



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Estudio del papel de la microbiota nasofaríngea en la gravedad de la infección por Rino/Enterovirus humano en niños menores de 5 años

Daniel Penela Sánchez

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.

ESTUDIO DEL PAPEL DE LA MICROBIOTA NASOFARÍNGEA EN LA GRAVEDAD DE LA INFECCIÓN POR RINO/ENTEROVIRUS HUMANO EN NIÑOS MENORES DE 5 AÑOS

Memoria de Tesis Doctoral presentada por **Daniel Penela Sánchez**
para optar al grado de Doctor por la Universidad de Barcelona

PROGRAMA DE DOCTORADO MEDICINA E INVESTIGACIÓN TRASLACIONAL

Facultad de Medicina y Ciencias de la Salud

Universidad de Barcelona

Directores de tesis: Dr. Cristian Launes Montaña, MD, PhD

Servicio de Pediatría. Hospital Sant Joan de Déu. Grupo Enfermedades Infecciosas Pediátricas y Microbioma del Institut de Recerca Sant Joan de Déu. CIBER de Epidemiología y Salud Pública (CIBERESP). Departamento de Medicina y especialidades Medico-quirúrgicas, Facultad de Medicina y Ciencias de la Salud, Universidad de Barcelona

Dra. Carmen Muñoz-Almagro, MD, PhD

Servicio de Microbiología. Hospital Sant Joan de Déu. Grupo Enfermedades Infecciosas Pediátricas y Microbioma del Institut de Recerca Sant Joan de Déu. CIBER de Epidemiología y Salud Pública (CIBERESP). Catedrática del Departamento de Medicina de la Universidad Internacional de Cataluña

Tutora de tesis: Dra. Iolanda Jordan García, MD, PhD

Unidad de Cuidados Intensivos Pediátricos. Dirección médica Hospital Sant Joan de Déu. Grupo Enfermedades Infecciosas Pediátricas y Microbioma del Institut de Recerca Sant Joan de Déu. CIBER de Epidemiología y Salud Pública (CIBERESP). Departamento de Medicina y especialidades Medico-quirúrgicas, Facultad de Medicina y Ciencias de la Salud, Universidad de Barcelona

Mes y año presentación: Junio 2023

AGRADECIMIENTOS

A mis padres, las personas que más quiero en este mundo, por enseñarme el valor de la cultura del esfuerzo, por apoyarme siempre y ser mi referente. Nunca os podré dar todas las gracias que os merecéis.

A mi hermano Carlos, por ser el espejo donde mirarme, una persona en el buen sentido de la palabra, buena. A mi tía Lucía, mi segunda madre. A mi primo Marc, mi “hermano” pequeño.

A Arantxa, compañera de aventuras, por animarme a seguir con este proyecto cuando las fuerzas flaqueaban, por sufrir conmigo los quebraderos de cabeza que han supuesto esta tesis. A Pau, por entender que a veces no podía jugar con él porque tenía que hacer el “trabajo de los virus”.

A mis amigas y amigos, porque siempre están ahí.

A mi tutora de tesis, la Dra. Iolanda Jordan, por su energía y entusiasmo incansables. A mis directores de tesis, la Dra. Carmen Muñoz-Almagro, por todo lo que me ha enseñado en este mundo de la investigación; y al Dr. Cristian Launes, por darme la oportunidad de formar parte de este proyecto ya desde la residencia, por creer en mis posibilidades incluso cuando yo mismo no creía.

A todas mis compañeras y compañeros del grupo de investigación en Enfermedades Infecciosas Pediátricas y Microbioma del Institut de Recerca de Sant Joan de Déu, especialmente a Desirée y Muntsa. A mis CoRs, mi familia del hospital.

A todas y todos ellos, gracias.

FINANCIACIÓN

Los trabajos presentados en esta tesis doctoral se enmarcan, principalmente, dentro del proyecto *"Rinovirus humano (HRV) en niños menores de 5 años, del resfriado común a la unidad de intensivos: rol de la microbiota"* financiado por el Fondo de Investigación Sanitaria (FIS) del Instituto de Salud Carlos III (PI17/349), siendo el Investigador Principal (IP) el Dr. Cristian Launes.

ÍNDICE GENERAL

Acrónimos	10
Enumeración de artículos que componen la tesis doctoral	11
Resumen	12
1. Introducción	15
1.1 Infección por Rino/Enterovirus (RV/EV)	15
1.1.1 Taxonomía y genética	15
1.1.2 Patogénesis	17
1.1.3 Epidemiología	19
1.1.4 Presentaciones clínicas	20
1.1.5 Métodos diagnósticos	24
1.1.6 Tratamiento	25
1.2 Factores modificadores de la severidad de la infección por RV/EV	29
1.2.1 Factores dependientes del virus	29
1.2.2 Factores dependientes del huésped	30
1.2.3 Factores dependientes del ambiente	33
1.2.4 Factores dependientes de la interacción de los RV/EV con otros microorganismos: rol de la microbiota	34
1.3 Metodología para el estudio del microbioma humano	39
1.3.1 Introducción	39
1.3.2 El gen ribosomal 16S rRNA	40

2. Hipótesis	45
3. Objetivos	46
4. Material, Métodos y Resultados	47
<i>Primer artículo: "Lower Respiratory Tract Infection and Genus Enterovirus in Children Requiring Intensive Care: Clinical Manifestations and Impact of Viral Co-Infections"</i>	<i>48</i>
<i>Segundo artículo: "Impact of the bacterial nasopharyngeal microbiota on the severity of genus enterovirus lower respiratory tract infection in children: A case-control study"</i>	<i>63</i>
5. Discusión	77
6. Conclusiones	91
7. Referencias	92

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1:

Estructura del genoma de los Rino/Enterovirus (RV/EV)

16

ACRÓNIMOS

ADN	Ácido Desoxirribonucleico
ARNm	Ácido RiboNucleico Mensajero
ASV	<i>Amplicon Sequence Variant</i>
EV	Enterovirus
HSJD	Hospital Sant Joan de Déu
ITRI	Infección del Tracto Respiratorio Inferior
ITRS	Infección del Tracto Respiratorio Superior
NGS	<i>Next Generation Sequencing</i>
ONT	<i>Oxford Nanopore Technologies</i>
OTU	Unidad Taxonómica Operativa
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
RV	Rinovirus
UCIP	Unidad de Cuidados Intensivos Pediátricos
VMI	Ventilación Mecánica Invasiva
VNI	Ventilación No Invasiva
VRS	Virus Respiratorio Sincitial

ENUMERACIÓN DE ARTÍCULOS

Tesis en formato de compendio de artículos

La tesis consta de dos objetivos principales y dos artículos:

Artículo 1: Penela-Sánchez D, González-de-Audicana J, Armero G, Henares D, Esteva C, de-Sevilla MF, Ricart S, Jordan I, Brotons P, Cabrerizo M, Muñoz-Almagro C, Launes C. Lower Respiratory Tract Infection and Genus Enterovirus in Children Requiring Intensive Care: Clinical Manifestations and Impact of Viral Co-Infections. *Viruses*. 2021 Oct 14;13(10):2059. doi: 10.3390/v13102059

SJR Scimago Journal Rank ® 2021. Área de conocimiento: Enfermedades infecciosas. Cuartil:

Q1. SJR impact factor 1.463.

Journal Citation Report (JCR) 2021. Área de conocimiento: Virología. Cuartil: Q2 (Virology, 14 de 37). Impact factor: 5.818.

El artículo 1 responde al objetivo 1 de la presente tesis doctoral.

Artículo 2: Penela-Sánchez D, Rocafort M, Henares D, Jordan I, Brotons P, Cabrerizo M, Launes C, Muñoz-Almagro C. Impact of the bacterial nasopharyngeal microbiota on the severity of genus enterovirus lower respiratory tract infection in children: A case-control study. *Pediatr Pulmonol*. 2023 Mar;1-10. doi: 10.1002/ppul.26393.

SJR Scimago Journal Rank ® 2021. Área de conocimiento: Pediatría, Perinatología y Salud Infantil. Cuartil: Q1. SJR 0.927.

Journal Citation Report (JCR) 2021. Área de conocimiento: Pediatría, Perinatología y Salud Infantil. Cuartil: Q1 (Pediatrics, 21 de 130). Impact factor: 4.090.

El artículo 2 responde al objetivo 2 de la presente tesis doctoral.

RESUMEN

TÍTULO: ESTUDIO DEL PAPEL DE LA MICROBIOTA NASOFARÍNGEA EN LA GRAVEDAD DE LA INFECCIÓN POR RINO/ENTEROVIRUS HUMANO EN NIÑOS MENORES DE 5 AÑOS

INTRODUCCIÓN: Los Rinovirus (RV) y Enterovirus (EV) son una de las principales causas de infección del tracto respiratorio superior (ITRS) e inferior (ITRI). Las manifestaciones clínicas producidas por los RV/EV son múltiples y heterogéneas, pudiendo causar desde infecciones asintomáticas hasta infecciones graves con compromiso vital. Esta variabilidad se ha relacionado con múltiples factores, dependientes del propio virus, del huésped o del ambiente. En los últimos años la microbiota nasofaríngea viral y bacteriana está cobrando protagonismo como un posible factor modulador de la gravedad de las infecciones respiratorias, pero existe poca evidencia acerca de su relación con la infección por RV/EV.

HIPÓTESIS: La co-infección viral podría ser un factor modificador de la gravedad de la ITRI por RV/EV en niños menores de 5 años. Por otra parte, los niños menores de 5 años con ITRI grave por RV/EV podrían presentar una microbiota nasofaríngea bacteriana distinta a la de niños con infección respiratoria banal y niños sanos, en tanto que determinadas composiciones de microbiota nasofaríngea bacteriana se asociarían con salud respiratoria. En este sentido, la composición de la microbiota nasofaríngea bacteriana en el escenario de la infección por RV/EV variaría de acuerdo con la gravedad de los síntomas.

OBJETIVOS: Describir el impacto clínico de la co-infección viral en pacientes con ITRI grave por RV/EV que precisan ingreso en una unidad de cuidados intensivos pediátricos (UCIP). Describir y comparar la microbiota nasofaríngea bacteriana de niños con ITRI grave por RV/EV, niños con infección respiratoria banal por estos microorganismos y niños sanos, identificando perfiles de microbiota bacteriana nasofaríngea relacionados con salud respiratoria, y evaluando la relación de ésta con la gravedad de la infección por estos microorganismos.

MÉTODOS: Se realizaron dos estudios observacionales, en los que se reclutaron niños menores de 5 años atendidos en el hospital Sant Joan de Déu entre 2017-2020. En el primer estudio se incluyeron pacientes que precisaron ingreso en la UCIP de dicho centro, diagnosticados de ITRI por RV/EV mediante realización de un panel de PCR múltiple en aspirado nasofaríngeo, que era además capaz de detectar 6 virus respiratorios más. Se analizaron 3 grupos de pacientes en función de si presentaron mono-infección por RV/EV, co-infección con virus respiratorio sincitial (VRS), o co-infección con múltiples virus, considerando como variables resultado la necesidad de ventilación mecánica invasiva (VMI), y la estancia en UCIP superior a la media de la muestra (5 días). El segundo estudio con diseño caso-control se definieron 3 grupos: el grupo caso en el que se incluyeron niños con ITRI grave por RV/EV que precisaron ingreso en la UCIP, y que se pareó por rango de edad y sexo con dos grupos controles: niños sanos y niños con infección respiratoria banal por RV/EV. Se caracterizó la microbiota nasofaríngea bacteriana de estos 3 grupos mediante técnicas de secuenciación masiva basadas en la tecnología del gen 16S rRNA.

PRINCIPALES RESULTADOS: En la presente tesis se ha identificado que la co-infección de RV/EV con múltiples virus respiratorios no representa un factor que incremente la gravedad de dicha infección. Los pacientes que presentaron una ITRI grave por RV/EV en mono-infección precisaron VMI y tuvieron una estancia media en UCIP significativamente mayor que los pacientes con múltiples co-infecciones. Por otra parte, se han descrito diferentes perfiles de microbiota nasofaríngea bacteriana en función de la presentación clínica de la infección por RV/EV. Los niños sanos presentaron una microbiota nasofaríngea rica y diversa, con mayor abundancia de especies comensales como *Dolosigranulum pigrum* y *Corynebacterium spp.* En cambio, los niños con ITRI grave por RV/EV presentaron una microbiota nasofaríngea significativamente menos rica y diversa que los controles sanos, con una menor abundancia de *Dolosigranulum* y una mayor abundancia de *Haemophilus*. Los niños con infección respiratoria banal RV/EV mostraron niveles intermedios de riqueza y diversidad entre ambos grupos.

CONCLUSIONES: Los RV/EV en mono-infección pueden constituir el agente etiológico de ITRI grave en el paciente pediátrico. La co-infección con otros virus respiratorios no resulta un factor determinante que incremente la gravedad de las ITRI por RV/EV. Se han caracterizado diferentes perfiles de microbiota nasofaríngea bacteriana en función de la gravedad de las manifestaciones clínicas de la infección por RV/EV, con una disbiosis progresiva de dicha microbiota desde la que presentan los pacientes asintomáticos hasta la descrita en aquellos que precisaron ingreso en la UCIP, caracterizada por una pérdida de riqueza y diversidad, reducción de bacterias comensales como *Dolosi-granulum* y aumento de bacterias del género *Haemophilus*.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Infección por Rinovirus y Enterovirus

Los Rinovirus (RV) y Enterovirus (EV) son una de las principales causas de infección del tracto respiratorio superior (ITRS) e inferior (ITRI) y son considerados a nivel mundial como uno de los agentes infecciosos más frecuentes en los seres humanos [1].

La mayoría de las infecciones provocadas por estos microorganismos son benignas, con la sintomatología típica del denominado "resfriado común". Por este motivo, la posibilidad de que estos virus pudieran ser causantes de cuadros severos ha sido históricamente menospreciada en la literatura médica [2]. Sin embargo, existe una evidencia creciente en las últimas décadas que contradice esta supuesta banalidad. Los RV y EV son el segundo agente etiológico causante de bronquiolitis en la infancia, sólo por detrás del Virus Respiratorio Sincitial (VRS) [3], y el impacto de la infección de estos microorganismos en el desarrollo posterior de sibilancias recurrentes y asma ha sido objetivo de numerosos estudios [4]. Además del impacto clínico, las infecciones por RV y EV tienen un importante impacto económico en la sociedad, tanto directa (por el elevado uso de recursos sanitarios) como indirectamente (por la pérdida de productividad) [5].

Los objetivos de esta introducción son revisar la taxonomía y genética, patogénesis, epidemiología, características clínicas, métodos diagnósticos y tratamientos de la infección por estos microorganismos.

1.1.1 Taxonomía y genética

Los RV y EV pertenecen al género *Enterovirus* (EV) dentro de la familia *Picornaviridae*. En el pasado, estos microorganismos se consideraba que pertenecían a géneros diferentes, pero las actuales técnicas moleculares han demostrado su elevada similitud genética. De acuerdo con la última clasificación proporcionada por el *International Committee on Taxonomy of Viruses* (ICTV) [6], dentro del género *Enterovirus* se incluyen siete especies que afectan al ser humano, tres especies de RV (RV-A, RV-B y RV-C) y cuatro de EV (EV-A, EV-B, EV-C y EV-D). Dentro de las especies de RV se reconocen

hasta la fecha 169 subtipos distintos [7]. Los poliovirus, englobados también dentro del género EV, no serán considerados en este trabajo de tesis.

Los RV y EV son pequeños virus esféricos, con un diámetro medio de 30nm, no encapsulados, con un genoma consistente en una única cadena de RNA monocatenario positivo, compuesto de 7200 pares de bases. Este único gen codifica para 1 poliproteína precursora, que es escindida por proteasas virales en 11 proteínas maduras; 4 de ellas (VP1, VP2, VP3 y VP4) conforman la cápside viral que engloba a la cadena de RNA, y 7 de ellas con función no estructural (2A a 2C y 3A a 3D) [8]. Las proteínas VP1, VP2 y VP3 conforman la cápside y determinan la diversidad antigénica viral, siendo la VP1 la principal diana de la respuesta inmunitaria [9]; la proteína VP4, en cambio, se encuentra en la superficie interna de la cápside, anclando el RNA a ésta. La estructura genómica de los RV y EV se representa en la Figura 1.

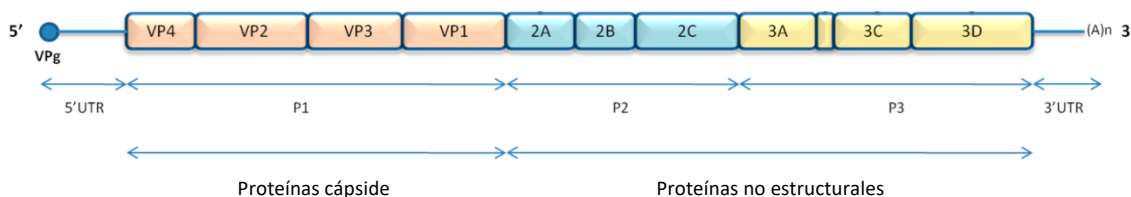


Figura 1: Estructura del genoma de los RV y EV. El genoma de RNA monocatenario codifica para una poliproteína que es escindida en 4 proteínas estructurales (VP1 a VP4) y 7 proteínas no estructurales (Figura Adaptada de la revista *Viruses* [1]).

Como hemos visto, los RV y EV comparten una estructura genética común. Sin embargo, estos microorganismos son muy diferentes fenotípicamente, y muestran diferencias significativas en la capacidad de replicación en las distintas regiones del organismo humano. El tropismo de los RV se centra en las vías respiratorias, tanto superiores como inferiores, y no suelen causar patología sistémica excepto en casos excepcionales, como comentaremos a continuación; los EV, sin embargo, son resistentes a pH ácido y pueden infectar una mayor variedad de localizaciones, dando lugar a diversos síndromes (meningitis, encefalitis, miopericarditis, gastroenteritis, etc.) [1]. A pesar de ello, algunos EV comparten características con los RV y sólo se replican en el tracto respiratorio, causando cuadros clínicos similares [3]. Este trabajo de tesis se centra en los RV y EV causantes de infección respiratoria (de ahora en adelante RV/EV).

1.1.2 Patogénesis

Replicación viral

La replicación de los RV/EV tiene lugar en las células ciliadas del epitelio de la vía aérea, tanto del tracto respiratorio superior como inferior. Dado que la temperatura ideal a la que replican estos microorganismos se sitúa entre los 33-35°C, en el pasado se asumía que la infección por estos agentes se limitaba al tracto respiratorio superior, donde la temperatura de las mucosas es inferior. Sin embargo, múltiples estudios han demostrado que los RV/EV pueden replicar de forma efectiva en muestras obtenidas de las vías respiratorias inferiores [10], e incluso que la capacidad de replicación a bajas temperaturas es mínima vs temperaturas superiores [11]; así mismo, el desarrollo de las técnicas moleculares han permitido demostrar el papel patogénico de estos microorganismos en infecciones del tracto respiratorio inferior en la infancia (bronquiolitis, bronquitis, neumonía) [12] y en adultos (exacerbaciones asmáticas, cuadros pseudogripales y neumonía en pacientes inmunodeprimidos) [13].

Además del tracto respiratorio, se ha demostrado que otros tejidos pueden verse infectados por RV/EV. Mediante técnicas moleculares se ha detectado RNA de estos microorganismos en cepillados de senos maxilares en pacientes con sinusitis [14], y también en el oído medio en niños con otitis media aguda supurada [15], presuponiéndose la propagación a estas localizaciones por extensión local. También se ha detectado RNA de RV/EV en sangre y en heces, hallazgos que contradicen la supuesta incapacidad de estos microorganismos de propagarse mediante viremia más allá de las fronteras del tracto respiratorio [16-18].

Para que se inicie la replicación, los RV/EV deben unirse a un receptor en la superficie de las células epiteliales, gracias a un anclaje situado en la proteína estructural VP1, y posteriormente internalizarse en dicha célula mediante una vía clatrina-dependiente o bien mediante endocitosis o vía micropinocitosis [19]. Posteriormente, el genoma del RNA viral se libera del virión en el citoplasma de la célula huésped, y se traduce mediante los ribosomas de dicha célula en una sola lipoproteína, que es procesada por las proteasas virales para generar las diferentes proteínas virales anteriormente comentadas. A continuación, las proteínas no estructurales median la replicación del genoma

del RNA en los orgánulos de replicación, que se forman como resultado de un reordenamiento de las membranas celulares. Las moléculas de RNA recién sintetizadas pueden entrar en otra ronda de traducción y replicación o pueden empaquetarse en las proteínas de la cápside viral para formar nuevos viriones que se liberan tras la lisis celular, y también a través de mecanismos no líticos [20-21]

Existen diferentes receptores epiteliales a los que se unirán los RV/EV, y en este punto nos centraremos en los receptores utilizados específicamente por las diferentes especies de RV, en tanto que los usados por los EV respiratorios son más diversos o incluso desconocidos, y sobrepasarían los objetivos de esta introducción. Respecto a los RV-A y RV-B, la mayoría de serotipos utilizan la molécula de adhesión intercelular tipo 1 (ICAM-1) como receptor epitelial; de hecho, la infección por RV incrementa la expresión celular de este receptor [22]. No obstante, algunos serotipos de RV-A utilizan el receptor de lipoproteínas de baja densidad (LDL-R). En cuanto a los RV-C, precisan del receptor CDHR3 (del inglés *cadherin-related family 3*) para unirse a las células epiteliales [23].

