, Palacios G, Martin J, Delpeyroux F,
386 Ndiaye K, Bessaud M. 2018. Genetic Characterization of Enterovirus A71 Circulating in Africa.
387 *Emerging Infect Dis* 24:754-757. 10.3201/eid2404.171783.
- 388 22. Böttcher, S., Obermeier, P. E., Neubauer, K., & Diedrich, S. 2016. Recombinant Enterovirus
389 A71 Subgenogroup C1 Strains, Germany, 2015. *Emerging Infectious Diseases* .
390 10.3201/eid2210.160357.
- 391 23. Cabrerizo M, Tarragó D, Muñoz-Almagro C, del Amo E, Domínguez-Gil M, Eiros JM, López-
392 Miragaya I, Pérez C, Reina J, Otero A, González I, Echevarría JE, Trallero G. 2014. Molecular
393 epidemiology of enterovirus 71, coxsackievirus A16 and A6 associated with hand, foot and
394 mouth disease in Spain. *Clinical Microbiology and Infection* 20:O156. 10.1111/1469-
395 0691.12361.
- 396 24. Sun L, Zheng H, Zheng H, Guo X, He J, Guan D, Kang M, Liu Z, Ke C, Li J, Liu L, Guo R, Yoshida
397 H, Lin J. 2011. An enterovirus 71 epidemic in Guangdong Province of China, 2008:
398 epidemiological, clinical, and virogenic manifestations. *Jpn J Infect Dis* 64:13-18.
- 399 25. Paola Florez de Sessions, Elena Dobrikova, Matthias Gromeier. 2007. Genetic Adaptation to
400 Untranslated Region-Mediated Enterovirus Growth Deficits by Mutations in the Nonstructural
401 Proteins 3AB and 3CD. *Journal of Virology* 81:8396-8405. 10.1128/*JVI*.00321-07.
- 402 26. Greninger AL, Naccache SN, Messacar K, Clayton A, Yu G, Somasekar S, Federman S, Stryke
403 D, Anderson C, Yagi S, Messenger S, Wadford D, Xia D, Watt JP, Van Haren K, Dominguez SR,

- 404 Glaser C, Aldrovandi G, Chiu CY. 2015. A novel outbreak enterovirus D68 strain associated with
405 acute flaccid myelitis cases in the USA (2012-14): a retrospective cohort study. *Lancet Infect Dis*
406 15:671-682. 10.1016/S1473-3099(15)70093-9.
- 407 27. Pérez-Vélez CM, Anderson MS, Robinson CC, McFarland EJ, Nix WA, Pallansch MA, Oberste
408 MS, Glodé MP. 2007. Outbreak of neurologic enterovirus type 71 disease: a diagnostic
409 challenge. *Clin Infect Dis* 45:950-957. 10.1086/521895.
- 410 28. Fay AJ, Noetzel MJ, Mar SS. 2015. Pediatric Hemorrhagic Brainstem Encephalitis Associated
411 With HHV-7 Infection. *Pediatr Neurol* 53:523-526. 10.1016/j.pediatrneurol.2015.06.016.
- 412 29. Kohn MA, Carpenter CR, Newman TB. 2013. Understanding the direction of bias in studies
413 of diagnostic test accuracy. *Acad Emerg Med* 20:1194-1206. 10.1111/acem.12255.
- 414 30. Huang S, Huang Y, Tsai H, Kuo P, Wang S, Liu C, Wang J. 2017. A Selective Bottleneck Shapes
415 the Evolutionary Mutant Spectra of Enterovirus A71 during Viral Dissemination in Humans. *J*
416 *Virology* 91:1062. 10.1128/JVI.01062-17.
- 417 31. Piantadosi A, Kanjilal S, Ganesh V, Khanna A, Hyle EP, Rosand J, Bold T, Metsky HC, Lemieux
418 J, Leone MJ, Freimark L, Matranga CB, Adams G, McGrath G, Zamirpour S, Telford S, Rosenberg
419 E, Cho T, Frosch MP, Goldberg MB, Mukerji SS, Sabeti PC. 2018. Rapid Detection of Powassan
420 Virus in a Patient With Encephalitis by Metagenomic Sequencing. *Clin Infect Dis* 66:789-792.
421 10.1093/cid/cix792.
- 422 32. Wilson MR, Naccache SN, Samayoa E, Biagtan M, Bashir H, Yu G, Salamat SM, Somasekar S,
423 Federman S, Miller S, Sokolic R, Garabedian E, Candotti F, Buckley RH, Reed KD, Meyer TL,
424 Seroogy CM, Galloway R, Henderson SL, Gern JE, DeRisi JL, Chiu CY. 2014. Actionable diagnosis