Respuesta del huésped

A diferencia de otros virus respiratorios (como el virus respiratorio sincitial (VRS) o el virus de la gripe), los RV/EV no causan una destrucción directa del epitelio respiratorio ni tienen un efecto citopático definido [24]. En su lugar, los RV/EV comprometen la función de barrera del epitelio mediante la liberación de especies reactivas de oxígeno durante la replicación viral, que provocan la disociación de la zónula occludens-1 del complejo de unión celular [25]. Esta disrupción de la función de barrera incrementa la translocación de patógenos a su través, iniciando la cascada que conducirá a una infección respiratoria [25].

Una vez que los RV/EV han iniciado la infección del epitelio respiratorio, mediante el anclaje a sus receptores de superficie celular específicos e internalización posterior, los patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) de los RV/EV son reconocidos en la célula huésped a través de la interacción con receptores Toll-like (TLRs) [26-27]. Este reconocimiento implica la activación de múltiples factores de transcripción que culmina con la expresión del Interferón beta y gamma y la transcripción de varias citoquinas

pro-inflamatorias (entre ellas IL6, IL8, TNFalfa), generando un ambiente inflamatorio para combatir la infección viral [28]. Estos mediadores pro-inflamatorios activan y atraen al sitio de la infección a granulocitos, monocitos y células dendríticas, para generar una respuesta humoral a la infección. Los anticuerpos producidos durante la infección por RV/EV son serotipo específico; hecho que explica la posibilidad de infectarse por estos agentes en múltiples ocasiones, dado el elevado número de serotipos distintos [29]. Además, estos anticuerpos presentan escasa reactividad cruzada, lo que representa un desafío para el desarrollo de vacunas como se comentará posteriormente.

1.1.3 Epidemiología

La transmisión de las partículas víricas de RV/EV puede ocurrir principalmente a través de dos vías: vía contacto directo entre personas o con fómites contaminados, o vía inhalación de aerosoles. Existe debate en la literatura acerca de cuál de estas vías es la predominante. Algunos estudios defienden que la transmisión directa de humano a humano es relativamente sencilla, especialmente en presencia de elevada carga viral [30], dado que estos microorganismos son capaces de sobrevivir en las manos durante varias horas, y presentan una resistencia moderada a las soluciones alcohólicas desinfectantes [30]. La transmisión a través de la inhalación de aerosoles también ha sido documentada [31], y existe literatura que defiende que ésta sería la principal vía de transmisión en espacios cerrados [32].

Los RV/EV circulan por todo el mundo, y son considerados como el agente infeccioso más frecuente en el ser humano. Las infecciones ocurren a lo largo de todo el año, aunque con dos picos de incidencia en el hemisferio norte: el primero entre los meses de abril y mayo, y el segundo entre setiembre y octubre [33-34]. Sin embargo, el RV-C presenta una tendencia diferente, con un pico de incidencia durante los meses de invierno [35]. La mayoría de las infecciones son adquiridas en la comunidad, aunque recientemente se han reportado brotes de infecciones relacionadas con la asistencia sanitaria que han afectado tanto a pacientes como a personal sanitario [36]. El único reservorio conocido de estos microorganismos es el ser humano, especialmente la población pediátrica, pudiendo presentar entre 8-12 infecciones por estos agentes al

año (especialmente en los menores de 12 meses), mientras que en adultos se reduce a 2-3 episodios anuales [37]

1.1.4 Presentaciones clínicas

Las manifestaciones clínicas producidas por la infección por RV/EV son muy diversas, siendo la mayoría de ellas benignas y de resolución espontánea. Por este motivo, clásicamente estos microorganismos han sido minusvalorados; sin embargo, hoy sabemos que estos virus son una causa importante de hospitalización, que están implicados en múltiples cuadros de infecciones respiratorias (bronquiolitis, bronquitis, neumonías), y que tienen un papel en el desarrollo y exacerbaciones de enfermedades pulmonares crónicas como el asma [2]. A continuación, se describen las diferentes presentaciones clínicas producidas por la infección por RV/EV.

Estado de portador asintomático

Se define como estado de portador asintomático a la situación donde se detecta RNA de RV/EV en muestras de vías respiratorias altas de individuos sin sintomatología respiratoria. Este estado es más frecuente en los niños, y se ha estimado una prevalencia de alrededor del 14-22% [38]. Sin embargo, la confirmación del estado de portador es compleja, en tanto que la excreción del virus en las mucosas de dichas vías puede ocurrir hasta 5-6 semanas después del inicio de los síntomas respiratorios, y este período de tiempo puede ser superior en pacientes inmunodeprimidos [39].

Resfriado común

Los RV/EV son la principal causa a nivel mundial del denominado resfriado común [40]. Se estima que el período de incubación es de unos dos días [41], con una duración de los síntomas entre 7-10 días [42]. Esta entidad se caracteriza por clínica de congestión nasal y rinorrea, tos y estornudos, odinofagia y malestar general, entre otros síntomas, y suele resolverse de forma espontánea en una o dos semanas [43].

A pesar de tratarse de una entidad benigna, el resfriado común se asocia con importantes costes en cuanto a visitas médicas, absentismo laboral y uso inadecuado de antibióticos [44].

Otitis media aguda

La otitis media aguda (OMA) suele estar causada por bacterias o por co-infecciones de bacterias con virus, pero también se ha descrito la mono-infección viral como etiología de esta entidad [45]. En un estudio donde se analizaron 362 niños menores de 1 año con OMA, en el que se realizaron aspirados nasofaríngeos durante 9 meses con una periodicidad mensual, se detectó que los RV/EV y el VRS se asociaban específicamente con esta entidad ($p < 0.001$) [46].

Bronquiolitis

La bronquiolitis es la principal causa de hospitalización en la infancia. Se define como el primer episodio de dificultad respiratoria en menores de dos años. Después del VRS, los RV/EV son la segunda causa de esta entidad, suponiendo un 25% de los casos [47].

Hasta la fecha, existe controversia en la literatura acerca de que uno de estos dos virus sea causante de bronquiolitis más severas [48]. En algunos estudios se ha descrito una hospitalización más corta en aquellos pacientes con bronquiolitis por RV/EV [49]; sin embargo, otros estudios señalan que parece no haber diferencias significativas en cuanto a la prevalencia de RV/EV y VRS entre pacientes hospitalizados en unidades de hospitalización pediátricas o unidades de cuidados intensivos pediátricos (UCIP) [50].

Es importante destacar que los RV/EV sí parecen estar más implicados como causantes de bronquiolitis en aquellos pacientes con predisposición atópica [51], y han demostrado en múltiples estudios ser un factor de riesgo para el desarrollo de sibilancias recurrentes en la infancia [52-54]

Neumonía

En un gran estudio que evaluó la incidencia y distribución de patógenos causantes de neumonía adquirida en la comunidad en niños hospitalizados, se identificaron los virus (uno o más), las bacterias o las co-infecciones virales y bacterianas como etiología de esta entidad en un 66%, 8% y 7% de los casos, respectivamente [55]. Los patógenos más comúnmente detectados fueron el VRS (28%) y los RV/EV (27%); todos los demás virus o bacterias detectados estaban por debajo del 10%. Los RV/EV fueron encontrados principalmente entre niños de 5 a 17 años.

En otro estudio europeo donde se evaluaron las etiologías de neumonía adquirida en la comunidad en pacientes menores de 14 años, se reportó una prevalencia de RV/EV del 29% de los casos examinados [56].

Asma

Las infecciones virales son la principal causa de exacerbaciones asmáticas en la infancia [57], y se estima que aproximadamente dos tercios de estas infecciones son secundarias a RV/EV [58]. Las exacerbaciones asmáticas son estacionales, con dos picos de incidencia en los climas templados, uno al inicio del otoño y otro al inicio de la primavera [59]; este patrón coincide con la distribución estacional de los RV/EV [33-34], sugiriendo una estrecha relación causal.

En este punto es importante comentar el papel que pueden tener los virus en el desarrollo ulterior de asma. Actualmente sabemos que las infecciones virales son las principales causantes de los episodios de sibilancias en la población pediátrica, y que la ocurrencia de estos episodios se relaciona con el riesgo de presentar asma en la edad adulta [60]. En este sentido, estudios longitudinales han demostrado que los pacientes ingresados con bronquiolitis tienen entre 2 y 3 veces mayor riesgo de desarrollar asma, y este riesgo se ve aún más incrementado en los pacientes con antecedentes personales o familiares de atopía (dermatitis atópica, sensibilización IgE mediada frente a alimentos o aeroalérgenos, o eosinofilia) y en bronquiolitis causadas por RV/EV [52-54]. Por ejemplo, en un estudio caso-control realizado en Finlandia demostró que los pacientes hospitalizados por bronquiolitis RV/EV presentaban un riesgo incrementado de presentar asma en el futuro, y este riesgo se mantenía a 10 años vista [61].

Otras infecciones

Existe evidencia en la literatura de que los RV/EV pueden estar implicados en otros cuadros infecciosos no respiratorios. Por ejemplo, en un estudio de pacientes pediátricos hospitalizados por gastroenteritis se identificó RV/EV en un 10% de las muestras de heces [62]. En 2015 se describió el caso fatal de un lactante de 19 meses que ingresó en una UCIP por un síndrome de distrés respiratorio agudo severo y que falleció por este motivo, en el que se identificó el RV-C en sangre, pulmones, heces y líquido cefa-

lorraquideo como agente causal en la autopsia, evidenciando la capacidad que tienen algunos subtipos de RV/EV para diseminarse más allá del aparato respiratorio [63]. Es interesante señalar también en este punto la implicación que pueden tener estos microorganismos en cuadros neurológicos; por ejemplo, la infección por EV-D68 se ha relacionado con casos de mielitis flácida [64] o de meningoencefalitis con disautonomía severa y exitus [65]. Otro ejemplo sería el brote de rombencefalitis causado por el EV-A71 en el año 2016 [66].

Otro escenario clínico donde los RV/EV pueden estar implicados es en la fiebre sin foco. El manejo del lactante menor de tres meses con síndrome febril sin foco ha sido históricamente debatido en Pediatría, en tanto que la posibilidad de que estos cuadros sean causados por infecciones bacterianas es alta, lo que requiere una rápida evaluación clínica, recogida de cultivos de muestras estériles e inicio de antibioterapia empírica.

Sin embargo, detrás de estos cuadros clínicos también pueden estar las infecciones víricas. En un estudio publicado en 2018 [67] donde se evaluaron pacientes menores de 3 meses con síndrome febril sin foco se detectó una infección viral en el 55% de los casos, y de ellos los RV/EV fueron los agentes más frecuentemente detectados (69%). Los pacientes infectados por un virus tuvieron menor probabilidad de estar infectados por una bacteria; sin embargo, aquellos lactantes con infección por RV/EV presentaron también una infección bacteriana de forma mucho más frecuente que los pacientes con otras infecciones víricas (7.5 vs 3.5% respectivamente, RR =2.12 (1.43-3.15)). Dentro del subgrupo de pacientes menores de 1 mes, se evidenció que la detección de RV/EV no disminuía la incidencia de infección urinaria, bacteriemia o meningitis. Por todo ello, la detección de RV/EV en lactantes febriles no debe disuadir de la utilización de antibioterapia en estos cuadros clínicos.

1.1.5 Métodos diagnósticos

Recogida de muestras

En caso de ITRS el frotis o aspirado nasofaríngeo ha demostrado ser más sensible que el frotis nasal u orofaríngeo por separado [68]. En caso de ITRI, las muestras pueden ser obtenidas mediante aspiración traqueal o bronquial, lavado broncoalveolar, o más raramente por biopsia pulmonar. Sin embargo, la disponibilidad de estas técnicas invasivas en la práctica clínica diaria es limitada, y la mayoría de los estudios microbiológicos para infecciones respiratorias en edad pediátrica se realizan a partir de muestras obtenidas del tracto respiratorio superior mediante aspirado o frotis nasofaríngeo. De hecho, se ha demostrado que en niños inmunocompetentes existe una elevada correlación en cuanto a detección viral comparando muestras obtenidas mediante aspirado nasofaríngeo o lavado broncoalveolar [69].

Una vez obtenidas las muestras deben ser enviadas rápidamente al laboratorio para su posterior análisis. Si el envío se va a demorar unos días deben transportarse congeladas o en un medio de transporte viral a 4°C.

Métodos moleculares

Los cultivos virales tienen una baja sensibilidad y no ofrecen resultados hasta unos 14 días después de su recogida, por lo que no suelen ser útiles en la práctica clínica diaria.

En cambio, el desarrollo de las técnicas moleculares ha supuesto una revolución en el diagnóstico etiológico de las infecciones respiratorias. Las técnicas basadas en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, del inglés *Polymerase Chain Reaction*) permiten detectar y cuantificar a un amplio rango de microorganismos. Actualmente, los paneles de PCR múltiple en tiempo real permiten detectar múltiples microorganismos en una sola reacción de PCR reduciendo el volumen de muestra inicial, así como el uso de reactivos, el tiempo de preparación y el coste, y aumentando el rendimiento de la técnica [70-71].

Sin embargo, la mayoría de estos paneles son incapaces de diferenciar las especies de RV/EV, en tanto que la diana de replicación de estas técnicas es la región no codificable 5', altamente conservada en estos microorganismos como se ha comentado con

anterioridad. Por ello, son necesarios estudios moleculares específicos para lograr dicha discriminación a nivel de especies [72].

1.1.6 Tratamiento

Antivirales

Hasta la fecha, ningún tratamiento antiviral específico para la infección por RV/EV ha sido aprobado, por lo que el manejo de los cuadros clínicos producidos por estos microorganismos se basa en un tratamiento de soporte.

Diversos factores explican la dificultad para el desarrollo de fármacos activos contra estos virus [73]. Por un lado, el elevado número de serotipos, su diversidad genética, y la elevada incidencia de mutaciones espontáneas en el RNA de estos microorganismos supone un obstáculo mayor. Por otra parte, para que estos tratamientos fueran efectivos sería necesario iniciarlos en una fase inicial de la infección, y este aspecto puede resultar complicado en tanto que el diagnóstico en dichas fases puede ser complejo. En este contexto es fácil entender que el desarrollo de estos fármacos supone un elevado coste económico; este hecho, junto con la benignidad de la mayoría de los cuadros clínicos producidos por estos microorganismos, ha limitado el interés de la industria farmacéutica en encontrar un tratamiento para el resfriado común. Este fracaso supone una ironía para la ciencia, tal y como resumieron White y Fenner: "En esta era de trasplante de órganos, ingeniería genética, y otras demostraciones dramáticas de las maravillas de la ciencia médica, la gente puede percibir cierta ironía en la incapacidad de la medicina moderna para conseguir el más mínimo impacto sobre la más trivial de todas las dolencias humanas, el resfriado común" [74].

Sin embargo, existen algunos antivirales que han demostrado actividad inhibitoria frente a RV/EV, que comentaremos a continuación.

Los inhibidores de la formación de la cápside son uno de los principales grupos de antivíricos frente a RV/EV. Estos fármacos se unen a la proteína VP1 previniendo los cambios conformacionales de la cápside que son necesarios para la unión del virus a la célula huésped. Dentro de este grupo, el primer fármaco que se desarrolló fue *Pirodavir*, demostrando en un modelo animal que era capaz de prevenir la infección por

RV/EV administrado vía intranasal. Sin embargo, tan solo demostró actividad frente a la infección si se administraba 10 minutos después del contagio, sin observarse ningún efecto si se administraba 24 horas después de éste [75]. Otro fármaco perteneciente a esta familia es *Pleconaril*, que fue el primer antiviral contra RV/EV estudiado en ensayos clínicos con humanos. En dos estudios paralelos prospectivos, doble ciego, controlado por placebo [76], la administración vía oral de este medicamento 24 horas después del inicio de los síntomas de la enfermedad demostró reducir la duración de estos síntomas (1 día menos, $p < 0.001$) en comparación con el grupo placebo. Sin embargo, estos beneficios clínicos presentaron una elevada correlación con la susceptibilidad del virus a la medicación [77], no observándose en aquellos con sensibilidad reducida o resistentes a *Pleconaril*. Finalmente, otro inhibidor de la formación de la cápside es *Vapendavir*, que se estudió en un ensayo clínico fase IIb para determinar su efectividad en la prevención de las ITRS en 455 participantes adultos con asma moderada-severa, no siendo capaz de cumplir su objetivo principal que era la reducción de los síntomas [78].

Otro grupo de fármacos antivirales frente a RV/EV son los inhibidores de la proteasa. Estas moléculas actúan previniendo la escisión de las proteínas virales en el ciclo de replicación viral. Uno de estos medicamentos es *Rupintrivir*, que actúa inhibiendo la proteasa 3C, y ha demostrado actividad antivírica in vitro contra diferentes serotipos de RV/EV [79], incluidos serotipos de la especie RV-C [80]. Sin embargo, no existen hasta la fecha ensayos clínicos para testar la efectividad in vivo de estos tratamientos.

Otra estrategia que se ha investigado para prevenir la infección por RV/EV es impedir que estos virus se unan a sus receptores celulares (LDL-R, ICAM-1, o CDHR3). Hasta la fecha, sólo se han testado anticuerpos monoclonales contra ICAM-1, como por ejemplo el fármaco Tremacamra, que demostró ser efectivo mejorando los síntomas de la infección por RV/EV administrado antes y después de la infección [81]. Sin embargo, este fármaco presenta una desventaja importante en tanto que precisa de una dosificación frecuente (6 dosis diarias, cada 3 horas vía intranasal). Recientemente, se ha desarrollado un anticuerpo anti ICAM-1 de origen murino (14C11) [82], que administrado de forma tópica o sistémica en modelos animales ha demostrado reducir la carga viral y las citoquinas proinflamatorias [82].

Además de los fármacos antivirales específicos para RV/EV, se han intentado utilizar otros tratamientos para el manejo de esta infección. Por ejemplo, los corticoides, que administrados vía intranasal no han demostrado ningún efecto [83]; sin embargo, cuando se administran sistémicamente en pacientes pediátricos de 3-35 meses de edad hospitalizados por una bronquiolitis por RV/EV parecen reducir la recurrencia de episodios causados por estos microorganismos a un año vista [84]. Otros fármacos estudiados en la literatura son la azitromicina [85], la vitamina D [86], o el interferón beta inhalado [87], siendo la efectividad de todos ellos discutida.

Vacunas

Durante décadas, el desarrollo de vacunas contra la infección por RV/EV se ha considerado irrealizable. Teóricamente, una respuesta humoral neutralizante eficiente y altamente específica contra la infección por RV/EV debería conferir protección. Sin embargo, debido al elevado número de cepas virales recientemente reconocidas, se puede provocar poca reactividad cruzada mediante anticuerpos neutralizantes [88].

En los últimos años se han intentado implementar dos estrategias principales para intentar superar la dificultad de la diversidad antigénica de los RV/EV. La primera estrategia consiste en el desarrollo de una vacuna multivalente que comprende múltiples serotipos de RV/EV. En este sentido, una vacuna de virus completo decavalente inactivado con formalina mostró un aumento en los niveles de anticuerpos neutralizantes, activos contra hasta el 40% de los serotipos conocidos [88]. Recientemente, una vacuna polivalente con 50 serotipos incluidos demostró ser inmunogénica contra aproximadamente un tercio de los RV/EV circulantes en los macacos rhesus, lo que induce una respuesta neutralizante amplia [89]. Cabe señalar que una limitación del estudio realizado por Lee et al. es que los autores no incluyeron en el diseño de la vacuna antígenos de la especie RV-C, que representa un problema crucial para la población pediátrica.

Una segunda estrategia para inducir inmunidad protectora contra diferentes serotipos de RV/EV es desarrollar vacunas de subunidades, que consisten en regiones pequeñas pero conservadas de la estructura molecular de los RV/EV, y éstas se unen con un adyuvante capaz de potenciar la respuesta de las células T. El objetivo de este proceso es

aumentar el espectro serológico de cobertura mientras se limita el número de antígenos necesarios. La proteína VP1 y las regiones de la cápside VP4 y VP2 son las estructuras de la cápside viral más conservadas y representan un objetivo prometedor para el desarrollo de vacunas [88-89].

Finalmente, añadir que la respuesta futura para el desarrollo exitoso de una vacuna contra los RV/EV puede residir en la tecnología del ácido ribonucleico mensajero (ARNm). Las vacunas basadas en dicha tecnología han demostrado ser seguras y eficaces, tal y como nos ha enseñado la pandemia por SARS-CoV2. Sin embargo, no existen hasta la fecha ensayos clínicos para el desarrollo de una vacuna anti RV/EV basada en esta plataforma [90].

El desarrollo de estrategias preventivas frente a la infección por RV/EV se antoja aún más necesaria si cabe en el futuro inmediato. Es probable que en los próximos años se comercialicen los anticuerpos monoclonales contra el VRS para niños a término [91]. En los ensayos clínicos se ha observado una elevada eficacia de estos anticuerpos frente a VRS; sin embargo, es posible que la tasa de hospitalización por infección respiratoria se mantenga estable tanto en el grupo de vacunados con estos anticuerpos como en el de no vacunados, a expensas de un incremento de otras etiologías virales (principalmente RV/EV) [91]. Por tanto, es posible que cuando estas estrategias de mitigación frente al VRS empiecen a ser efectivas, los RV/EV constituyan la principal causa de infección respiratoria y hospitalización, lo que enfatiza la importancia de la investigación de nuevas estrategias terapéuticas frente a estos virus.

1.2 Factores modificadores de la gravedad de la infección por RV/EV

Como hemos visto con anterioridad, los cuadros clínicos producidos por los RV/EV son múltiples y heterogéneos, pudiendo causar desde infecciones asintomáticas hasta infecciones graves con compromiso vital. No se conoce con exactitud por qué algunos individuos desarrollan cuadros más leves cuando se infectan por estos microorganismos, y otros en cambio cursan con infecciones severas.

En la presente sección se discuten los principales factores descritos en la literatura como posibles modificadores de la gravedad de la infección por RV/EV, divididos en 4 grupos: factores dependientes del virus, del huésped, del ambiente, y de la relación de estos virus con los microorganismos del nicho ecológico, en donde introduciremos el concepto de microbiota.

1.2.1 Factores dependientes del virus

Actualmente sabemos que dentro del género *Enterovirus* se incluyen siete especies que afectan al ser humano, tres especies de RV (RV-A, RV-B y RV-C) y cuatro de EV (EV-A, EV-B, EV-C y EV-D). Existen múltiples estudios en la literatura que han intentado demostrar que la especie de RV puede determinar la severidad de la infección. Las especies de RV-A y RV-C son más prevalentes y parecen estar relacionadas con cuadros clínicos más severos; en cambio, los RV-B se detectan con mayor frecuencia en pacientes asintomáticos [92-94]. Sin embargo, existen otros estudios con resultados opuestos, en los que se reporta que los RV-C se relacionaron con infecciones más leves [95], incluso otros no demostraron ninguna correlación de esta especie con gravedad o posibilidad de hospitalización [96]; otro estudio señaló que no existieron diferencias en cuanto a severidad o características clínicas entre las diferentes especies de RV [97], en contraste con otro trabajo que encontró que los RV-B se relacionaron con hospitalizaciones más prolongadas [98]. Por lo tanto, hasta la fecha la especie de RV como determinante de severidad es objeto de controversia. En cambio, sí que parece existir consenso en la literatura en la imposibilidad de diferenciar las diferentes especies de RV en función de la sintomatología producida [99].

Respecto a las especies de EV, se ha descrito en la literatura que algunas especies de EV-D (especialmente EV-D68) circulan mundialmente en forma de brotes, como por ejemplo el brote detectado en Estados Unidos en el otoño de 2014 [100], que afectó predominantemente a la población pediátrica, causando infecciones respiratorias de diversa gravedad, especialmente en pacientes con antecedentes de sibilancias recurrentes o asma; o el brote de rombencefalitis causado por EV-A71 en Cataluña en el año 2016 [66]. Los EV-A y EV-C también presentan un elevado tropismo respiratorio [101-102], pero no se han descrito hasta la fecha que infecciones por una determinada especie puedan ser más graves que otras.

Hablaremos ahora del papel que la carga viral puede tener a la hora de modular la gravedad de la infección por RV/EV. Se ha observado que los pacientes con infecciones sintomáticas por RV/EV presentan una carga viral más elevada en comparación con los pacientes asintomáticos [103-104]. Sin embargo, múltiples estudios han intentado determinar unos valores de corte de carga viral que puedan predecir mayor gravedad, con resultados dispares. Mientras algunos de estos estudios encontraron una asociación entre elevadas cargas virales y severidad de la enfermedad, mayor riesgo de ITRI e insuficiencia respiratoria aguda en niños [105], otros estudios no han podido confirmar estos hallazgos [106]; por tanto, la carga viral parece insuficiente como valor aislado para determinar la gravedad de la infección.

1.2.2 Factores dependientes del huésped

Edad

La población pediátrica constituye el principal reservorio de los RV/EV, por lo que su papel en la transmisión de esta infección en la comunidad es clave [107]. Para ilustrar este punto, diversos estudios han demostrado que, en países del hemisferio norte, el regreso al colegio tras el período vacacional estival se relaciona con un pico de incidencia de la infección por estos virus, con un incremento de las visitas en los servicios de urgencias y un mayor número de exacerbaciones asmáticas [108-109].

Además de ser el grupo etario donde las infecciones por estos microorganismos son más frecuentes, los niños tienen un riesgo incrementado de que éstas sean sintomáti-

cas cuánto más pequeños sean. Esto ha sido ejemplificado por diferentes autores en la literatura. Un estudio caso-control realizado en África mostró que la infección por RV/EV se asociaba con mayor frecuencia a neumonía en niños entre los 13 y 59 meses de edad [110]. Otro estudio centrado en niños hospitalizados observó que el 71.4% de las infecciones por RV/EV se dieron en niños menores de 3 años [111].

Las especies de RV-C parecen estar implicadas en infecciones detectadas a una edad más temprana, particularmente en niños menores de dos años [112]. En cambio, las especies de RV-A se observan con mayor frecuencia en poblaciones adultas [113]. Las especies de RV-C parecen ser más inmunogénicas, lo que apoya la hipótesis de que con la edad se desarrolla inmunidad protectora contra éstas, permitiendo la mayor frecuencia de infecciones por RV-A en poblaciones más mayores [114]. Esta mayor susceptibilidad a RV-C podría deberse a una inmadurez del sistema inmunológico de los niños pequeños, por lo que el RV-A se vuelve más común con la edad debido a su mayor prevalencia general.

La población anciana, por su parte, también constituye un grupo en el que las infecciones por RV/EV son frecuentes [115], y con mayor riesgo de complicaciones. La neumonía causada por RV/EV en esta población ha demostrado una morbilidad y mortalidad mayor que la neumonía por virus Influenza, especialmente en aquellos ancianos afectados de enfermedad pulmonar crónica [116].

Comorbilidades

1. Asma: La relación entre la infección por RV/EV y el asma ha sido objeto de discusión en la literatura médica [117-118]. Como se ha comentado con anterioridad, la infección por estos virus es un predictor para el desarrollo de sibilancias recurrentes [119], muy frecuentes entre los niños menores de 5 años, y representan un riesgo a medio plazo para el desarrollo del asma [120], incluso en poblaciones pediátricas sin factores predisponentes [121]. Además, se ha descrito la infección por estos microorganismos como factor desencadenante de las exacerbaciones asmáticas, tanto en adultos como en niños [122].

Otro aspecto que también se ha estudiado es si, en función de la especie de RV/EV, el papel que puedan tener sobre el desarrollo o las descompensaciones del asma sea diferente [123]. Las especies de RV-C se han asociado, especialmente en niños menores de 5 años, a mayor posibilidad de desarrollo de asma y a mayor severidad de ésta [124]. En cambio, otros estudios no han identificado que dicha especie pueda tener un papel diferencial en los resultados clínicos [125]. Respecto a las especies de RV-A, se han descrito como clínicamente más relevantes en pacientes asmáticos que no requieren hospitalización, en cuanto a que se asocian con peor control de los síntomas del asma, entre ellos la tos prolongada [125]. Por tanto, no queda claro que sea la especie de RV/EV la que pueda justificar la mayor o menor gravedad de presentación de los cuadros asmáticos.

2. Prematuridad: Los RV/EV pueden causar infecciones respiratorias severas en pacientes prematuros, constituyendo la principal causa de hospitalización en esta población [126]. Existen estudios que han demostrado que prematuros extremos (nacidos con una edad gestacional inferior a las 32 semanas) hospitalizados por una infección por estos microorganismos presentan signos clínicos de obstrucción del tracto respiratorio inferior, lo que traduciría una hiperreactividad de la vía aérea como mecanismo fisiopatológico que explicaría la susceptibilidad de estos pacientes a dichos virus [127]. Sin embargo, la prematuridad también se ha descrito como factor de riesgo para infecciones respiratorias severas por otros virus (VRS, metapneumovirus humano) [128-129].

3. Cardiopatía congénita: Se han descrito manifestaciones de la infección por RV/EV en pacientes pediátricos con cardiopatías congénitas [130], tales como hipertensión pulmonar severa, cianosis, u hospitalización prolongada. De hecho, un estudio realizado por Delgado-Corcoran et al. demostró que la infección por estos microorganismos complicaba el curso postoperatorio de los pacientes intervenidos de cirugía cardíaca [131], con un incremento de la necesidad de ventilación mecánica invasiva (VMI) y ventilación mecánica no invasiva (VNI), terapia con óxido nítrico y prolongación de la estancia en UCI, llegando a proponer considerar atrasar la cirugía en pacientes positivos para estos virus si la situación clínica lo permite. Sin embargo, otros estudios han demostrado hallazgos similares cuando se ha analizado el papel de otros virus respira-

torios en el postoperatorio de cirugía cardíaca, especialmente el VRS y el virus Influenza [132]. La cardiopatía congénita en sí misma se ha descrito como factor de riesgo independiente para una enfermedad más severa independientemente de la etiología de la infección respiratoria [133].

4. Inmunosupresión: Los pacientes inmunocomprometidos constituyen también una población de riesgo para sufrir una infección por RV/EV [134], dado que esta población puede desarrollar infecciones virales crónicas y re-infecciones dada su incapacidad para eliminar a estos microorganismos. Este hecho se ha relacionado con la aparición de nuevos serotipos de RV/EV [135].

1.2.3 Factores dependientes del ambiente

Cabe pensar que la transmisibilidad y la gravedad de la infección por RV/EV puede verse modificada también en función de variaciones climatológicas, tales como la humedad o la temperatura. Existen estudios que demuestran una mayor circulación de los RV/EV en las estaciones lluviosas de países tropicales [136-137]. Sin embargo, otros trabajos contradicen estos hallazgos, observando una mayor circulación de estos microorganismos en las estaciones secas [138-139]. En cambio, estudios realizados en países mediterráneos no han observado ninguna asociación entre variaciones meteorológicas e infecciones por RV/EV [140]; dichas asociaciones sí se han descrito en el mismo ámbito geográfico con el VRS [141] y el virus Influenza [142].

Tal y como decíamos, los RV/EV son virus con una circulación global, con varios subtipos detectados al mismo tiempo en diferentes continentes al mismo tiempo [143]. Es interesante señalar que incluso esta circulación global se ha mantenido en situaciones que no fueron favorables para la transmisión de otros virus, como es el caso de la pandemia por la COVID19. Todas las medidas no farmacológicas instauradas por los diferentes gobiernos para intentar frenar la transmisión del SARS-CoV2 resultaron en una reducción drástica de las infecciones respiratorias por VRS, adenovirus, o virus Influenza. Por el contrario, los RV/EV mantuvieron su estacionalidad habitual, en co-circulación con el SARS-CoV2, a pesar de las medidas que comentábamos [144]. De hecho, en un estudio realizado en nuestro centro durante el primer pico epidémico del SARS-CoV2 (marzo-abril 2020) se observó que los RV/EV constituyeron la principal cau-

sa de ITRI que precisó ingreso hospitalario [145], a pesar de que en aquel momento las escuelas estaban cerradas en nuestro país. Se han propuesto diferentes explicaciones para justificar este comportamiento de los RV/EV durante la pandemia, como por ejemplo su tropismo por las vías respiratorias superiores en comparación con otros virus (VRS, virus Influenza), su período infectivo prolongado y su menor sensibilidad a las soluciones hidroalcohólicas [146].

Otro factor a tener en cuenta en este punto es el de la contaminación ambiental. La exposición a contaminantes aéreos (tales como el dióxido sulfúrico, ozono, dióxido de nitrógeno u óxido nítrico) se ha asociado a exacerbaciones respiratorias en pacientes asmáticos, tanto en adultos como en niños [147]. Los cambios en las concentraciones de estas partículas en el ambiente podrían estar relacionados con el número de ingresos hospitalarios por infecciones respiratorias [148-149]. Sin embargo, existe información escasa acerca del papel que pueden tener estos contaminantes en el escenario específico de la infección por RV/EV.

1.2.4 Factores dependientes de la interacción de los RV/EV con otros microorganismos: rol de la microbiota

En la actualidad, la comunidad científica está otorgando un mayor reconocimiento a los microorganismos que colonizan el cuerpo humano, en tanto que podrían constituir un factor importante para determinar la gravedad de las infecciones respiratorias virales [150]. La microbiota humana está compuesta por una intrincada red de bacterias, virus, hongos, bacteriófagos, arqueas y eucariotas menores que colonizan las mucosas de diferentes regiones del cuerpo humano, y desempeña roles esenciales en las funciones de éste, incluida la digestión de los alimentos, la nutrición, la regulación del metabolismo y de la defensa inmunitaria contra las infecciones, entre otras [151].

Empezando con la microbiota viral, comentar que la mayoría de estudios sobre esta microbiota se basan en técnicas moleculares mediante PCR múltiple en muestras de vías respiratorias superiores [152]. Es importante destacar que las co-infecciones virales de RV/EV con otros virus respiratorios (VRS, adenovirus, coronavirus, parainfluenza) son frecuentes [152]. Sin embargo, la relación entre co-infección viral y gravedad de la enfermedad es objeto de controversia en la literatura. Algunos estudios reportan que

la co-infección viral está asociada a un riesgo incrementado de ingreso prolongado en UCIP y a necesidad prolongada de VM [153], mientras que otros no muestran diferencias clínicamente significativas en cuanto a gravedad entre las mono-infecciones vs co-infecciones [154]. No obstante, la mayor parte de la literatura publicada no se centra en infecciones víricas concretas a la hora de analizar el papel de la co-infección viral como factor de gravedad, y éste podría ser diferente en función de la etiología vírica [155]. En este sentido, la co-infección viral de RV/EV más estudiada en la literatura es con el VRS, dado que son las dos principales etiologías de infecciones respiratorias en la infancia, como ya se comentado [3]. Los RV/EV son uno de los virus más frecuentemente detectados en muestras respiratorias donde se aísla el VRS [156]. La co-infección de estos microorganismos parece incrementar la sensibilización alérgica respecto a la mono-infección, resultando en mayor riesgo de sibilancias recurrentes y asma [156-157].

Sin embargo, la co-infección de RV/EV con otros virus respiratorios puede también tener un papel protector. Este concepto se conoce como interferencia viral. Por ejemplo, en el caso del virus Influenza, la co-infección con RV/EV es menos frecuente de lo esperado [91], en contraste con lo reportado por algunos estudios basados en modelos matemáticos, donde la co-infección RV/EV-virus Influenza estaría asociada a una mayor gravedad de la enfermedad [158]. Otro ejemplo sería la co-infección con el virus SARS-CoV2; en este escenario, un estudio demostró mediante un modelo matemático que la infección por RV/EV produciría una resistencia temporal a la infección por este microorganismo mediante la estimulación de la inmunidad innata en el tracto respiratorio superior [159].

Continuaremos con la microbiota bacteriana, puesto que resultan las comunidades microbianas más estudiadas, en tanto que se ha sugerido que en nuestro organismo existe un número de células bacterianas parecido o incluso mayor al de células humanas [160], presentando una elevada diversidad genética, por lo que se han llegado a considerar el segundo genoma humano [161].

Inicialmente, el estudio del microbioma bacteriano humano se centró en la investigación de las bacterias que habitan la mucosa intestinal [162]. Sin embargo, en los últi-

mos años estos estudios se han generalizado a otras regiones del cuerpo humano, describiéndose comunidades bacterianas específicas en la piel [163], vagina [164] y tracto respiratorio [165], entre otras.

Dentro del aparato respiratorio, la región más estudiada es la nasofaringe, tanto por su accesibilidad como por su posición estratégica entre el tracto respiratorio superior e inferior, constituyendo la puerta de entrada de bacterias patógenas y el hábitat de patobiontes, que son bacterias que tienen un comportamiento dual, capaces de producir colonización asintomática pero también capaces de invadir torrente sanguíneo y producir enfermedad potencialmente grave [166], como *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* y *Moraxella catarrhalis*.

Desde el nacimiento, la composición de la microbiota respiratoria sufre cambios continuos hasta alcanzar una estructura estabilizada aproximadamente hacia los dos años de vida [167-168]. Existen múltiples factores que se han relacionado con el desarrollo de una microbiota protectora o de riesgo frente a infecciones respiratorias en el tracto respiratorio superior en edades tempranas de la vida [169], tales como la alimentación mediante lactancia materna [170], el parto vaginal [171], la asistencia a guarderías [172], las estrategias de vacunación [173], o la exposición a antibióticos [174]. Algunos estudios han descrito perfiles de microbiota relacionados con salud respiratoria, caracterizados por predominio de especies de los géneros *Corynebacterium*, *Dolosigranulum* y *Moraxella*, que ejercerían un efecto protector frente a la colonización por especies con potencial patogénico, como *S.pneumoniae* o *H.influenzae* [167]. En este sentido, se ha demostrado que pacientes pediátricos con microbiotas nasofaríngeas con abundancia de géneros como *Haemophilus*, *Streptococcus* y *Moraxella* tienen mayor riesgo de otitis media aguda [175]. En cambio, microbiotas nasofaríngeas con mayor abundancia de géneros como *Dolosigranulum*, *Corynebacterium*, *Propionibacterium* o *Lactococcus* se han relacionado con menor riesgo de esta infección [176]. Sin embargo, otros estudios han demostrado hallazgos contradictorios, relacionado la colonización temprana de la nasofaringe por *Moraxella* a un aumento de las infecciones respiratorias en el primer año de vida [177], o la asociación de *Dolosigranulum pigrum* con la coinfección por el virus de la gripe en adultos [178]. Es necesario por tanto profundizar en estudios futuros en el conocimiento de las complejas relaciones de las bacterias

que conforman la microbiota nasofaríngea entre ellas, con el patógeno y con el huésped, en el desarrollo de las infecciones respiratorias. En este sentido un estudio realizado por nuestro grupo analizó la microbiota nasofaríngea bacteriana a nivel de especie, observando que perfiles de microbiota ricos en *Moraxella linconii* se asociaban con salud respiratoria [179].

Centrémonos ahora en el escenario específico del papel que la microbiota nasofaríngea bacteriana puede tener en el desarrollo de infecciones respiratorias de causa viral. Se ha postulado que estas comunidades bacterianas podrían prevenir al huésped de la infección viral a través de un efecto barrera, manteniendo una respuesta inmune protectora o, por el contrario, predisponer a la infección al facilitar la invasión viral [179]. Así mismo, la infección viral podría facilitar la colonización y el crecimiento excesivo de bacterias patógenas en el tracto respiratorio, mediante la modulación de las respuestas inmunitarias y la susceptibilidad a la invasión bacteriana [180]. Se trata, por tanto, de una relación bidireccional.

Empezando por los estudios de microbiota nasofaríngea bacteriana clásicos, centrados en analizar las co-infecciones bacterianas con RV/EV mediante técnicas de cultivos, se ha demostrado que la infección por RV/EV se asocia a un incremento de la detección de bacterias con potencial patogénico en el tracto respiratorio (*Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* y *Moraxella catarrhalis*), lo que comporta mayor riesgo de infección del tracto respiratorio inferior (ITRI) severa [181]. La respuesta del huésped a la infección por RV/EV podría promover la proliferación bacteriana, resultando en infecciones más severas, independientemente de la especie de RV/EV, así como en estancias hospitalarias más prolongadas [182]. En pacientes adultos se ha descrito una mayor severidad de la infección por RV/EV en co-infección con bacterias [183], así como exacerbaciones en pacientes con enfermedad pulmonar obstructiva crónica [184-186].

También se ha demostrado el papel que la microbiota nasofaríngea puede tener en el desarrollo de infecciones respiratorias del tracto inferior, facilitando o bien impidiendo la replicación y extensión de virus y bacterias potencialmente patógenas, y viceversa. En este sentido, se ha descrito que la infección por RV/EV en pacientes adultos con

diagnóstico de enfermedad pulmonar obstructiva crónica altera la microbiota nasofaríngea y podría precipitar infecciones bacterianas [187]. Sin embargo, existe poca evidencia que aclare si existen cambios en la microbiota nasofaríngea asociados con la gravedad de la infección por RV/EV en pacientes pediátricos. En cambio, sí que se han descrito cambios en la microbiota nasofaríngea de pacientes pediátricos diagnosticados de bronquiolitis por VRS. Estos estudios describieron que la detección de *H.influenzae* y el género *Streptococcus* en nasofarínge en niños menores de dos años se asociaba a mayor gravedad de la infección respiratoria viral y a ingreso en UCI [188]. Los perfiles de microbiota enriquecidos en *H.influenzae* y *Streptococcus* se han asociado con una respuesta inflamatoria exagerada y una infección por VRS clínicamente más grave [189]. También se han descrito cambios similares en niños con neumonía adquirida en la comunidad [190]. Como vemos, la microbiota nasofaríngea no parece estar relacionada solamente con la susceptibilidad del huésped a la infección, sino también con la modulación de la gravedad de ésta.

Por todo lo comentado, es presumible que el análisis de la microbiota bacteriana nasofaríngea podría constituir un factor clave a la hora de analizar la heterogénea presentación clínica de la infección por RV/EV en población pediátrica.