425 of neuroleptospirosis by next-generation sequencing. The New England journal of medicine
426 370:2408.
427 33. Naccache SN, Peggs KS, Mattes FM, Phadke R, Garson JA, Grant P, Samayoa E, Federman S,
428 Miller S, Lunn MP, Gant V, Chiu CY. 2015. Diagnosis of neuroinvasive astrovirus infection in an
429 immunocompromised adult with encephalitis by unbiased next-generation sequencing. Clin
430 Infect Dis 60:919-923. 10.1093/cid/ciu912.
431 34. California Initiative to Advance Precision Medicine. 2016. Precision Diagnosis of Acute
432 Infectious Diseases. 2018:.
433
434 Table 1. Description of WHO case definitions. *Reproduced from [8].*

Disease	WHO Case Definition
Meningitis	Febrile illness with headache, vomiting and meningism associated with presence of more than 5 – 10 white cells per cubic millimeter in cerebrospinal (CSF) fluid, and negative results on CSF bacterial culture.
Encephalitis	Impaired consciousness, including lethargy, drowsiness or coma, or seizures or myoclonus.
Brainstem Encephalitis	Myoclonus, ataxia, nystagmus, oculomotor palsies, and bulbar palsy in various combinations, with or without MRI. In resource-limited settings, the diagnosis of brainstem encephalitis can be made in children with frequent myoclonic jerks and CSF pleocytosis.
Encephalomyelitis	Acute onset of hyporeflexic flaccid muscle

weakness with
myoclonus, ataxia, nystagmus, oculomotor
palsies and bulbar
palsy in various combinations.

Acute Flaccid Paralysis

Acute onset of flaccid muscle weakness and
lack of reflexes.