1.3 Metodología para el estudio del microbioma humano

1.3.1 Introducción

Los avances tecnológicos han ido construyendo y moldeando nuestra perspectiva sobre los microorganismos a lo largo de los siglos. Los primeros estudios de microbiota respiratoria humana se basaban en técnicas de microscopía y cultivo tradicional, centrándose en el aislamiento e identificación de bacterias del tracto respiratorio superior con papel patógeno [191-192]. Posteriormente, el desarrollo de técnicas moleculares permitió caracterizar las comunidades microbianas utilizando la información codificada en el genoma de los microorganismos [193]. La aparición de la PCR permitió inicialmente identificar la presencia o ausencia de un microorganismo en una muestra [193]; más adelante cuantificar su concentración mediante técnicas de PCR cuantitativa [194]; y en la actualidad detectar múltiples microorganismos en una sola reacción de PCR gracias a la técnica de PCR múltiple [195].

En la actualidad, las técnicas de secuenciación masiva (NGS, del inglés *Next Generation Sequencing*), aparecidas en la década del 2000, han permitido caracterizar con gran precisión las comunidades microbianas humanas [196]. Existen básicamente dos técnicas pertenecientes a este grupo que describiremos brevemente a continuación: la secuenciación de amplicones, y la metagenómica shotgun.

La secuenciación de amplicones constituye en la actualidad el método más empleado para el análisis del microbioma humano. Consiste en extraer el ADN genómico directamente de la muestra clínica, amplificando una región genómica conservada en el genoma de los microorganismos (en el caso de los procariotas, el gen 16S rRNA del que hablaremos más tarde) y la posterior secuenciación de los amplicones generados. A su vez, estas regiones génicas conservadas poseen regiones hipervariables que permiten la identificación taxonómica, la elaboración de perfiles filogenéticos de las comunidades microbianas estudiadas, y la descripción de la funcionalidad de los microorganismos estudiados comparando las secuencias con genomas de referencia [196]. Sin embargo, esta técnica también presenta limitaciones, especialmente a la hora de distinguir especies filogenéticamente cercanas [197].

La metagenómica *shotgun o clinical metagenomics*, en cambio, secuencía todo el ADN genómico de toda clase de microorganismos presentes en una muestra [198]. Estos análisis permiten trazar el perfil taxonómico de la comunidad microbiana a estudio con resolución a nivel de especie. Sin embargo, es una técnica más compleja que la secuenciación de amplicones, con dificultad para el análisis bioinformático de los datos extraídos, y con mayor coste económico [198].

Este trabajo de tesis se centra en el estudio de las comunidades bacterianas que habitan la nasofaringe humana desde el punto de vista de su composición taxonómica a partir de la secuenciación del gen 16S rRNA, por lo que nos centraremos en él a continuación.

1.3.2 El gen ribosomal 16S rRNA

El ARN ribosomal bacteriano constituye un marcador de la evolución de las bacterias [199], por lo que su análisis se utiliza para establecer relaciones filogenéticas entre las diferentes especies [200].

Estas moléculas se encuentran, como su propio nombre indica, en los ribosomas de las células bacterianas, que son orgánulos citoplasmáticos encargados de la síntesis de proteínas. Los ribosomas bacterianos están formados por dos subunidades: la 30S y la 50S. La subunidad 30S está conformada por 21 proteínas diferentes y la molécula de ARN ribosomal 16S. Este gen tiene una longitud de unos 1542 pares de bases, y alterna en su estructura regiones conservadas y nueve regiones hipervariables (V1-V9) [201]. Estas últimas presentan variaciones en las secuencias de nucleótidos que son reflejo de los diferentes cambios evolutivos de las bacterias. De esta forma, el diseño de cebadores de PCR dirigidos a zonas conservadas del gen 16SrRNA permite amplificar todo el gen de la mayoría de las bacterias presentes en una muestra, a la vez que los cambios en las regiones hipervariables permiten la identificación taxonómica, la comparación y el establecimiento de filogenias [202]. El par de cebadores S-D-Bact-0341-b-S-17 y S-D-Bact-0785-a-A-21 que amplifican la región V3-V4 del gen 16SrRNA de aproximadamente 464 pb ha mostrado ser el que ofrece los mejores resultados a la hora de

detectar los diferentes espectros de filos bacterianos [203], dado que la especificidad de los cebadores no es universal [204].

Como se ha comentado con anterioridad, el gen 16S rRNA constituye la diana de las técnicas de secuenciación masiva mediante secuenciación de amplicones. Se utilizan diferentes plataformas comerciales para llevar esto a cabo, siendo capaces de generar gran cantidad de secuencias por muestra, lo que permite describir la diversidad taxonómica de la microbiota humana [205]. Algunas de estas plataformas, revolucionarias en su momento, han quedado ya obsoletas víctimas de los avances tecnológicos, como son GS20 (454 LifeSciences/Roche), Genome Analyzer (Solexa), o SOLiD (Applied Biosystems) [205]. En la actualidad, las plataformas de secuenciación de miSeq/HiSeq (Illumina) constituyen la tecnología líder en el mercado, ya que generan más del 90% de los datos de secuenciación a nivel mundial [206]. Más recientemente, tecnologías de secuenciación de tercera generación como *Oxford Nanopore Technologies* (MinION-Nanopore) se postulan como potentes herramientas de futuro [207]. La descripción detallada de la metodología utilizada por cada una de estas plataformas excede, sin embargo, los objetivos de la introducción de esta tesis.

Una vez estas plataformas han generado los datos de secuenciación del gen 16SrRNA se deben procesar mediante análisis bioinformático. Existen una serie de *pipelines* (programa o secuencia de comandos) bioinformáticos que se utilizan para analizar los datos de secuenciación de amplicones. Algunos de los más utilizados son QIIME-UCLUST [208], MOTHUR [209], USERACH-UPARSE [210], DADA2 [211], QIIME2-Deblur [212] o USEARCH-UNOISE3 [213]. En general estos *softwares* constan de una serie de pasos comunes que describiremos brevemente a continuación:

1. Preprocesamiento de las secuencias: Etapa destinada a depurar las lecturas crudas para obtener secuencias de buena calidad [214]. En este punto es importante tener en cuenta la posibilidad de la contaminación de las muestras con ADN bacteriano exógeno. Este problema es especialmente importante en muestras de baja biomasa, como son las muestras respiratorias, en tanto que la contaminación puede dominar la señal biológica y generarse resultados sesgados que pueden confundir las conclusiones de un estudio [215]. Existen diferentes métodos para mitigar el impacto de la contamina-

ción, entre ellos la introducción de controles negativos [216], eliminando en el análisis bioinformático aquellos taxones que sean más abundantes en los controles negativos, así como aquellos que previamente se han descrito como contaminantes (plataforma DecontaM) [217]. Por lo tanto, es importante reportar en los trabajos de microbiota los taxones hallados en controles negativos de cara a una interpretación crítica de los resultados.

2. Obtención de la tabla de abundancia de taxones: Una vez tenemos las secuencias depuradas éstas se agrupan en unidades taxonómicas operativas (OTUs, del inglés *Operational Taxonomic Units*). Las OTUs son grupos de secuencias con elevada similitud [218], consiguiendo una resolución taxonómica prácticamente a nivel de especie bacteriana [218].

Recientemente se han desarrollado métodos que permiten mejorar la resolución taxonómica, en tanto que provocan una reducción del ruido de secuenciación (algoritmos *denoising*) [219]. Estos métodos identifican las variantes de secuencia de amplicones verdaderas (ASVs, del inglés *Amplicon Sequence Variants*), que agrupan secuencias únicas e idénticas para los análisis de diversidad de los que hablaremos más adelante, con variaciones incluso a nivel de un solo nucleótido, a diferencia de las OTUs [220].

A la hora de escoger entre OTUs vs ASVs existen una serie de ventajas e inconvenientes asociados a cada tipo de análisis. Las ASVs, por un lado, parecen tener mayor resolución taxonómica, ya que agrupan secuencias exactas que se corresponden con una única bacteria, mientras que las OTUs agrupan secuencias similares que podrían incluir diferentes grupos taxonómicos [218]. No sólo eso, sino que las ASVs también podrían mejorar la reproducibilidad y comparabilidad entre estudios que utilizan el mismo marcador [221]. Como inconveniente, las ASVs tienden a sobreestimar la diversidad [222].

Independientemente del uso de uno u otro método, el último paso de esta etapa es generar una tabla de abundancia donde constan el número de secuencias detectadas de cada taxón (OTU/ASV) por muestra, para generar así un perfil de microbiota para cada muestra.

3. Anotación taxonómica y base de datos: Las secuencias consenso se comparan en esta fase contra una base de datos de referencia y son anotadas en función de la secuencia más cercana identificada en la base de referencia. La elección de la base de datos tiene un gran impacto en los resultados en función de la amplitud y diversidad de secuencias anotadas disponibles [223]. Algunas de las más utilizadas son Greengenes [224], SILVA [225] y RDP [226].

Finalmente, hablaremos brevemente sobre los análisis de diversidad y abundancia diferencial. Estos análisis son importantes desde un punto de vista clínico, en tanto que cambios en la composición bacteriana del nicho respiratorio respecto al individuo sano se han asociado con el desarrollo, gravedad y pronóstico de diferentes enfermedades [227]. Existen tres tipos de análisis de diversidad: alfa, beta y gamma [228], aunque nos centraremos en las dos primeras dado que son actualmente los pilares para caracterizar la diversidad de la microbiota bacteriana intra e inter-muestras.

1. Análisis de diversidad alfa: describen la estructura ecológica de una comunidad en función de su riqueza (número de grupos taxonómicos diferentes) y homogeneidad (distribución de dichos grupos) [228]. Para estimar esto existen diferentes índices: índice Chao1 [229], que mide la riqueza, y los índices de Shannon [230] y Simpson [231], que miden riqueza y homogeneidad.

2. Análisis de diversidad beta: calculan las diferencias en la composición bacteriana entre muestras a través del uso de matrices de disimilitud o distancia, como por ejemplo el índice de Jaccard [232], que tiene en cuenta la presencia o ausencia de taxones; la disimilitud de Bray-Curtis [233], que considera además la abundancia de taxones; o Weighted Unifrac [234] que calcula las distancias usando información de la presencia/ausencia de taxones, su abundancia y las relaciones filogenéticas entre ellos. Con el objetivo de evaluar si existen diferencias en la composición bacteriana entre grupos de muestras se aplican análisis multivariados como PERMANOVA [235], ANOSIM [236] o test de Mantel [237]. Además, pueden usarse métodos para identificar bacterias específicas con abundancia significativamente diferente entre dos grupos de muestras, co-

mo ANCOM-BC [238], entre otras. La descripción detallada de la metodología utilizada por cada uno de estos tests excede los objetivos de la presente introducción.

2. HIPÓTESIS

Como se ha comentado a lo largo de la Introducción, las manifestaciones clínicas producidas por los RV/EV son múltiples y heterogéneas, pudiendo causar desde infecciones asintomáticas hasta infecciones graves con compromiso vital. Se han descrito los múltiples factores moduladores de la gravedad de esta infección que han sido reconocidos en la literatura, sin que ninguno de ellos sea suficiente per se para explicar la variabilidad clínica de estos microorganismos.

De todos los factores comentados, existe escasa información en la literatura acerca del papel de la microbiota nasofaríngea viral y bacteriana en la modulación de la gravedad de la infección por RV/EV. Por ello, los estudios incluidos en esta tesis pretenden responder a estas cuestiones, utilizando técnicas moleculares específicas para el diagnóstico y caracterización de las comunidades virales, así como técnicas de secuenciación masiva basadas en la secuenciación del gen 16SrRNA para el estudio de la microbiota nasofaríngea bacteriana.

Por todo ello, las hipótesis de trabajo son las siguientes:

- La co-infección viral puede ser un factor modificador de la gravedad de la ITRI por RV/EV en niños menores de 5 años.
- Los niños menores de 5 años con ITRI grave por RV/EV presentan una microbiota bacteriana nasofaríngea distinta a la de niños con infección respiratoria banal y niños sanos.
- Determinadas composiciones de microbiota bacteriana nasofaríngea se asocian con salud respiratoria y podrían tener un papel potencial para la protección frente a las infecciones por RV/EV.
- La composición de la microbiota nasofaríngea bacteriana en el escenario de la infección por RV/EV varía de acuerdo con la gravedad de los síntomas, de tal forma que los niños con infección respiratoria banal tienen un perfil de microbiota más parecido al de niños sanos que al de los niños con ITRI grave.

3. OBJETIVOS

Esta tesis profundiza en el conocimiento sobre la infección por Rino/Enterovirus (RV/EV) en población pediátrica, con especial atención al papel modulador de la gravedad de la enfermedad por estos microorganismos que pueden tener la microbiota nasofaríngea viral y bacteriana.

Con todo ello, se marcaron concretamente los siguientes objetivos:

Objetivo 1. Describir el impacto clínico de la co-infección viral en pacientes con Infección del Tracto Respiratorio inferior (ITRI) grave por Rino/Enterovirus (RV/EV) que precisan ingreso en una UCIP.

Objetivo 2. Describir y comparar la microbiota bacteriana nasofaríngea de niños con Infección del Tracto Respiratorio inferior (ITRI) grave por Rino/Enterovirus (RV/EV), niños con infección respiratoria banal por estos microorganismos y niños sanos.

Objetivo 2.1. Identificar perfiles de microbiota bacteriana nasofaríngea relacionados con salud respiratoria.

Objetivo 2.2. Evaluar la relación de la microbiota bacteriana nasofaríngea con la gravedad de la infección respiratoria, comparando los resultados de tres cohortes con distintos estados de salud respiratoria: niños menores de 5 años con Infección del Tracto Respiratorio inferior (ITRI) por Rino/Enterovirus (RV/EV) grave, niños con infección respiratoria banal por estos microorganismos, y niños sanos sin detección viral.

4. MATERIAL, MÉTODOS Y RESULTADOS

Los resultados de los estudios realizados se han publicado en dos artículos que se presentan a continuación. El doctorando es primer autor en ambos trabajos. Estos artículos se han publicado en revistas situadas en el primer cuartil de factor de impacto de sus áreas de conocimiento.

Primer artículo

Penela-Sánchez D, González-de-Audicana J, Armero G, Henares D, Esteva C, de-Sevilla MF, Ricart S, Jordan I, Brotons P, Cabrerizo M, Muñoz-Almagro C, Launes C. Lower Respiratory Tract Infection and Genus Enterovirus in Children Requiring Intensive Care: Clinical Manifestations and Impact of Viral Co-Infections. *Viruses*. 2021 Oct 14;13(10):2059. doi: 10.3390/v13102059.

SJR Scimago Journal Rank ® 2021. Área de conocimiento: Enfermedades infecciosas.

Cuartil: Q1. SJR impact factor 1.463.

Journal Citation Report (JCR) 2021. Área de conocimiento: Virología. Cuartil: Q2 (Virology, 14 de 37). Impact factor: 5.818.

Segundo artículo

Penela-Sánchez D, Rocafort M, Henares D, Jordan I, Brotons P, Cabrerizo M, Launes C, Muñoz-Almagro C. Impact of the bacterial nasopharyngeal microbiota on the severity of genus enterovirus lower respiratory tract infection in children: A case-control study. *Pediatr Pulmonol*. 2023 Mar;1-10. doi: 10.1002/ppul.26393.

SJR Scimago Journal Rank ® 2021. Área de conocimiento: Pediatría, Perinatología y

Salud Infantil. Cuartil: Q1. SJR 0.927.

Journal Citation Report (JCR) 2021. Área de conocimiento: Pediatría, Perinatología y Salud Infantil. Cuartil: Q1 (Pediatrics, 21 de 130). Impact factor: 4.090.

PRIMER ARTÍCULO

Lower Respiratory Tract Infection and Genus Enterovirus in Children Requiring Intensive Care: Clinical Manifestations and Impact of Viral Co-Infections

"Infección del tracto respiratorio inferior y Género Enterovirus en niños que requieren cuidados intensivos: manifestaciones clínicas e impacto de las co-infecciones virales"

Viruses. 2021 Oct 14;13(10):2059. doi: 10.3390/v13102059.

Penela-Sánchez D, González-de-Audicana J, Armero G, Henares D, Esteva C, de-Sevilla MF, Ricart S, Jordan I, Brotons P, Cabrerizo M, Muñoz-Almagro C, Launes C.

Resumen Primer Artículo

Estudio observacional prospectivo en el que se incluyeron los niños menores de 5 años diagnosticados de ITRI por RV/EV que precisaron ingreso en la UCIP del Hospital Sant Joan de Déu, con consentimiento para participar en el estudio, entre enero de 2018 y marzo de 2020.

El diagnóstico de infección por RV/EV se definió por la presencia de una ITRI (bronquiolitis, broncoespasmo, neumonía) juntamente con la detección de RV/EV mediante un panel de PCR múltiple en aspirado nasofaríngeo. Este panel era capaz además de detectar 6 virus respiratorios más. Así mismo, se realizó una PCR específica para diferenciar entre las especies de RV/EV. Se recogieron una serie de variables clínicas, epidemiológicas y microbiológicas. Los pacientes con comorbilidades (prematuridad, cardiopatía congénita, enfermedad pulmonar crónica) fueron excluidos. Las variables resultado, obtenidas a partir de un análisis multivariable mediante regresión logística, fueron la necesidad de ventilación mecánica invasiva, y la estancia en UCIP superior a la media de la muestra (5 días).

Los principales resultados de este estudio se resumen a continuación:

1. Durante el período de estudio fueron ingresados en la UCIP del centro 143 pacientes menores de 5 años con diagnóstico de ITRI grave por RV/EV, de los cuales 68 presentaron comorbilidades y en 4 de ellos no se obtuvo el consentimiento informado. Por lo tanto, finalmente se incluyeron 71 pacientes, con una edad mediana de 2,1 meses (rango intercuartílico (RIC) 1,2-9,3), y siendo el 56% varones.
2. Los pacientes incluidos se distribuyeron en 3 subgrupos: monoinfección por RV/EV (31/71, 44%), coinfección de RV/EV + VRS (22/71, 31%), y coinfección de RV/EV con múltiples virus (18/71, 25%; en 8/18, 45%, se detectó también VRS). Las 3 cohortes de pacientes no presentaron diferencias estadísticamente significativas en cuanto a las diferentes variables clínicas, epidemiológicas y microbiológicas recogidas en el estudio. Sin embargo, cabe destacar que los pacien-

tes con monoinfección por RV/EV y los pacientes con coinfección por RV/EV + VRS fueron más pequeños que los pacientes con coinfecciones múltiples ($p=0,018$). No falleció ningún paciente.

3. En cuanto a las especies de RV/EV, se pudieron determinar en 60/71 (85%) muestras. La mayoría (58/60, 96.6%) fueron RV, con tan solo dos EV-B detectados. De los RV, 28/58 (48%) fueron RV-A, 7/58 (12%) RV-B, y 23/58 (40%) RV-C. No se detectó ningún EV-A, EV-C o EV-D. Todos los RV-B se detectaron en coinfección con VRS. No se observaron otras diferencias clínicas ni epidemiológicas entre las diferentes especies.
4. En el estudio descriptivo se observó que precisaron VMI 17/71 pacientes (24%) (9 de ellos pertenecientes al grupo de monoinfección por RV/EV, y 8 al grupo de coinfección por VRS); sin embargo, ninguno de ellos perteneció al grupo de RV/EV + coinfecciones múltiples. Los pacientes con coinfección por VRS precisaron este soporte respiratorio durante más días (8 días de mediana (RIC 3-11), vs 4 días (RIC 2-7) en los monoinfectados por RV/EV, $p=0,002$) y presentaron estancias en UCIP más largas que los otros subgrupos (8 días de mediana (RIC 4-12), vs 6 días (RIC 3-9) y 3 días (RIC 2-5) respectivamente, $p=0,004$).
5. Para diferenciar si estos resultados estaban sesgados por la presencia de VRS más que por el posible papel en coinfección con RV/EV, se realizó un subanálisis en función de la presencia o no de VRS (41/71, 58%, pacientes sin detección de VRS vs 30/71, 42%, pacientes con detección de VRS), sin encontrarse diferencias estadísticamente significativas en las variables resultados entre los dos subgrupos. De hecho, cuando VRS era detectado en conjunto con otras coinfecciones virales múltiples (8/18, 45%), estos pacientes presentaron una estancia en UCIP menor (8 días de mediana (RIC 5-12) vs 3 días (RIC 2-4), $p<0,001$), en comparación a cuando este microorganismo se encontraba en co-infección aislada con RV/EV, y no precisaron VMI (0/8 vs 8/22, $p=0,046$).
6. Respecto a las variables resultados, en el análisis univariable se observó que los pacientes con coinfección por múltiples virus presentaron una estancia en UCIP (>5 días) menor que los otros subgrupos ($p=0,003$), y ninguno de ellos precisó soporte con VMI. En el análisis multivariable se objetivó que este subgrupo

presentaba mayor probabilidad de estancia menor en UCIP (OR ajustada =0,19 (IC 95% 0,05-0,78)).

Article

Lower Respiratory Tract Infection and Genus Enterovirus in Children Requiring Intensive Care: Clinical Manifestations and Impact of Viral Co-Infections

Daniel Penela-Sánchez ^{1,2} , Jon González-de-Audicana ³, Georgina Armero ^{1,2}, Desiree Henares ^{4,5,6}, Cristina Esteva ^{4,5}, Mariona-Fernández de-Sevilla ^{1,4,6,7}, Silvia Ricart ^{1,7}, Iolanda Jordan ^{2,4,6,7}, Pedro Brotons ^{4,6,8}, María Cabrerizo ^{3,6} , Carmen Muñoz-Almagro ^{4,5,6,8}  and Cristian Launes ^{1,4,6,7,*} 

- ¹ Paediatrics Department, Hospital Sant Joan de Déu, 08195 Barcelona, Spain; daniel.penela@sjd.es (D.P.-S.); georgina.armero@sjd.es (G.A.); mariona.fernandez@sjd.es (M.-F.d.-S.); silvia.ricart@sjd.es (S.R.)
- ² Paediatrics Intensive Care Unit, Hospital Sant Joan de Déu, 08195 Barcelona, Spain; yolanda.jordan@sjd.es
- ³ Enterovirus and Viral Gastroenteritis Unit, Centro Nacional de Microbiología, Instituto Carlos III, 28222 Madrid, Spain; jonma_audicana@hotmail.com (J.G.-d.-A.); mcabrerizo@isciii.es (M.C.)
- ⁴ Grupo de Investigación en Enfermedades Infecciosas Pediátricas, Institut de Recerca Sant Joan de Déu, Hospital Sant Joan de Déu, 08195 Barcelona, Spain; desiree.henares@sjd.es (D.H.); cristina.esteva@sjd.es (C.E.); pedro.brotons@sjd.es (P.B.); carmen.munoz@sjd.es (C.M.-A.)
- ⁵ Molecular Microbiology Department, Hospital Sant Joan de Déu, 08195 Barcelona, Spain
- ⁶ Centro de Investigación Biomédica en Red de Epidemiología y Salud Pública (CIBERESP), Instituto de Salud Carlos III, 28029 Madrid, Spain
- ⁷ Paediatrics Department, Faculty of Medicine and Health Sciences, Universitat de Barcelona, 08007 Barcelona, Spain
- ⁸ Department of Medicine, School of Medicine, Universitat Internacional de Catalunya, 08017 Barcelona, Spain
- * Correspondence: cristian.launes@sjd.es; Tel.: +34-93-253-21-00



Citation: Penela-Sánchez, D.; González-de-Audicana, J.; Armero, G.; Henares, D.; Esteva, C.; de-Sevilla, M.-F.; Ricart, S.; Jordan, I.; Brotons, P.; Cabrerizo, M.; et al. Lower Respiratory Tract Infection and Genus Enterovirus in Children Requiring Intensive Care: Clinical Manifestations and Impact of Viral Co-Infections. *Viruses* **2021**, *13*, 2059. <https://doi.org/10.3390/v13102059>

Academic Editor: Kelvin Kai-Wang To

Received: 11 August 2021
Accepted: 8 October 2021
Published: 14 October 2021

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



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

Abstract: Infection by rhinovirus (RV) and enterovirus (EV) in children ranges from asymptomatic infection to severe lower respiratory tract infection (LRTI). This cohort study evaluates the clinical impact of RV/EV species, alone or in codetection with other viruses, in young children with severe LRTI. Seventy-one patients aged less than 5 years and admitted to the Paediatric Intensive Care Unit (PICU) of a reference children's hospital with RV or EV (RV/EV) LRTI were prospectively included from 1/2018 to 3/2020. A commercial PCR assay for multiple respiratory pathogens was performed in respiratory specimens. In 22/71, RV/EV + respiratory syncytial virus (RSV) was found, and 18/71 had RV/EV + multiple viral detections. Patients with single RV/EV detection required invasive mechanical ventilation (IMV) as frequently as those with RSV codetection, whereas none of those with multiple viral codetections required IMV. Species were determined in 60 samples, 58 being RV. No EV-A, EV-C, or EV-D68 were detected. RV-B and EV-B were only found in patients with other respiratory virus codetections. There were not any associations between RV/EV species and severity outcomes. To conclude, RV/EV detection alone was observed in young children with severe disease, while multiple viral codetections may result in reduced clinical severity. Differences in pathogenicity between RV and EV species could not be drawn.

Keywords: rhinovirus; enterovirus; co-infection; intensive care units; child; lower respiratory tract infection

1. Introduction

Rhinoviruses (RV) and enteroviruses (EV) are among the main causative aetiologies of lower respiratory tract infection (LRTI) in children [1]. They are RNA viruses belonging to the genus *Enterovirus* of the family *Picornaviridae*. More than 200 types of RV and EV that can infect humans are currently classified in three species of RV (RV-A, B, and C) and four of EV (EV-A to D). The clinical spectrum of RV/EV infection ranges from asymptomatic or

mild symptomatic presentation to severe disease requiring respiratory support in intensive care units [1].

On the other hand, viral multiple detections are commonly observed in paediatric patients with LRTI, but there is no consensus on the relationship between viral coinfections and disease severity [2]. Most of the published literature does not focus on specific viral infections, and the role of coinfections in disease severity may be different depending on the viral aetiology [3].

The aim of this study was to evaluate the clinical impact of viral coinfection in children admitted to a paediatric intensive care unit (PICU) with LRTI and RV or EV (RV/EV) detection. Enterovirus species were also reported and analysed.

2. Materials and Methods

2.1. Subjects

Data from children aged less than 5 years with LRTI and RV/EV infection, and requiring admission to a PICU of a reference tertiary paediatric hospital (University Hospital Sant Joan de Déu, Barcelona, Spain) were prospectively collected. This medical centre provides healthcare services to a paediatric population of $\approx 300,000$ and has a 24-bed PICU. The study period spanned from 1/2018 to 3/2020.

RV/EV disease was defined as the presence of LRTI (bronchiolitis, bronchospasm/viral wheezing, and/or pneumonia) [4] concurrent with RV/EV detection in nasopharyngeal aspirate (NPA). Suspected bacterial pneumonia was defined as the presence of fever, chest X-ray opacities, need for antibiotics, and analytical criteria (C-RP > 70 mg/L or PCT > 1 ng/mL). In our hospital, patients with respiratory failure are transferred to the PICU if they require any of the following treatments: invasive (IMV) or noninvasive (NIV) mechanical ventilation; high-flow oxygen therapy with FiO₂ greater than or equal to 0.6; or if they show haemodynamic instability.

Patients with comorbidities (prematurity, immunodeficiency, congenital heart disease, and chronic lung disease—except for recurrent wheezing) were excluded. Patients were divided into three groups: RV/EV detection, RV/EV + respiratory syncytial virus (RSV) codetection with no other viral detection, and RV/EV + multiple viral codetection. Outcome variables were the need for invasive mechanical ventilation (IMV) and PICU length-of-stay (P-LOS) above the median of the overall sample (5 days).

2.2. Specimen Collection and Microbiological Diagnosis

NPA samples were collected from all patients with LRTI according to the normalised protocol established at the study site within the first 24 h of PICU admission. For the nasopharyngeal aspirate, a disposable catheter connected to a vacuum source was inserted into one nostril until reaching the nasopharynx. The distance from the earlobe to the tip of the patient's nose was the length at which the catheter was inserted. Secretions were recovered into a sterile container applying suction while the catheter was drawn back. The procedure was repeated with the same catheter and container in the other nostril. Finally, three millilitres of physiological serum were suctioned and 200 μ L were processed using a PCR for multiple respiratory pathogens (FilmArray-RP, BioFire Diagnostics, Salt Lake City, UT, USA), and the remaining volume was stored at -80 °C. The FilmArray-RP is a fully automated commercial test with included nucleic acid extraction and amplification for qualitative detection of the following viruses: rhinovirus/enterovirus (RV/EV), respiratory syncytial virus (RSV), parainfluenza virus, influenza virus, metapneumovirus, coronavirus, and adenovirus [5]. Since the FilmArray detection assay does not distinguish between RV and EV, an RT-nested PCR in the 5'-NC region, followed by sequencing and BLAST analysis, were subsequently performed, which allowed differentiation of RV/EV species, according to a previously published protocol [6].

2.3. Statistical Analysis

Data comparisons of categorical variables were performed using Pearson chi-square test or Fisher exact test. Continuous non-normal distributed variables were compared using Mann–Whitney U-test and Kruskal–Wallis analysis. A p -value < 0.05 was considered statistically significant. Two multivariable analyses were performed using logistic regression models and including all the variables with a cut-off point of $p < 0.1$ and “PICU stay $> p50$ ” or the “need of IMV” as the output variables. Statistical analysis was performed with SPSS v22.0 software (IBM Corp, Armonk, NY, USA).

2.4. Ethical Considerations

The institutional ethics board approved the study and informed consent was obtained from parents and/or legal guardians (PIC 146-17).

3. Results

A total of 143 patients younger than 5 years were admitted to the PICU due to RV/EV LRTI. A proportion of 68/143 had pre-existing conditions, mainly neurologic disabilities (20%) and prematurity (7%). The informed consent could not be obtained from four.

Therefore, 71 patients were included. Median age was 2.1 months (IQR: 1.2–9.3) and 40/71 were males. A total of 129 viral detections were made in these 71 children. Monthly rates of specific viral detections over the total number of detections are shown in Figure 1. In total, 57.3% of incidence of RV/EV detections occurred during the period from November to February.

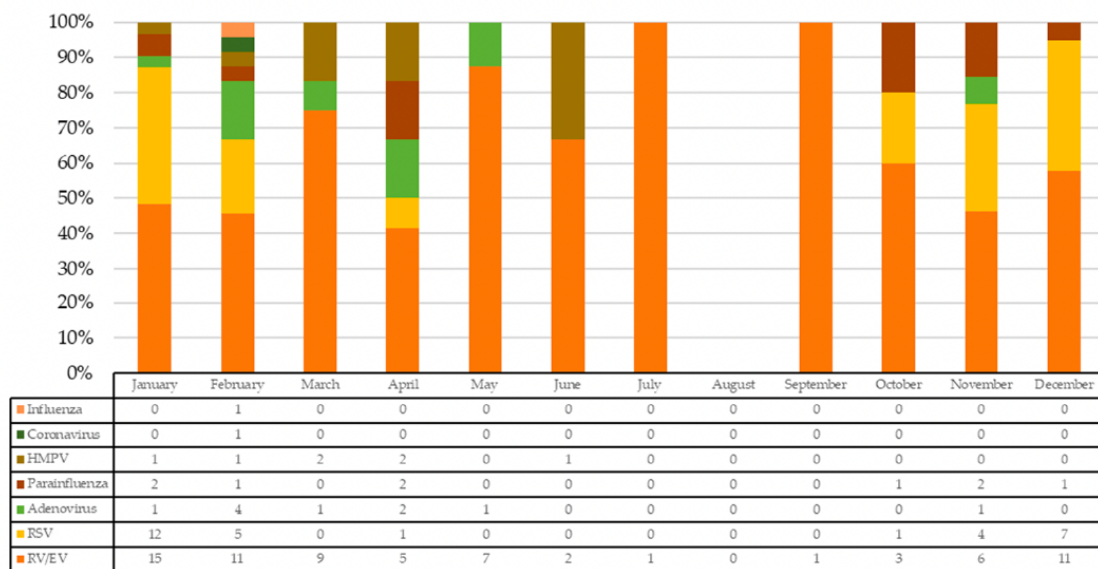


Figure 1. Number and rate of specific viral detections over the total number of detections. HMPV: human metapneumovirus; RSV: respiratory syncytial virus; RV/EV: rhinovirus/enterovirus.

RV/EV was the only virus detected in 31/71 (44%) patients. The most frequent virus codetected with RV/EV was RSV (30/71, 42%), followed by adenovirus (10/71, 14%), parainfluenza virus (9/71, 13%) and metapneumovirus (7/71, 10%). The three patient groups showed the following distribution of viruses: RV/EV alone (31/71, 44%), RV/EV + RSV detection with no other virus codetection (22/71, 31%), and RV/EV + multiple viral codetection (18/71, 25%). RSV was also detected in 8/18 (44%) patients with multiple viral codetections. No differences were found between these three cohorts in sex, race, breastfeeding status, or number of household contacts, but those patients with RV/EV detection and those with RV/EV + RSV codetection were younger than

children with multiple viral codetection ($p = 0.018$). Patients with multiple viral codetection reported episodes of wheezing more often than the rest of children. Regarding other clinical variables, 30/71 (42%) patients presented with fever at hospital admission. However, children with multiple viral codetection had fever more frequently (12/18, 67%) than the other groups ($p = 0.036$) and presented symptoms for a longer time before requiring PICU admission ($p = 0.003$) (see Table 1).

Table 1. Demographic, clinical, and microbiological characteristics of children with RV/EV detection, RV/EV + RSV codetection, and RV/EV + multiple viral codetection.

Variables	Total <i>n</i> = 71	RV/EV <i>n</i> = 31	RV/EV + RSV Codetection <i>n</i> = 22	RV/EV + Multiple Viral Codetection <i>n</i> = 18	<i>p</i> -Value *
Sex (male), <i>n</i> (%)	40 (56%)	17 (55%)	16 (73%)	7 (39%)	0.097
Age (months), median (IQR)	2.1 (1.2–9.3)	1.7 (0.7–8.1)	1.8 (1.0–2.7)	7.9 (2.2–22.7)	0.018
Race (Caucasian), <i>n</i> (%)	51 (78%)	20 (64%)	19 (86%)	12 (67%)	0.187
Breastfeeding, <i>n</i> (%)	57 (80%)	27 (87%)	17 (77%)	13 (72%)	0.412
Parental smoking, <i>n</i> (%)	23 (32%)	12 (39%)	7 (33%)	4 (21%)	0.492
Household contacts, <i>n</i> (%)	4 (4–4)	4 (4–4)	4 (3–5)	4 (4–4)	0.926
Recurrent wheezing, <i>n</i> (%)	28 (40%)	11 (37%)	4 (18%)	13 (72%)	0.002
Fever, <i>n</i> (%)	30 (42%)	9 (29%)	9 (41%)	12 (67%)	0.036
Days with symptoms before PICU admission, median (IQR)	3 (1–5)	2 (1–4)	3 (2–5)	5 (3–6)	0.003
Length of PICU stay (days), median (IQR)	5 (3–9)	6 (3–9)	8 (4–12)	3 (2–5)	0.004
Hospital stay (days), median (IQR)	11 (9–18)	12 (9–20)	13 (10–17)	9 (6–11)	0.028
Chest X-ray (total <i>n</i> = 60)					
Normal, <i>n</i> (%)	17 (28%)	8 (32%)	5 (29%)	4 (22%)	0.572
Chest X-ray opacities 1 quadrant, <i>n</i> (%)	18 (30%)	10 (40%)	4 (23%)	5 (28%)	
Chest X-ray opacities > 1 quadrant, <i>n</i> (%)	24 (40%)	7 (28%)	8 (47%)	9 (50%)	
NIVM, <i>n</i> (%)	67 (94%)	29 (93%)	21 (95%)	17 (94%)	0.957
IMV, <i>n</i> (%)	17 (24%)	9 (29%)	8 (36%)	0 (0%)	0.019
Days of MV, median (IQR)	4 (3–8)	4 (2–7)	8 (3–11)	3 (1–4)	0.002
Total white blood cell count (cells $\times 10^9$ /L), median (IQR)	11.6 (8.2–16.4)	11.8 (8.2–17.1)	9.4 (6.8–13.4)	12.9 (9.0–19.3)	0.265
Neutrophils (cells $\times 10^9$ /L), median (IQR)	5.2 (2.7–8.3)	5.2 (2.5–8.1)	4.4 (1.9–8.5)	5.4 (3.8–8.0)	0.516
C-RP (mg/L), median (IQR)	33.9 (13.2–66.9)	37 (6.9–73)	30 (15–52)	34 (18–71)	0.962
PCT (ng/mL), median (IQR)	0.33 (0.14–1.67)	0.40 (0.12–1.08)	0.22 (0.19–2.78)	0.54 (0.13–2.13)	0.770
Suspected bacterial pneumonia criteria, <i>n</i> (%)	14 (23%)	5(20%)	3 (18%)	6 (33%)	0.480
RV/EV species:					
-RV-A	28	12 (39%)	9 (41%)	7 (39%)	0.986
-RV-B	7	0 (0%)	7 (32%)	0 (0%)	<0.001
-RV-C	23	14 (45%)	3 (14%)	6 (33%)	0.054
-EV-B	2	0 (0%)	1 (4%)	1 (6%)	0.442
-Unknown	11	5 (16%)	2 (9%)	4 (22%)	0.517

C-RP: C-reactive protein; IMV: invasive mechanical ventilation; IQR: interquartile range; MV: mechanical ventilation; NIVM: non-invasive mechanical ventilation; NPA: nasopharyngeal aspirate; PCT: procalcitonin; PICU: Paediatric Intensive Care Unit; RSV: respiratory syncytial virus; RV/EV: rhinovirus/enterovirus. * Comparisons between categorical variables were performed using Pearson chi-square test. Fisher exact test was used if any expected count was < 5. Continuous variables were compared using Kruskal–Wallis analysis.

RV/EV species could be determined in 60/71 positive samples. Most of the viruses detected were RV (58/60, 96.6%), these being 28/58 (48%) RV-A, 7/58 (12%) RV-B, and 23/58 (40%) RV-C. RV-B species were only detected in the RV + RSV group ($p = 0.012$) (see Table 1). Only two EV-B were detected (one in RV/EV + RSV group and one in the multiple viral codetection group). No EV-A, EV-C, or EV-D were found. Figure 2 shows

the different viruses identified in each patient and Figure 3 the incidence of each RV/EV species per month.

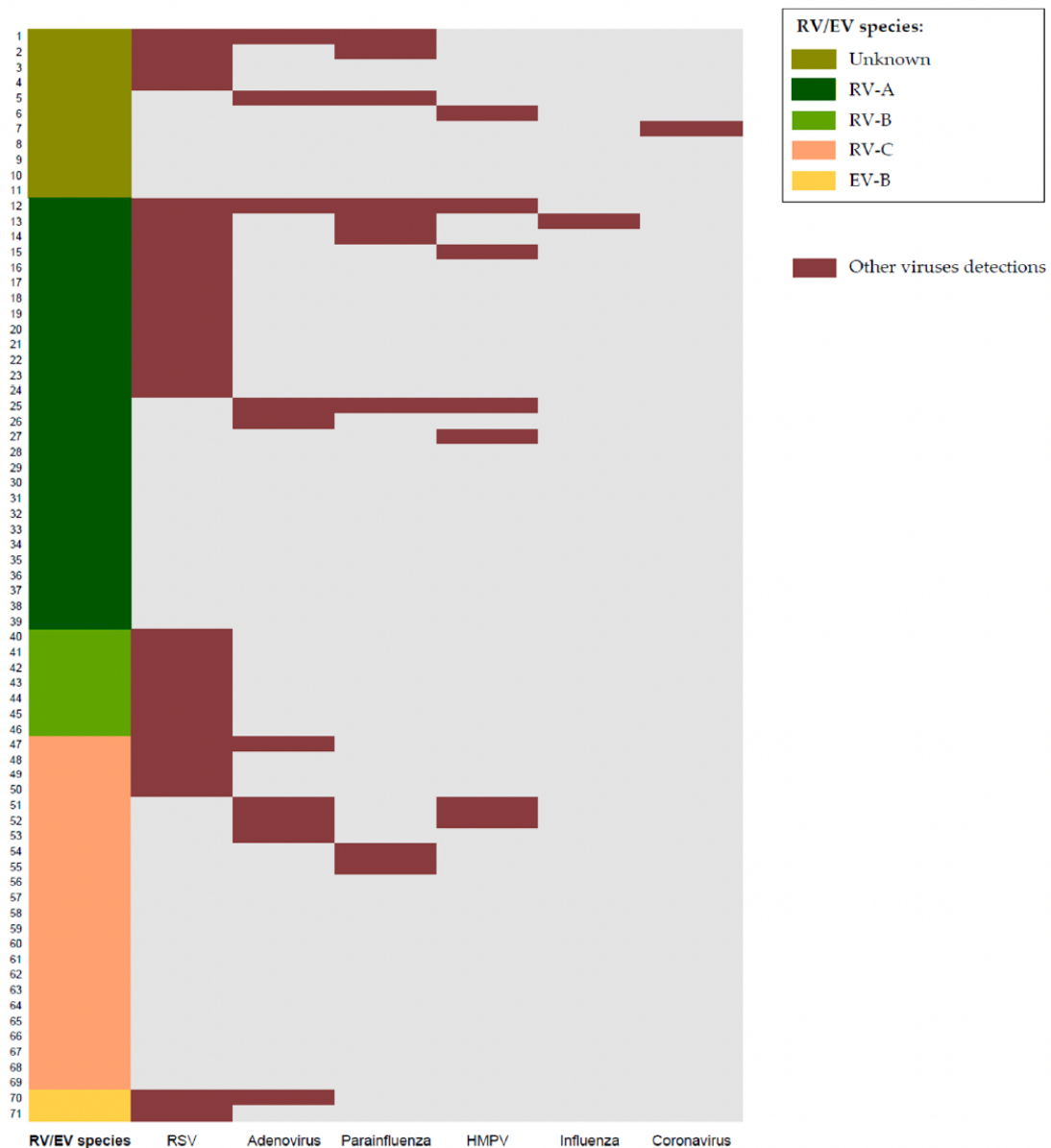


Figure 2. Viral detections and EV/RV species in each patient. MPV: human metapneumovirus; RSV: respiratory syncytial virus; RV/EV: rhinovirus/enterovirus.