435

436

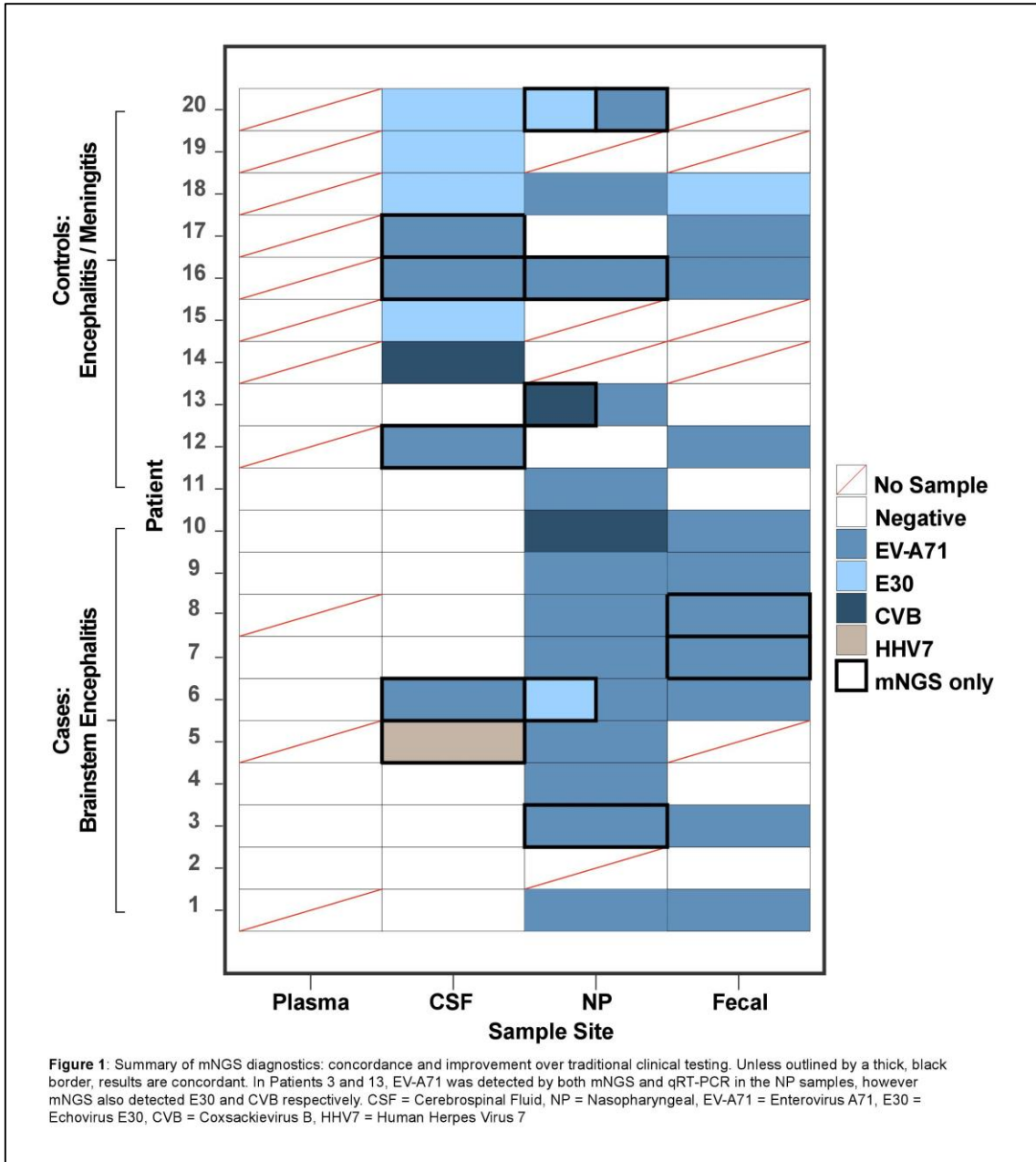
437 Table 2. Summary of patient group demographics and clinical data.