A total of 17 out of 71 (24%) children needed IMV, but none of them had RV/EV + multiple viral codetections ($p = 0.019$). Children with RV/EV + RSV codetection underwent a longer duration of mechanical ventilation and had longer PICU and hospital stays than the other groups (see Table 1). A specific analysis based on whether RSV was detected or not is shown in Table 2. The eight patients with RSV and multiple viral codetections had a significantly shorter PICU stay (median 8 days (IQR: 5–12) vs. 3 (2–4), $p < 0.001$) and a significantly lower rate of them underwent IMV (0/8 vs. 8/22, $p = 0.046$) in comparison to those with RV/EV + RSV codetection. There were no deceased patients.

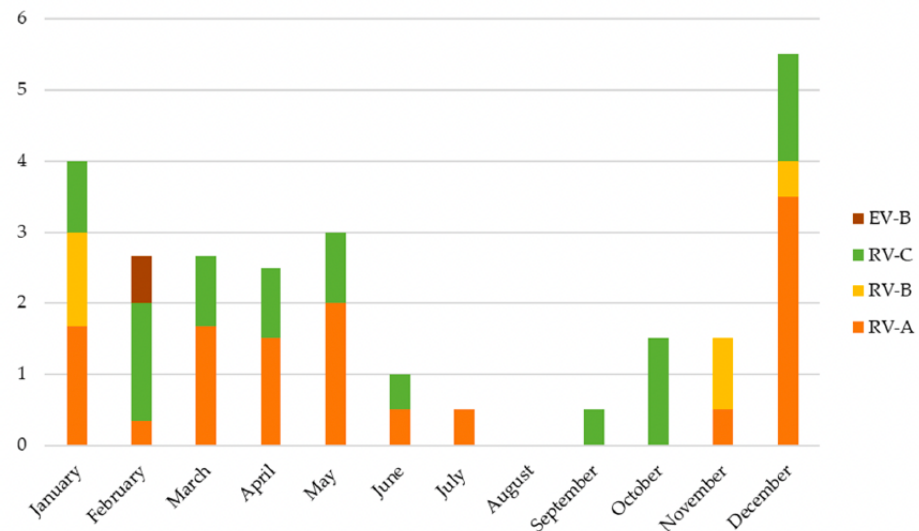


Figure 3. Number of detections of each EV/RV species per month.

Table 2. Main demographic and clinical characteristics of children with RV/EV infection, according to RSV detection.

Variables	RV+ RSV- (n = 41)	RV+ RSV+ (n = 30)	p-Value *	RV + RSV as the Sole Codetection (n = 22)	RV + RSV in Codetection with Other Viruses (n = 8)	p-Value *
Age (months), median (IQR)	2.9 (1.2–13.1)	1.6 (1.1–5.5)	0.625	1.9 (1.0–2.7)	8.7 (1.7–18.6)	0.090
Recurrent wheezing, n (%)	9 (22.5%)	6 (20%)	0.801	2 (9%)	4 (26%)	0.029
Fever, n (%)	16 (39%)	14 (47%)	0.520	9 (41%)	5 (62%)	0.417
Days with symptoms before PICU admission, median (IQR)	2 (1–4)	3 (2–5)	0.006	3 (2–5)	6 (4–11)	0.008
Length of PICU stay (days), median (IQR)	5 (2–8)	5 (3–9)	0.512	7.5 (4.7–12.0)	3 (2.2–3.7)	<0.001
Hospital stay (days), median (IQR)	11.5 (8–18)	11 (9–15)	0.863	13 (10.0–17.2)	9.5 (6.7–10.7)	0.060
IMV, n (%)	9 (22%)	8 (27%)	0.646	8 (36%)	0 (0%)	0.046
Days of MV, median (IQR)	4 (2–6)	5 (3–9)	0.267	8 (3–11)	3 (1–3)	0.002

* Comparisons between categorical variables were performed using Pearson chi-square test and Fisher exact test was used if any expected count was < 5. Continuous variables were compared using the Mann–Whitney U-test.

Regarding clinical severity, no differences were found in RV/EV species or other clinical/epidemiological variables, including age. A higher proportion of children with RV/EV detection + multiple viral codetections had a shorter P-LOS (15/18, $p = 0.003$) compared to the other groups (see Table 3). In the multivariable analysis, this specific group was more likely to have a shorter P-LOS (adjusted odds ratio (aOR) = 0.19 (95% CI: 0.05–0.78), $p = 0.021$). No patient with RV/EV + multiple viral codetections required IMV during the study period (0/18, $p = 0.004$), and further multivariable analysis was not considered as this was the only variable found to be associated with the outcome, with a p -value < 0.1.

Table 3. Outcome variables: PICU length of stay and need for invasive mechanical ventilation.

Variables	Univariate Analysis			Multivariable Analysis *		Univariate Analysis		
	PICU Stay > 5 d (n = 33)	PICU Stay ≤ 5 d (n = 38)	p-Value **	Adjusted Odds-Ratio	p-Value	IMV (n = 17)	NIMV (n = 54)	p-Value **
Sex (male), n (%)	20 (61%)	20 (53%)	0.499			10 (56%)	30 (56%)	0.813
Age (months), median (IQR)	2.2 (1.2–5.6)	2.1 (0.9–14.8)	0.836			1.8 (1.0–9.9)	2.1 (1.2–10.3)	0.652
Recurrent wheezing, n (%)	10 (30%)	18 (47%)	0.170			6 (35%)	22 (41%)	0.649
Race:								
Caucasian, n (%)	25 (76%)	26 (68%)	0.493			13 (76%)	38 (70%)	0.625
Others, n (%)	8 (24%)	8 (32%)				4 (24%)	16 (30%)	
Fever, n (%)	15 (45%)	15 (39%)	0.611			8 (47%)	22 (41%)	0.646
Chest X-ray at hospital admission (total n = 60)								
Normal, n (%)	4 (15%)	13 (38%)	0.110			1 (8%)	16 (33%)	0.183
Chest X-ray opacities 1 quadrant, n (%)	11 (42%)	8 (23%)				4 (33%)	15 (31%)	
Chest X-ray opacities > 1 quadrant, n (%)	11 (42%)	13 (38%)				7 (58%)	17 (35%)	
Viral detections:								
RV /EV, n (%)	16 (48%)	15 (39%)	0.445	-	-	9 (53%)	22 (41%)	0.376
RV /EV + RSV, n (%)	14 (42%)	8 (21%)	0.052	1.64 (0.54–5.02)	0.386	8 (47%)	14 (26%)	0.101
RV /EV + Multiple viral codetection, n (%)	3 (9%)	15 (40%)	0.003	0.19 (0.05–0.78)	0.021	0 (0%)	18 (33%)	0.004
RV /EV species								
RV A, n (%)	14 (42%)	14 (37%)	0.631			6 (35%)	22 (41%)	0.689
RV B, n (%)	4 (12%)	3 (8%)	0.697			1 (6%)	6 (11%)	0
RV C, n (%)	8 (24%)	15 (39%)	0.171			5 (29%)	18 (33%)	0.763
EV B, n (%)	1 (3%)	1 (3%)	1			1 (6%)	1 (2%)	0.424
Unknown, n (%)	6 (18%)	5 (13%)	0.560			4 (24%)	7 (13%)	0.441
Total white blood cell count (cells × 10 ⁹ /L), median (IQR)	10,500 (7425–15,825)	12,000 (8600–17,350)	0.296			9300 (6600–15,400)	11,750 (8925–17,000)	0.316
Neutrophils (cells × 10 ⁹ /L), median (IQR)	4490 (2675–8375)	5450 (3850–7850)	0.494			4500 (1800–9000)	5200 (3800–7700)	0.794
C-RP (mg/L), median (IQR)	38 (21–64)	30 (11–72)	0.302			32 (12–63)	35 (13–66)	0.946
PCT (ng/mL), median (IQR)	0.35 (0.19–1.49)	0.20 (0.08–2.08)	0.328			0.22 (0.18–2.78)	0.35 (0.12–1.34)	0.872

C-RP: C-reactive protein; IQR: interquartile range; NPA: nasopharyngeal aspirate; PCT: procalcitonin; PICU: Paediatric Intensive Care Unit. * Logistic regression model using the “enter” method. All the variables with a univariate *p*-value < 0.1 were introduced in the model. Hosmer–Lemeshow *p*-value = 1. ** Comparisons between categorical variables were performed using Pearson chi-square test and Fisher exact test was used if any expected count was < 5. Continuous variables were compared using the Mann–Whitney U-test.

4. Discussion

The role of viral coinfection in LRTI severity is controversial, with some studies reporting that viral coinfection is associated with an increased risk of PICU stay and a longer need for IMV [7], and others showing no differences in clinical outcomes on co-infected patients [8,9]. Most of the literature about viral respiratory coinfection is focused on the role of RSV infection. This report describes different clinical patterns depending on the viral codetections in the specific context of RV/EV detection in a PICU setting.

Most of the patients in whom multiple viruses were detected have had previous episodes of LRTI. Children with multiple LRTI have higher rates of codetection of pathogenic respiratory viruses with higher viral diversity and richness than children with single LRTI [10]. In this study, children with RV/EV + multiple viral codetections were reported to have a shorter PICU stay and lower need for IMV. Interestingly, patients with RV/EV + multiple viral codetections in whom RSV was also detected showed a different clinical pattern in comparison to those with the specific RV/EV + RSV codetection, having a significantly shorter PICU stay and lower need for IMV too. The immunological, metabolic,

and epigenetic processes that mediate trained immunity are still widely unknown [11], but this decreased severity could be reflective of a better trained immune system in older children with previous episodes of LRTI. Despite older age and having previous episodes of wheezing not protecting children from severe outcomes in this study, detection of these multiple other viruses could correspond to traces of degrading genomes from previous events. Yet the evidence that successive viral infections are milder in children with repeated episodes of LRTI is unclear [12]. Some authors reported that RSV could cause pneumonia more often when it was associated with other viruses [13,14]. In our review, the results of this study are not in contrast with those of previous studies observing a predominance of RSV and RV/EV coinfections, since we found that patients with RV/EV + RSV underwent a longer duration of mechanical ventilation and had longer PICU and hospital stays. There are some other theories to explain these differences in clinical severity. On one hand, they could be related to the fact that different patterns of viral infection (single infection vs. coinfection with a highly pathogenic virus or coinfection with multiple viruses) may lead to different changes in respiratory microbial communities and different grades of airway inflammation induced by bacterial pathogens or viral interactions [10]. Regarding RV, RV has been positively associated with *S. pneumoniae* and *H. influenzae* colonisation in healthy infants, and RSV with *H. influenzae* [15,16]. In a prospective longitudinal cohort study of the first year of life, RV was associated with higher bacterial density and lower diversity, but these changes occurred only during symptomatic RV infections [17]. Specific associations of RV with nasal microbiotas dominated by *Moraxella* species had been associated with greater epithelial damage and inflammatory cytokine expression in asthmatic children [18]. With regard to RSV, some studies suggest that changes induced by RSV in nasopharyngeal bacterial microbiome could cause a more severe LRTI, modulating the host immune response [19]. Most of these studies have been made using qualitative PCR-based detections and analysing upper respiratory tract microbiota. Nonetheless, the effect of the respiratory tract virome and its potential effect on microbial niches in health or disease is not well known, and further research is needed to determine associations with distinct microbiome communities and infections by these pathogens. On the other hand, synergic pathways in the innate immunity produced by RSV and RV infection, and an enhanced production of RV receptor (ICAM-1) have also been proposed [20,21].

Since RV/EV can be detected in asymptomatic children [22], the clinical significance of this detection may sometimes be unclear. Pathogen-positive children are increasingly symptomatic with decreasing age [23], and RV/EV was the unique detection in very young infants with severe LRTI in our series. A similar rate of patients who underwent IMV was observed among children with RV/EV without coinfections and those with RSV coinfection, the virulence of which is beyond doubt [24]. Moreover, some authors have described that infants with RSV and RV/EV coinfection had longer hospital stays in comparison to those with RSV as the unique viral infection [25]. In addition, recent data clearly show that viral aetiology of LRTI could be a factor that determines short- and long-term outcomes [26]. In this way, RV infection in young children is associated with atopic predisposition and high risk of asthma, while RSV infection seems not to be related with asthma or atopy development [27]. All these results reinforce the role of RV/EV in LRTI in a clinical scenario of a very young infant in whom this virus is found. RV viral load in the upper respiratory tract has been analysed as a potential biomarker to distinguish between symptomatic patients with respiratory viral infection and asymptomatic carriers of the virus, with heterogeneous results [28].

Regarding the RV and EV species that were identified in our study, almost all were RV. EV-D68 was not found in any patient, despite being detected in a previous series published by our group [29]. Proportions of RV species in children with LRTI were like those previously described elsewhere [30], with an RV-A and C predominance. RV species have different patterns of circulation. Infections occur all year round, but two peaks of infection are classically reported in northern hemisphere countries, the first between April and May, and the second between September and October [28,31]. RV-C could demonstrate

a different trend, with a peak of infection during winter months [32]. In our study, RV-C was detected almost the whole year, similarly to others' results [33]. On the other hand, EV-D68, an EV type most frequently associated to respiratory diseases, has been described to be more pathogenic than most RV species [34], in addition to causing acute flaccid paralysis. The fact that no EV-D68 species was detected could be due to the epidemiologic circulation pattern of this EV type, which alternates years of high incidence with years of low circulation [35]. EV-B was only found in two patients, but this species had been rarely observed in LRTI [29,30,36]. Furthermore, EV-B was detected in patients with other viral multiple coinfections, so its pathogenic implication is not clear, and may result in asymptomatic infection. This emphasises the need to improve diagnostic testing strategies for respiratory viruses to successfully distinguish between RV and EV, viruses that belong to the same genus but with different biological and clinical characteristics. Finally, evidence that members of RV-C species might be more virulent [36,37] continues to be controversial. No differences in outcome variables between RV species were found in this study, similarly to others' results showing similar rates of ICU admission, need for IMV, and length of hospital stay between RV species [38], and no associations between a given RV species and the type of infection (upper respiratory tract, LRTI, or protracted infection) [39].

The main limitations of this study are its observational design and the conduct of the study in a single setting, so its results and conclusions could have limited external generalisability. Second, the small sample size of the groups does not allow the establishment of firm conclusions about the absence of differences between them. Finally, although upper respiratory microbiological screening with qualitative PCR detection may not be conclusive, these specimens (NPA or nasal/throat swabs) are the most widely used in paediatric clinical settings [14]. Obtaining sputum or bronchoalveolar lavage is hardly applicable. Nonetheless, literature comparing viral detections in NPA and bronchoalveolar lavage shows a high correlation between them in immunocompetent children [40]. Quantitative microbiological detection is uncommonly reported in clinical daily practice due to severe limitations in interpreting the results [41].

To conclude, the presence of RV/EV with other respiratory virus codetection appears not to be decisive to cause severe LRTI in young children. RV/EV monoinfection and RSV coinfection had similar rates of infants undergoing IMV, whereas multiple viral coinfection was associated with less clinical severity. Differences in pathogenicity between RV and EV species could not be drawn from this study, despite the fact that RV-B and EV-B were only found to be associated with other respiratory viral infections.

Author Contributions: Conceptualisation, C.L., C.M.-A., I.J. and D.P.-S.; methodology, C.L., C.M.-A., D.P.-S., P.B., M.C., J.G.-d.-A., D.H., C.E., G.A., M.-F.d.-S. and S.R.; formal analysis, D.P.-S., C.L. and P.B.; investigation, D.P.-S., C.L., D.H., C.M.-A., I.J., M.C. and J.G.-d.-A.; writing—original draft preparation, D.P.-S., C.L., C.M.-A., P.B., I.J. and M.C.; writing—review and editing, D.P.-S., C.L., C.M.-A., P.B., I.J. and M.C. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This project is supported by the Spanish National Health Institute Carlos III (Grant id. PI17/349). DH received a grant for predoctoral training in research into Health by the Spanish National Health Institute Carlos III (project number: FI17/00248). DH also received a grant from Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC) for a research stay. The funders have not influenced the design or analysis, nor have they had any role in preparing the manuscript.

Institutional Review Board Statement: The study was conducted according to the guidelines of the Declaration of Helsinki, and approved by the Institutional Review Board of Fundació Sant Joan de Déu (protocol code PIC 146-17 on 23/11/17).

Informed Consent Statement: Informed consent to participate and for publication was obtained from parents and/or legal guardians.

Data Availability Statement: The datasets generated and/or analysed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

Acknowledgments: Thanks to all the clinical, laboratory, and diagnostic imaging personnel who take care of all these patients. We are also very thankful to Violeta Vallejo for reviewing the final version of this manuscript.

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

References

1. Lauinger, I.L.; Bible, J.M.; Halligan, E.P.; Bangalore, H.; Tosas, O.; Aarons, E.J.; MacMahon, E.; Tong, C.Y. Patient characteristics and severity of human rhinovirus infections in children. *Clin. Virol.* **2013**, *58*, 216–220. [\[CrossRef\]](#)
2. Galanti, M.; Birger, R.; Ud-Dean, M.; Filip, I.; Morita, H.; Comito, D.; Anthony, S.; Freyer, G.A.; Ibrahim, S.; Lane, B.; et al. Longitudinal active sampling for respiratory viral infections across age groups. *Influenza Other Respir. Viruses* **2019**, *13*, 226–232. [\[CrossRef\]](#)
3. Meskill, S.D.; O'Bryant, S.C. Respiratory virus co-infection in acute respiratory infections in children. *Curr. Infect. Dis. Rep.* **2020**, *22*, 3. [\[CrossRef\]](#)
4. Douros, K.; Everard, M.L. Time to Say Goodbye to Bronchiolitis, Viral Wheeze, Reactive Airways Disease, Wheeze Bronchitis and All That. *Front. Pediatr.* **2020**, *8*, 218. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
5. Babady, N.E. The FilmArray[®] respiratory panel: An automated, broadly multiplexed molecular test for the rapid and accurate detection of respiratory pathogens. *Expert. Rev. Mol. Diagn.* **2013**, *13*, 779–788. [\[CrossRef\]](#)
6. Casas, I.; Pozo, F.; Trallero, G.; Echevarría, J.M.; Tenoria, A. Viral diagnosis of neurological infection by RT multiplex PCR: A search for enterovirus and herpesviruses in a prospective study. *J. Med. Virol.* **1999**, *57*, 145–151. [\[CrossRef\]](#)
7. Chauhan, J.C.; Slamon, N.B. The impact of multiple viral respiratory infections on outcomes for critically ill children. *Pediatr. Crit. Care Med.* **2017**, *18*, 333–338. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
8. Wishaupt, J.O.; van der Ploeg, T.; de Groot, R.; Versteegh, F.G.; Hartwig, N.G. Single and multiple viral respiratory infections in children: Disease and management cannot be related to a specific pathogen. *BMC Infect. Dis.* **2017**, *17*, 62. [\[CrossRef\]](#)
9. Scotta, M.C.; Chakr, V.C.; de Moura, A.; Becker, R.G.; de Souza, A.P.; Jones, M.H.; Pinto, L.A.; Sarria, E.E.; Pitrez, P.M.; Stein, R.T.; et al. Respiratory viral coinfection and disease severity in children: A systematic review and meta-analysis. *J. Clin. Virol.* **2016**, *80*, 45–56. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
10. Li, Y.; Fu, X.; Ma, J.; Zhang, J.; Hu, Y.; Dong, W.; Wan, Z.; Li, Q.; Kuang, Y.Q.; Lan, K.; et al. Altered respiratory virome and serum cytokine profile associated with recurrent respiratory tract infections in children. *Nat. Commun.* **2019**, *10*, 2288. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
11. Netea, M.G.; Domínguez-Andrés, J.; Barreiro, L.B.; Chavakis, T.; Divangahi, M.; Fuchs, E.; Joosten, L.; van der Meer, J.; Mhlanga, M.M.; Mulder, W.; et al. Defining trained immunity and its role in health and disease. *Nat. Rev. Immunol.* **2020**, *20*, 375–388. [\[CrossRef\]](#)
12. Boonyaratanakornkit, J.; Englund, J.A.; Magaret, A.S.; Bu, Y.; Tielsch, J.M.; Khatry, S.K.; Katz, J.; Kuypers, J.; Shrestha, L.; LeClerq, S.C.; et al. Primary and Repeated Respiratory Viral Infections Among Infants in Rural Nepal. *J. Pediatric Infect. Dis. Soc.* **2020**, *9*, 21–29. [\[CrossRef\]](#)
13. Asner, S.A.; Rose, W.; Petrich, A.; Richardson, S.; Tran, D.J. Is virus coinfection a predictor of severity in children with viral respiratory infections? *Clin. Microbiol. Infect.* **2015**, *21*, 264.e1–264.e6. [\[CrossRef\]](#)
14. Mansbach, J.M.; Piedra, P.A.; Teach, S.J.; Sullivan, A.F.; Forgey, T.; Clark, S.; Espinola, J.A.; Camargo, C.A., Jr. Prospective multicenter study of viral etiology and hospital length of stay in children with severe bronchiolitis. *Arch. Pediatr. Adolesc. Med.* **2012**, *166*, 700–706. [\[CrossRef\]](#)
15. Lee, K.H.; Gordon, A.; Foxman, B. The role of respiratory viruses in the etiology of bacterial pneumonia: An ecological perspective. *Evol. Med. Public Health* **2016**, *2016*, 95–109. [\[CrossRef\]](#)
16. van den Bergh, M.R.; Biesbroek, G.; Rossen, J.W.; de Steenhuisen Pijters, W.A.; Bosch, A.A.; van Gils, E.J.; Wang, X.; Boonacker, C.W.; Veenhoven, R.H.; Bruin, J.P.; et al. Associations between pathogens in the upper respiratory tract of young children: Interplay between viruses and bacteria. *PLoS ONE* **2012**, *7*, e47711. [\[CrossRef\]](#)
17. Korten, I.; Mika, M.; Klenja, S.; Kieninger, E.; Mack, I.; Barbani, M.T.; Gorgievski, M.; Frey, U.; Hilty, M.; Latzin, P. Interactions of respiratory viruses and the nasal microbiota during the first year of life in healthy infants. *mSphere* **2016**, *1*, e00312–e00316. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
18. McCauley, K.; Durack, J.; Valladares, R.; Fadrosch, D.W.; Lin, D.L.; Calatroni, A.; LeBeau, P.K.; Tran, H.T.; Fujimura, K.E.; LaMere, B.; et al. Distinct nasal airway bacterial microbiotas differentially relate to exacerbation in pediatric patients with asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.* **2019**, *144*, 1187–1197. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
19. de Steenhuisen Pijters, W.A.; Heinonen, S.; Hasrat, R.; Bunsow, E.; Smith, B.; Suarez-Arrabal, M.C.; Chaussabel, D.; Cohen, D.M.; Sanders, E.A.; Ramilo, O.; et al. Nasopharyngeal Microbiota, Host Transcriptome, and Disease Severity in Children with Respiratory Syncytial Virus Infection. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **2016**, *194*, 1104–1115. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
20. Bont, L.; Heijnen, C.J.; Kavelaars, A.; van Alderen, W.M.; Brus, F.; Draaisma, J.M.; Pekelharing-Berghuis, M.; van Diemen-Steenvoorde, R.A.; Kimpen, J.L. Local interferon-gamma levels during respiratory syncytial virus lower respiratory tract infection are associated with disease severity. *J. Infect. Dis.* **2001**, *184*, 355–358. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)

21. Papi, A.; Johnston, S.L. Rhinovirus infection induces expression of its own receptor intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) via increased NF-kappaB-mediated transcription. *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 9707–9720. [\[CrossRef\]](#)
22. Jartti, T.; Jartti, L.; Peltola, V.; Waris, M.; Ruuskanen, O. Identification of respiratory viruses in asymptomatic subjects: Asymptomatic respiratory viral infections. *Pediatr. Infect. Dis. J.* **2008**, *27*, 1103–1107. [\[CrossRef\]](#)
23. van der Zalm, M.M.; van Ewijk, B.E.; Wilbrink, B.; Uiterwaal, C.S.; Wolfs, T.F.W.; van der Ent, C.K. Respiratory pathogens in children with and without respiratory symptoms. *J. Pediatr.* **2009**, *154*, 396–400.e1. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
24. Ralston, S.L.; Lieberthal, A.S.; Meissner, H.C.; Alverson, B.K.; Baley, J.E.; Gadomski, A.M.; Johnson, D.W.; Light, M.J.; Maraqa, N.F.; Mendonca, E.A.; et al. Clinical practice guideline: The diagnosis, management, and prevention of bronchiolitis. *Pediatrics* **2014**, *134*, e1474–e1502. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
25. da Silva, E.R.; Pitrez, M.C.; Arruda, E.; Mattiello, R.; Sarria, E.E.; de Paula, F.E.; Proença-Modena, J.L.; Delcaro, L.S.; Cintra, O.; Jones, M.H.; et al. Severe lower respiratory tract infection in infants and toddlers from a non-affluent population: Viral etiology and co-detection as risk factors. *BMC Infect. Dis.* **2013**, *13*, 41. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
26. Jartti, T.; Gern, J.E. Role of viral infections in the development and exacerbation of asthma in children. *J. Allergy Clin. Immunol.* **2017**, *140*, 895–906. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
27. Lukkari, M.; Koistinen, A.; Turunen, R.; Lehtinen, P.; Vuorinen, T.; Jartti, T. Rhinovirus-induced first wheezing episode predicts atopic but not non atopic asthma at school age. *J. Allergy Clin. Immunol.* **2017**, *140*, 988–995. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
28. Sanchez-Codez, M.I.; Moyer, K.; Benavente-Fernández, I.; Leber, A.L.; Ramilo, O.; Mejias, A. Viral Loads and Disease Severity in Children with Rhinovirus-Associated Illnesses. *Viruses* **2021**, *13*, 295. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
29. Launes, C.; Armero, G.; Anton, A.; Hernandez, L.; Gimferrer, L.; Cisneros, C.; Jordan, I.; Muñoz-Almagro, C. Molecular epidemiology of severe respiratory disease by human rhinoviruses and enteroviruses at a tertiary paediatric hospital in Barcelona, Spain. *Clin. Microbiol. Infect.* **2015**, *21*, 799.e5–799.e7. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
30. Calvo, C.; Casas, I.; García-García, M.L.; Pozo, F.; Reyes, N.; Cruz, N.; García-Cuenllas, L.; Pérez-Breña, P. Role of rhinovirus C respiratory infections in sick and healthy children in Spain. *Pediatr. Infect. Dis. J.* **2010**, *29*, 717–720. [\[CrossRef\]](#)
31. Winther, B.; Hayden, F.G.; Hendley, J.O. Picornavirus infections in children diagnosed by RT-PCR during longitudinal surveillance with weekly sampling: Association with symptomatic illness and effect of season. *J. Med. Virol.* **2006**, *78*, 644–650. [\[CrossRef\]](#)
32. Linder, J.E.; Kraft, D.C.; Mohamed, Y.; Lu, Z.; Heil, L.; Tollefson, S.; Saville, B.R.; Wright, P.F.; Williams, J.V.; Miller, E.K. Human rhinovirus C: Age, season, and lower respiratory illness over the past 3 decades. *J. Allergy Clin. Immunol.* **2013**, *131*, 69–77. [\[CrossRef\]](#)
33. Hung, H.M.; Yang, S.L.; Chen, C.J.; Chiu, C.H.; Kuo, C.Y.; Huang, K.A.; Lin, T.Y.; Hsieh, Y.C.; Gong, Y.N.; Tsao, K.C.; et al. Molecular epidemiology and clinical features of rhinovirus infections among hospitalized patients in a medical center in Taiwan. *J. Microbiol. Immunol. Infect.* **2019**, *52*, 233–241. [\[CrossRef\]](#)
34. Caylan, E.; Weinblatt, E.; Welter, J.; Dozor, A.; Wang, G.; Nolan, S.M. Comparison of the Severity of Respiratory Disease in Children Testing Positive for Enterovirus D68 and Human Rhinovirus. *J. Pediatr.* **2018**, *197*, 147–153.e1. [\[CrossRef\]](#)
35. González-Sanz, R.; Taravillo, I.; Reina, J.; Navascués, A.; Moreno-Docon, A.; Aranzamendi, M.; Romero, M.P.; Del Cuerpo, M.; Pérez-González, C.; Pérez-Castro, S.; et al. Enterovirus D68-associated respiratory and neurological illness in Spain, 2014–2018. *Emerg. Microbes Infect.* **2019**, *8*, 1438–1444. [\[CrossRef\]](#)
36. Cox, D.W.; Khoo, S.K.; Zhang, G.; Lindsay, K.; Keil, A.D.; Knight, G.; Gern, J.E.; Laing, I.A.; Bizzintino, J.; Le Souëf, P.N. Rhinovirus is the most common virus and rhinovirus-C is the most common species in paediatric intensive care respiratory admissions. *Eur. Respir. J.* **2018**, *52*, 1800207. [\[CrossRef\]](#)
37. Erkkola, R.; Turunen, R.; Räisänen, K.; Waris, M.; Vuorinen, T.; Laine, M.; Tähtinen, P.; Gern, J.E.; Bochkov, Y.A.; Ruohola, A.; et al. Rhinovirus C is associated with severe wheezing and febrile respiratory illness in young children. *Pediatr. Infect. Dis. J.* **2020**, *39*, 283–286. [\[CrossRef\]](#)
38. Iwane, M.K.; Prill, M.M.; Lu, X.; Miller, E.K.; Edwards, K.M.; Hall, C.B.; Griffin, M.R.; Staat, M.A.; Anderson, L.J.; Williams, J.V.; et al. Human rhinovirus species associated with hospitalizations for acute respiratory illness in young US children. *J. Infect. Dis.* **2011**, *204*, 1702–1710. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
39. Tapparel, C.; Siegrist, F.; Petty, T.J.; Kaiser, L. Picornavirus and enterovirus diversity with associated human diseases. *Infect. Genet. Evol.* **2013**, *14*, 282–293. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
40. Koenig-Zores, C.; Stoll-Keller, F.; Ammouche, C.; Donato, L. Does the nasopharyngeal samples virological analysis reflect the lower respiratory tract infection in children population? A PCR multiplex study. *Rev. Fr. Allergol.* **2013**, *53*, 59–64. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
41. Feikin, D.R.; Fu, W.; Park, D.E.; Shi, Q.; Higdon, M.M.; Baggett, H.C.; Brooks, W.A.; Deloria Knoll, M.; Hammitt, L.L.; Howie, S.; et al. Is Higher Viral Load in the Upper Respiratory Tract Associated with Severe Pneumonia? Findings From the PERCH Study. *Clin. Infect. Dis.* **2017**, *64*, S337–S346. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)

SEGUNDO ARTÍCULO

Impact of the Bacterial Nasopharyngeal Microbiota on the Severity of Genus Enterovirus Lower Respiratory Tract Infection in Children: a case-control study

"Impacto de la microbiota nasofaríngea bacteriana en la gravedad de la infección respiratoria del tracto inferior por Enterovirus en niños: un estudio caso-control"

Pediatr Pulmonol. 2023 Mar 29. doi: 10.1002/ppul.26393

Penela-Sánchez D, Rocafort M, Henares D, Jordan I, Brotons P, Cabrerizo M, Launes C, Muñoz-Almagro C.

Resumen Segundo Artículo

Estudio caso-control realizado en el hospital Sant Joan de Déu de Barcelona entre los años 2017 y 2020. Se incluyeron niños menores de 5 años con consentimiento para participar en el estudio. Se definieron 3 grupos :

1. **Grupo A** (grupo **control**): niños sanos sin detección de virus respiratorios mediante PCR múltiple en el aspirado nasofaríngeo, reclutados en visitas de seguimiento en el centro del estudio.
2. **Grupo B** (grupo **control**): niños asintomáticos o con síntomas de infección respiratoria del tracto superior que no precisaron ingreso, visitados en el servicio de Urgencias del centro de estudio, con detección de RV/EV en el aspirado nasofaríngeo.
3. **Grupo C** (grupo **caso**): niños con infección respiratoria del tracto inferior (bronquiolitis, broncoespasmo y/o neumonía) que precisaron ingreso en la UCIP del centro del estudio, con detección de RV/EV en el aspirado nasofaríngeo.

Los casos y controles fueron pareados por rango de edad y sexo con los controles. Se excluyeron pacientes con comorbilidades (prematuridad, inmunodeficiencia, cardiopatía congénitas, enfermedad pulmonar crónica), así como los pacientes con exposición a antibióticos durante más de 24 horas previo a la recogida de muestras respiratorias. Se recogieron una serie de variables epidemiológicas y microbiológicas.

Las muestras de aspirado nasofaríngeo de cada uno de los participantes fueron procesadas para caracterización de la microbiota bacteriana nasofaríngea mediante técnicas de secuenciación masiva basadas en la tecnología del gen 16S rRNA.

Los principales resultados del estudio se resumen a continuación:

1. Se incluyeron un total de 104 pacientes: 17 (16%) del grupo A, 34 (33%) del grupo B y 53 (51%) del grupo C. El grupo C presentó mayor proporción de partos por cesárea ($p = 0,027$), mayor detección de VRS ($p < 0,001$), mayor porcentaje de sujetos reclutados durante la temporada invernal ($p = 0,043$), y menor

- porcentaje de sujetos con al menos 1 dosis de vacunas obligatorias ($p < 0.001$). Para el resto de las variables epidemiológicas, demográficas y microbiológicas no se encontraron diferencias estadísticamente significativas.
2. Los análisis de diversidad alfa mostraron que la microbiota nasofaríngea bacteriana de los sujetos incluidos en el grupo C era menos rica (Observed - $p = 0,009$ and Chao1 - $p = 0,009$) y diversa (Shannon - $p = 0,036$) que la que presentaban los sujetos incluidos en el grupo A. Así mismo, y aunque sin conseguir la significación estadística, los sujetos del grupo C también presentaron una microbiota nasofaríngea bacteriana menos rica (Observed - $p = 0,057$, Chao1 - $p = 0,088$) y diversa (Shannon - $p = 0,070$) que los del grupo B.
 3. Los análisis de diversidad beta mostraron diferencias en la composición de la microbiota nasofaríngea bacteriana en función de la gravedad de la infección por RV/EV (ANOVA $R^2=6,8\%$ / $p = 0,0009$), con un gradiente de abundancia del género *Haemophilus* incrementado desde el grupo A al grupo C.
 4. Los análisis de abundancia media diferencial (% +/- desviación estándar) mostraron que la microbiota nasofaríngea bacteriana del grupo A se caracterizaba por una dominancia del género *Moraxella* (35,0 +/- 34,8), seguido de *Streptococcus* (18,1 +/- 24,1), *Dolosigranulum* (17,6 +/- 28,7) y *Haemophilus* (15,3 +/- 28,2). El grupo B estaba dominado por *Haemophilus* (33,6 +/- 37,8), *Moraxella* (31,6 +/- 35,0) y *Streptococcus* (19,5 +/- 27,1), seguido de lejos por *Staphylococcus* (5,8 +/- 23,1) y otros. Finalmente, el grupo C mostró una dominancia aún mayor de *Haemophilus* (50,9 +/- 38,8), *Moraxella* (24,0 +/- 30,4) y *Streptococcus* (14,5 +/- 27,1).
 5. Se realizó un test de abundancia diferencial para comparar los perfiles de microbiota nasofaríngea bacteriana entre los 3 grupos, que mostró que el género *Dolosigranulum* fue más abundante en los sujetos del grupo A, mientras que el género *Haemophilus* fue el predominante en los sujetos del grupo C.
 6. Se identificaron correlaciones bacterianas negativas entre los géneros *Moraxella* y *Streptococcus* vs *Haemophilus*, y correlaciones bacterianas positivas entre los géneros *Corynebacterium* y *Dolosigranulum*, así como con otras bacterias de la cavidad oral.

7. Se realizó un análisis específico para identificar cambios en la riqueza, diversidad y composición de géneros de la microbiota nasofaríngea bacteriana relacionados con los posibles factores de confusión distribuidos de forma desigual entre los grupos de estudio (co-infección por VRS, tipo de parto, estacionalidad y haber recibido al menos 1 dosis de vacunas obligatorias). Los niños infectados por VRS no mostraron diferencias en la diversidad alfa ni en la composición de géneros bacterianos en comparación con los niños no infectados por VRS. No se observaron diferencias entre los niños que nacieron por cesárea y los que tuvieron un parto vaginal, ni entre los reclutados en temporada invernal y los incluidos de otras temporadas. Por otro lado, la vacunación obligatoria sí se asoció con mayor riqueza y diversidad bacteriana; sin embargo, no se observaron cambios significativos en la abundancia de los principales géneros bacterianos, incluido *Haemophilus*. Cabe mencionar, de todas formas, que las asociaciones entre microbiota nasofaríngea bacteriana y estas variables sólo se analizaron con el objetivo de identificar posibles sesgos por una diferente distribución de estas variables en los 3 grupos de pacientes; de esta forma, la ausencia de diferencias no son concluyentes, dado que la selección de cohortes no fue diseñada para responder a esta pregunta.

Impact of the bacterial nasopharyngeal microbiota on the severity of genus enterovirus lower respiratory tract infection in children: A case–control study

Daniel Penela-Sánchez MD^{1,2,3}  | Muntsa Rocafort PhD^{1,4} |
Desiree Henares PhD^{1,4} | Iolanda Jordan MD, PhD^{1,2,3,4} | Pedro Brotons PhD^{1,4,5} |
María Cabrerizo PhD^{4,6} | Cristian Launes MD, PhD^{1,3,4,7}  |
Carmen Muñoz-Almagro MD, PhD^{1,4,5,8}

¹Pediatric Infectious Diseases and Microbiome Research Group, Institut de Recerca Sant Joan de Deu, Barcelona, Spain

²Pediatrics Intensive Care Unit, Hospital Sant Joan de Deu, Barcelona, Spain

³Departament de Medicina i Especialitats Medicoquirúrgiques, Facultat de Medicina i Ciències de la Salut, Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain

⁴CIBER of Epidemiology and Public Health (CIBERESP), Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain

⁵Department of Medicine, School of Medicine, Universitat Internacional de Catalunya, Barcelona, Spain

⁶Enterovirus and Viral Gastroenteritis Unit, Centro Nacional de Microbiología, Instituto Carlos III, Madrid, Spain

⁷Pediatrics Department, Hospital Sant Joan de Deu, Barcelona, Spain

⁸RDI Microbiology Department, Hospital Sant Joan de Deu, Barcelona, Spain

Correspondence

Cristian Launes, MD, PhD, Pediatrics
Department, Hospital Sant Joan de Deu
Universitat de Barcelona, Passeig Sant Joan de
Déu 2, 08950, Esplugues de Llobregat,
Barcelona, Spain.
Email: cristian.launes@sjd.es and
claunes@ub.edu

Funding information

Instituto de Salud Carlos III; European Regional
Development Fund

Abstract

Introduction: Rhinoviruses (RV) and enteroviruses (EV) are among the main causative etiologies of lower respiratory tract infection (LRTI) in children. The clinical spectrum of RV/EV infection is wide, which could be explained by diverse environmental, pathogen-, and host-related factors. Little is known about the nasopharyngeal microbiota as a risk factor or disease modifier for RV/EV infection in pediatric patients. This study describes distinct nasopharyngeal microbiota profiles according to RV/EV LRTI status in children.

Methods: Cross-sectional case–control study, conducted at Hospital Sant de Déu (Barcelona, Spain) from 2017 to 2020. Three groups of children <5 years were included: healthy controls without viral detection (Group A), mild or asymptomatic controls with RV/EV infection (Group B), and cases with severe RV/EV infection admitted to the pediatric intensive care unit (PICU) (Group C). Nasopharyngeal

Abbreviations: ANCOM-BC, analysis of compositions of microbiomes with bias correction; ASV, amplicon sequence variants; DNA, deoxyribonucleic acid; EV, enterovirus; FDR, false discovery rate; IMV, invasive mechanical ventilation; LRTI, lower respiratory tract infection; NMDS, nonmetric multidimensional scaling; NPA, nasopharyngeal aspirate; PBS, phosphate-buffered saline; PCoA, principal coordinates analysis; PERMANOVA, permutational analysis of variance; PICU, pediatric intensive care unit; RDP, ribosomal data project; RNA, ribonucleic acid; RSV, respiratory syncytial virus; RV, rhinovirus.

Daniel Penela-Sánchez and Muntsa Rocafort equally contributed to this work and share first authorship

Cristian Launes and Carmen Muñoz-Almagro equally contributed to this work and share cosenior authorship

This is an open access article under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial License, which permits use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited and is not used for commercial purposes.

© 2023 The Authors. *Pediatric Pulmonology* published by Wiley Periodicals LLC.

samples were collected from participants for viral DNA/RNA detection by multiplex-polymerase chain reaction and bacterial microbiota characterization by 16S rRNA gene sequencing.

Results: A total of 104 subjects were recruited (A = 17, B = 34, C = 53). Children's nasopharyngeal microbiota composition varied according to their RV/EV infection status. Richness and diversity were decreased among children with severe infection. Nasopharyngeal microbiota profiles enriched in genus *Dolosigranulum* were related to respiratory health, while genus *Haemophilus* was specifically predominant in children with severe RV/EV LRTI. Children with mild or asymptomatic RV/EV infection showed an intermediate profile.

Conclusions: These results suggest a close relationship between the nasopharyngeal microbiota and different clinical presentations of RV/EV infection.

KEYWORDS

enterovirus, intensive care units, lower respiratory tract infection, microbiota, rhinovirus

1 | INTRODUCTION

Lower respiratory tract infection (LRTI) is one of the major causes of morbidity and mortality among children under 5 years old, representing the second cause of death worldwide in 2019.¹ Rhinoviruses (RV) and enteroviruses (EV) are among the main causative etiologies of LRTI in children,² even during the COVID-19 pandemic.³ They are RNA viruses belonging to the genus *Enterovirus* of the family *Picornaviridae*. More than 200 types of RV and EV known to infect humans are currently classified into three species of RV (RV-A to C) and four of EV (EV-A to D).