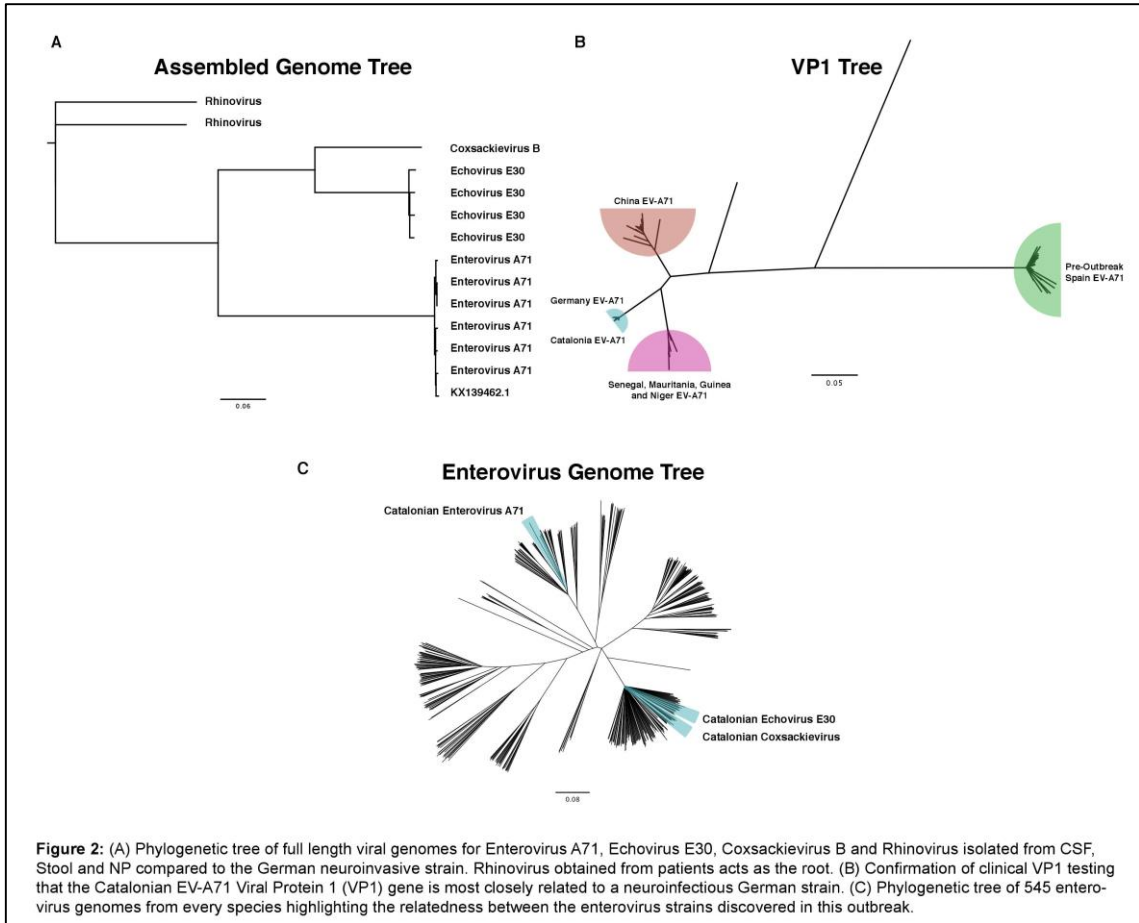
	Cases Total=10	Controls Total=10
Mean age (months) ^a	22.7 (18.1-31.2)	10.8 (0.9-37.5)
Sex (male)	4	6
Systemic symptoms		
Fever	10	10
Vomiting	6	4
Diarrhea	2	1
Exanthema	5	3
Enanthema	8	2
Neurologic symptoms		
Meningismus	2	3
Irritability	2	2
Lethargy	8	4
Headache	1	2
Myoclonic jerks	6	0
Tremor	5	0
Ataxia	9	0
Paresis	3	0
Nystagmus and/or strabismus	1	0
Bulbar palsy	2	0
Medullary symptoms	3	0
WHO clinical classification		
Meningitis	0	7
Encephalitis	0	3
Brainstem encephalitis	8	0
Encephalomyelitis	2	0
EV results by Clinical Pan-EV qRT-PCR (positive/total)		
CSF	0/10	5/10
Plasma	0/7	0/2
Nasopharyngeal sample	8/9	3/7
Stool	5/9	4/6

^a Median (interquartile range).

22

438 Figure 1: Summary of mNGS diagnostics: concordance and improvement over traditional clinical
439 testing. Unless outlined by a thick, black border, results are concordant. In Patients 3 and 13,
440 EV-A71 was detected by both mNGS and qRT-PCR in the NP samples, however mNGS also
441 detected E30 and CVB respectively. CSF = Cerebrospinal Fluid, NP = Nasopharyngeal, EV-A71 =
442 Enterovirus A71, E30 = Echovirus E30, CVB = Coxsackievirus B, HHV7 = Human Herpes Virus 7
443
444 Figure 2: (A) Phylogenetic tree of full length viral genomes for Enterovirus A71, Echovirus E30,
445 Coxsackievirus B and Rhinovirus isolated from CSF, Stool and NP compared to the German
446 neuroinvasive strain. Rhinovirus obtained from patients acts as the root. (B) Confirmation of
447 clinical VP1 testing that the Catalonian EV-A71 Viral Protein 1 (VP1) gene is most closely related
448 to a neuroinfectious German strain. (C) Phylogenetic tree of 545 enterovirus genomes from
449 every species highlighting the relatedness between the enterovirus strains discovered in this
450 outbreak.
451
452 Supplemental Figure 1: Sequencing results including RPM for each pathogen detected for each
453 patient in each body site.
454
455 Supplemental Figure 2: Single nucleotide variant map. The red boxes highlight the two common
456 SNVs unique to the brainstem encephalitis patients found in proteins 3A and 3D. The
457 highlighted mutations are 5008T>C and 5938A>G.





9.2.1 Resum del sisè article

Es tracta d'un estudi observacional retrospectiu en el que es van incloure com a casos els primers 10 pacients ingressats amb diagnòstic d'encefalitis de tronc o encefalomièlitis i com a controls els primers 10 pacients ingressats amb diagnòstic de meningitis o encefalitis, amb detecció d'EV en alguna mostra i absència d'altra etiologia plausible, amb mostra de LCR suficient, a partir de l'abril de 2016. Es van recollir dades clíniques i microbiològiques. Les mostres de LCR, plasma, aspirat nasofaríngi i femtes es van analitzar mitjançant la real-time RT-PCR PAN EV d'elaboració pròpia (les mostres positives per a EV es van tipificar a la Unitat d'EV del Centre Nacional de Microbiologia). Posteriorment, es van enviar per a seqüenciar mitjançant mNGS amb plataforma Illumina® a la Universitat de Califòrnia, San Francisco (sense identificar casos i controls).

El Dr. Wilson, neuròleg, i el Dr. DeRisi, bioquímic, desenvolupen part de la seva activitat de recerca a la Universitat de Califòrnia (San Francisco). Són pioners en l'aplicació de tècniques de mNGS clínica en el camp de la neuroinfectologia.

Els resultats d'aquest sisè estudi són:

1. Resultats de la detecció d'EV:

1.1. En les mostres positives mitjançant real-time RT-PCR PAN EV (n=25), la mNGS va detectar virus en totes.

1.2. En les mostres negatives mitjançant PAN EV real-time RT-PCR (n=35), la mNGS va detectar virus en deu (29%).

- Els virus identificats van ser nou EV-A71 i un VHH-7.
- Cinc mostres eren de LCR, de les quals dues eren de pacients amb encefalitis de tronc (un EV-A71 i un VHH-7).

1.3. Els nivells d'EV-A71 en LCR van ser molt baixos (0,03-0,55 lectures per milió).

1.4. En general, la mNGS va augmentar la proporció de mostres positives per EV del 42% (25/60) al 57% (34/60), de forma estadísticament significativa ($p < 0,01$). En mostres de LCR, la mNGS va doblar la proporció de mostres positives.

2. Resultats de la detecció d'altres gèrmens:

2.1. La mNGS va detectar EV-A71 en el 80% dels pacients (n=16), E-30 en el 25% (n=5), CV-B en el 15% (n=3) i VHH-7 en un pacient.

2.2. En el grup de controls (encefalitis/meningitis), la mNGS va co-detectar EV-A71 i altres EV en tres casos (dos E-30 i un CV-B).

2.3. En el grup de casos (encefalitis de tronc/encefalomielitis), la mNGS va co-detectar EV-A71 i altres EV en dos casos (un E-30 i un CV-B). També va co-detectar EV-A71 i VHH-7 en un altre cas.

3. Tipificació i anàlisi filogenètica de l'EV-A71:

3.1. L'anàlisi de les dades de WGS de la mNGS va mostrar que totes les soques d'EV-A71 pertanyien al subgenotip C1. A més, l'anàlisi filogenètica va permetre identificar que les soques d'EV-A71 C1 formaven una subclasse de la soca variant alemanya detectada el 2015^{72,169}.

4. Factors genètics de neurovirulència:

4.1. No es van identificar diferències de polimorfismes d'un sol nucleòtid no sinònimes entre les seqüències d'EV-A71 de casos i controls.