The clinical spectrum of RV/EV infection ranges from asymptomatic or mild symptomatic presentation to severe disease requiring respiratory support in pediatric intensive care units (PICU).² This variability could be explained by several factors. Viral coinfection has been suggested to influence the severity of RV/EV infection, although there is no consensus in the literature about its role as a factor of severity, and this could be different depending on the viral etiology.⁴ In this sense, a recent study from our group that focused on the role of viral coinfection in the specific scenario of RV/EV infection showed that virus codetection appears not to be decisive to cause severe LRTI in young children in a PICU setting.⁵

Regarding bacterial coinfection, studies have shown that RV/EV infection in children is associated with increased detection of potential pathogenic bacteria in the respiratory tract (*Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, and *Moraxella catarrhalis*), causing increased risk of LRTI and asthma symptoms.⁶ However, most of this research focused on bacterial-viral has been centered on single pathogenic organisms due to their microbiological culture-based nature.

Nowadays, increased recognition is being paid to the bacterial nasopharyngeal microbiota as an important factor that could

determine the severity of viral LRTI.⁷ As it could either prevent the host to viral infection through a barrier effect or, on the contrary, predispose to infection by facilitating viral invasion.⁸ Conversely, the viral infection could facilitate colonization and pathogen bacterial overgrowth in the respiratory tract, by modulating the immune responses and susceptibility to bacterial invasion.⁹ In this regard, it has been described that RV/EV infection in adult patients diagnosed with chronic obstructive pulmonary disease alters the nasopharyngeal microbiota and could precipitate bacterial infections.¹⁰ Although RV/EV has often been described as a colonizer in asymptomatic children by some authors,¹¹ there are very few studies elucidating if there are changes in nasopharyngeal microbiota associated with RV/EV infection severity in pediatric patients. Microbiota analysis could help to distinguish if RV/EV infection in those asymptomatic or mild symptomatic cases has implied some pathogenic changes with respect to healthy noninfected children.

The primary objective of this study was to characterize and compare the nasopharyngeal microbiota profiles in children with severe RV/EV LRTI, children with asymptomatic or mild RV/EV infection, and healthy children without viral detections.

Our underlying hypothesis was that there was a close relationship between the nasopharyngeal microbiota composition and different clinical presentations of RV/EV infection.

2 | MATERIALS AND METHODS

2.1 | Study design and population

This cross-sectional case-control study was conducted at Sant Joan de Deu Barcelona Children's Hospital (HSJD), a reference university medical center located in Barcelona, Spain. This medical center provides health care services to a pediatric population of ≈400,000

and has a 28-bed PICU. Cases were prospectively recruited from December 2017 to March 2020. Controls were enrolled from routine well-child check-ups and from the Emergency Department. Cases were frequency-paired by age range (<3, 3–11, >11–23, and >23 months) and gender with the controls.

Three groups of children less than 5-year-old were thus defined for the study: (I) A control group (Group A) of healthy children without viral detection; (II) a control group (Group B) of asymptomatic children or with mild symptomatic–upper respiratory tract infection (URTI) (respiratory symptoms with/without fever, but not requiring hospital admission) and microbiological RV/EV detection in the nasopharyngeal aspirate (NPA); (III) and a case group (Group C) of patients with LRTI (bronchiolitis, bronchospasm/viral wheezing, and/or pneumonia) admitted to the PICU with microbiological RV/EV detection in NPA. Admission criteria for the PICU were respiratory failure requiring invasive (IMV) or noninvasive mechanical ventilation (NIV); high flow oxygen therapy with FiO₂ greater than or equal 0.6; or hemodynamic instability.

Inclusion criteria for cases and controls were (I) meeting the case/control definition described above; (II) having signed informed consent by the parents or legal guardians; and (III) not presenting comorbidities (prematurity, immunodeficiency, congenital heart disease, and chronic lung disease). Exclusion criteria were (I) exposure to antibiotics for more than 24 h either just at the moment of sample collection or in the last month before hospital admission.

Relevant epidemiological and microbiological data were recorded from each participant.

2.2 | Laboratory and bioinformatic procedures

NPA samples were collected from all children according to the standard operating procedure established at the study site.⁵ Nasopharyngeal secretions were aspirated using a catheter connected to a vacuum source. The mucus collected within the catheter was then eluted by the aspiration of 1.0 mL sterile phosphate-buffered saline (PBS). The sample was aliquoted and conserved at –80°C until further microbial analyses. Microbiological data included respiratory viral species detection, determination of species of RV/EV for RV/EV-positive sample, and nasopharyngeal microbiota characterization.

Total DNA was extracted from NPAs by the automated system NucliSENSeasyMag (BioMérieux) following the manufacturer's instructions.

The presence of viral respiratory infections in NPAs was tested by Allplex™ Respiratory Panels Assays 1, 2, and 3 (Seegene Inc.) targeting 16 viruses (rhinovirus/enterovirus, adenovirus, bocavirus, coronavirus, metapneumovirus, respiratory syncytial virus (RSV) types A and B, Influenza virus types A and B, and Parainfluenza virus types 1, 2, 3 and 4).

Nasopharyngeal microbiota was characterized by 16S rRNA gene sequencing. Specifically, the V3–V4 hypervariable region were amplified and sequenced using Illumina MiSeq. 2 × 300 bp (Illumina) as previously described in the 16S Metagenomic Sequencing Library

Preparation protocol (https://support.illumina.com/documents/documentation/chemistry_documentation/16s/16-metagenomic-library-prep-guide-15044223-b.pdf). A total number of 15 negative controls were sequenced along with the samples included in the study for further contamination control.

Quality of sequencing data was assessed with the FASTQC toolkit. All further bioinformatic data analyses were conducted using R programming language. Amplicon sequence variants (ASVs) were binned and quantified using the DADA2 package¹² in R using the ribosomal data project set 16 taxonomic reference database.¹³ As part of the DADA2 pipeline, before paired-end read merging, forward and reserve reads were trimmed at positions 10/10 and 280/230 starting and ending positions, respectively, to improve read quality.

Decontam package¹⁴ was used to identify potential kit reagents and environmental contaminants in the 15 sequenced negative controls (13 extraction and 2 polymerase chain reaction controls) so they could be further removed from nasopharyngeal participant samples. Following the default Decontam prevalence approach, we only considered real contaminants those ASVs whose mean relative abundance among negative controls was higher than in nasopharyngeal samples. Additionally, reads that were not assigned to kingdom bacteria or were classified as such, but no further taxonomic resolution was reached were excluded. Finally, only nasopharyngeal samples with a minimum sequencing depth of 10,000 reads were considered.

Alpha diversity metrics (Observed and Chao1 for richness, and Shannon index for diversity) were calculated at the ASV level after rarefying samples at 10,000 reads using the Phyloseq package.¹⁵ Nonrarefied samples were used for further analyses at higher taxonomic ranks collapsing reads either at the genus or species level using the Phyloseq package.¹⁶ Beta diversity analyses included ordination analyses using nonmetric multidimensional scaling (NMDS) and Bray–Curtis ecological distance over nonfiltered bacterial genera abundance matrix. Differences in overall composition were tested with permutational analysis of variance using *adonis2* function from Vegan package¹⁶ in R. Before differential abundance testing, bacterial genera and/or species were filtered by having at least 0.5% relative abundance in five samples. Differential abundance of bacterial taxa between pairs of groups was tested using analysis of compositions of microbiomes with bias correction¹⁷ on raw reads matrix. The significant threshold for differential abundance was set to 0.05 and log₂ fold change value higher or equal to 2. Pairwise correlations between bacterial genera were tested using Spearman's correlation over the relative abundance matrix. *p* Values were adjusted using false discovery rate method and significance threshold was set to 0.05.

Categorical variables were assessed with the χ^2 or Fisher test if expected values were below 5. Continuous variables were described as median and interquartile range (IQR) values and were further analyzed using Kruskal–Wallis test. Statistical analysis was performed with SPSS v22.0 software (IBM Corp). A *p* < 0.05 was considered statistically significant.

2.3 | Ethical considerations

The institutional ethics board approved the study (id PIC 146-17) and informed consent was obtained before obtaining samples from parents and/or legal guardians. All information collected has been treated confidentially and in accordance with applicable laws on personal data.

3 | RESULTS

3.1 | Study population

A total number of 114 participants (57 cases and 57 controls) were initially recruited. Four cases and six controls were excluded because there was previous exposure to antibiotics. Therefore, the final study included 104 participants: 17 healthy controls (Group A), 34 mild/asymptomatic controls (Group B), and 53 PICU RV/EV cases (Group C). Main epidemiological, demographic, and microbiological variables were described in Table 1. For reference, there were 38 patients with chest-X-ray opacities in Group C, and in 9 of them antibiotics were started because bacterial superinfection was suspected (fever $> 38.5^{\circ}\text{C}$, chest-X-ray opacities and either C-reactive protein $> 60\text{ mg/L}$ or procalcitonin $> 1\text{ ng/mL}$) but none of them had a culture-confirmed invasive bacterial infection. Overall, Group C showed higher proportion of delivery by C-section ($p = 0.027$), higher RSV detection ($p < 0.001$), higher percentage of subject's recruitment during winter season ($p = 0.043$), and lower percentage of subjects with at least one dose of mandatory vaccinations ($p < 0.001$). Regarding the specific RV/EV species detected, no differences were found between groups.

3.2 | Nasopharyngeal microbiota and RV/EV infection

Alpha-diversity analysis revealed differences in terms of bacterial richness and diversity between groups. Group C showed significantly lower bacterial richness (Observed— $p = 0.009$ and Chao1— $p = 0.009$) and diversity (Shannon— $p = 0.036$) compared to Group A (Figure 1). Although not statistically significant, Group C also showed trends for lower richness (Observed— $p = 0.057$, Chao1— $p = 0.058$) and diversity (Shannon— $p = 0.070$) compared to Group B (Figure 1).

Beta-diversity analysis revealed differences in the nasopharyngeal microbiota composition of children according to their RV/EV infection status. An ordination analysis at the bacterial genus level revealed significant differences in overall composition between groups (ANOVA $R^2 = 6.8\%$, $p = 0.0009$) (Figure 2A, top) with a gradient from Groups A to C along the X-axis of the ordination plot (Figure 2A, bottom). A more detailed analysis on the taxa contribution of the axes showed a remarkable gradient of genus *Haemophilus* abundance increasing from left to right (from Group A to C) (Figure 2B). Other abundant bacterial genera with a more even distribution along the X-axis included *Moraxella*, *Streptococcus*, among others (Figure 2B).

Mean relative abundance ($\pm\text{SD}$) of bacterial genera between study groups (Figure 2C) showed that the nasopharyngeal microbiota of Group A was dominated primarily by genus *Moraxella* (35.0 ± 34.8), followed by *Streptococcus* (18.1 ± 24.1), *Dolosigranulum* (mean 17.6 ± 28.7) and *Haemophilus* (15.3 ± 28.2). Group B was dominated by *Haemophilus* (33.6 ± 37.8), *Moraxella* (31.6 ± 35.0), and *Streptococcus* (19.5 ± 27.1), followed far behind by *Staphylococcus* (5.8 ± 23.1) and others. Group C was even more dominated by *Haemophilus* (50.9 ± 38.8), *Moraxella* (24.0 ± 30.4), and *Streptococcus* (14.5 ± 27.1). A more detailed profiling per sample can be found in Supporting Information: e-Figure 1.

A differential abundant test showed that among all pairwise comparisons (Group A–C), genus *Dolosigranulum* was consistently more abundant in those subjects from Group A compared to any of the RV/EV+ groups, irrespective of their symptomatology/disease severity (Figure 3A). On the other hand, genus *Haemophilus* was consistently found to increase in those subjects from Group C both compared to Groups A and B (Figure 3A). Similar findings were found at the species level (Figure 3B), with increased *Dolosigranulum pigrum* and *Dolosigranulum unclassified* in Group A, and *H. influenzae* and *Haemophilus unclassified* in Group C. Of note, an unclassified species within genus *Staphylococcus* (identified as *Staphylococcus aureus* by a blast search against the NCBI 16S rRNA/ITS database) was also found increased in Group A compared to Group C.

Haemophilus, *Moraxella*, and *Streptococcus* not only compromised the topmost abundant bacterial genera in our study population, but the latest two showed a negative correlation to the former (Supporting Information: e-Figure 2). Positive correlations were found between *Corynebacterium* and *Dolosigranulum*, as well as amongst other bacterial genera usually found in the oral cavity including *Acinomyces*, *Rothia*, *Granulicatella*, *Porphyromonas*, *Fusobacterium*, *Alloprevotella*, *Gemella*, *Prevotella*, and *Veillonella* (Supporting Information: e-Figure 2).

A specific analysis was performed to identify changes in microbiota richness, diversity, and bacterial genera composition related to the potential confounders unequally distributed between the study groups (RSV coinfection, type of delivery, seasonality, and having received at least 1 dose of mandatory vaccinations). RSV-infected children did not show differences in either alpha diversity or bacterial genera composition compared to RSV noninfected children, yet this comparison was restricted to Group C. Differences were neither observed between children delivered by c-section and those who had a vaginal delivery, nor between those recruited at winter and those included from other seasons. On the other hand, mandatory vaccination was associated with higher bacterial richness and diversity; however, no significant changes were observed in the main bacterial genera abundance.

4 | DISCUSSION

During the last years, several publications have raised the importance of the bacterial nasopharyngeal microbiota as a factor that could determine the severity of viral LRTI. However, scarce evidence has

TABLE 1 Main epidemiological and microbiological characteristics of study groups.

	Total (N = 104)	Group A (N = 17)	Group B (N = 34)	Group C (N = 53)	p Value
<i>Epidemiological characteristics</i>					
Age range (months old)					0.111
<3	53 (51%)	5 (30%)	17 (50%)	31 (58%)	
3–11	25 (24%)	6 (35%)	6 (18%)	13 (24%)	
>11–23	7 (7%)	0 (0%)	4 (12%)	3 (6%)	
>23	19 (18%)	6 (35%)	7 (20%)	6 (12%)	
Gender, male (%)	63 (61%)	9 (53%)	20 (59%)	34 (64%)	0.690
Birth weight, kg, median (IQR)	3.2 (2.9–3.6)	3.2 (2.9–3.7)	3.2 (2.9–3.6)	3.2 (2.9–3.5)	0.720
House surface per inhabitant, m ² , median (IQR)	22.5 (16.9–27.1)	22.9 (18.9–28.7)	20.0 (17.5–25.0)	22.5 (16.0–27.5)	0.597
Seasonality, samples collected during winter season ^a (%)	47 (46%)	7 (41%)	10 (32%)	30 (57%)	0.043
Race, Caucasian (%)	70 (76%)	13 (76%)	16 (73%)	41 (77%)	0.912
Delivery mode, C-section (%)	33 (32%)	3 (18%)	7 (21%)	23 (44%)	0.027
Breastfeeding (%)	82 (79%)	13 (76%)	27 (79%)	42 (79%)	0.966
Breastfeeding duration, months, median (IQR)	2 (1–6)	3 (0.5–6)	2.5 (0.8–10.7)	1 (1–4.7)	0.601
Schooled (%)	21 (20%)	5 (29%)	10 (30%)	6 (11%)	0.063
Parental smoking (%)	34 (33%)	7 (41%)	10 (29%)	17 (33%)	0.700
Superior educational level (%)	68 (76%)	13 (81%)	17 (81%)	38 (73%)	0.681
Mandatory vaccinations (at least one dose) ^b (%)	51/56 (91%)	11/12 (92%)	23/23 (100%)	17/21 (81%)	0.086
LRTI in the last month (%)	11 (11%)	1 (6%)	2 (6%)	8 (15%)	0.312
<i>Microbiological characteristics</i>					
DNA/RNA other viral detections by multiplex PCR (%)	41 (47%)		11 (32%)	30 (57%)	0.027
Human respiratory syncytial virus (A and B) (%)	23 (26%)		1 (3%)	22 (41%)	<0.001
Human metapneumovirus (%)	6 (7%)		1 (3%)	5 (9%)	0.397
Human coronaviruses (OC43/229E/NL63) (%)	2 (2%)		2 (6%)	0 (0%)	0.150
Human parainfluenza viruses (1, 2, 3, 4) (%)	4 (5%)		1 (3%)	3 (6%)	1
Human influenza viruses (A and B) (%)	1 (1%)		1 (3%)	0 (0%)	0.391
Human adenovirus (%)	10 (12%)		6 (18%)	4 (7%)	0.179
Human bocavirus(%)	2 (2%)		2 (6%)	0 (0%)	0.150
RV/EV species (%)					0.492
EV-A	1 (1%)		1 (3%)	0 (0%)	
EV-B	1 (1%)		0 (0%)	1 (2%)	
RV-A	37 (42%)		15 (44%)	22 (41%)	
RV-B	9 (10%)		2 (6%)	7 (13%)	
RV-C	30 (35%)		11 (32%)	19 (36%)	
Noncharacterized	9 (10%)		5 (15%)	4 (7%)	

Note: Statistically significant p values are marked with bold.

Abbreviations: DNA, deoxyribonucleic acid; EV, enterovirus; IQR, interquartile range; LRTI, lower respiratory tract infection; PCR, polymerase chain reaction; RNA, ribonucleic acid; RV, rhinovirus.

^aWinter season: samples collected between January 1 and March 31.

^bOfficial vaccination calendar in Catalonia, Spain includes: diphtheria, tetanus, pertussis (DTaP)], poliovirus, hepatitis B virus, and *Haemophilus influenzae* type b, meningococcal group B and pneumococcal conjugate vaccines.

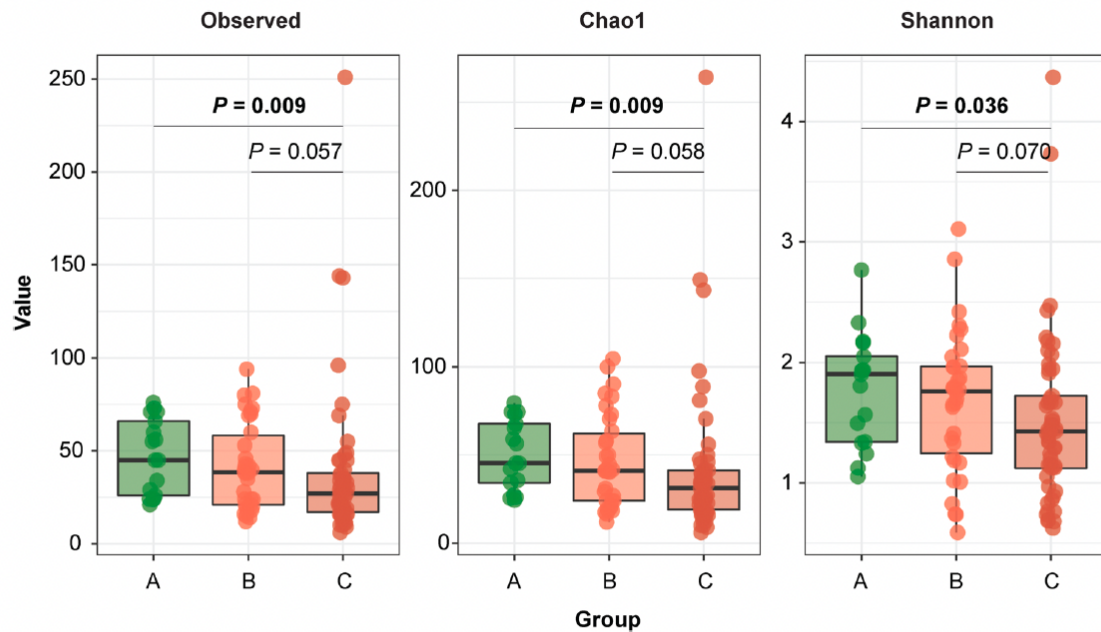


FIGURE 1 Alpha diversity metrics (observed richness, Chao 1 estimator and Shannon diversity index) between study groups. Boxplots showing richness (observed and Chao 1) diversity (Shannon) metrics by study groups (Group A [green], Group B [orange], and Group C [dark red]). Nonadjusted *p* values for pairwise comparisons are shown as regular lines if <0.05 or dashed lines if $0.1 > x > 0.05$. [Color figure can be viewed at wileyonlinelibrary.com]

been published in the specific scenario of RV/EV infection. This study addresses the characterization of different nasopharyngeal microbiota profiles in children according to this infection and its severity.

In terms of bacterial genera composition, in the nasopharynx of our study population topmost abundant players were *Moraxella*, *Haemophilus*, *Streptococcus*, and *Dolosigranulum*. This finding is in line with previous publications showing that during the first year of life, when the nasopharyngeal microbiota is most unstable, initial colonizers such as *Staphylococcus*, *Dolosigranulum*, and *Corynebacterium* are gradually replaced by common pathobionts including *Moraxella*, *Streptococcus*, and *Haemophilus*.¹⁸ Also, in line with previous literature, other bacterial genera found in our data set, yet with lower abundance, included commonly bacterial genera found in the oral cavity of healthy children.¹⁹

Regarding differences according to RV/EV infection status and its severity, children with severe RV/EV LRTI had a nasopharyngeal microbiota significantly less rich and diverse than healthy controls. Moreover, severe RV/EV infection was also significantly associated to a lower abundance of *Dolosigranulum* and a higher abundance of *Haemophilus*. Interestingly, children with mild or asymptomatic RV/EV infection showed an intermediate profile between the other two groups with less *Dolosigranulum* abundance than the healthy control group, but also trends for higher richness and significantly less *Haemophilus* abundance than the severe RV/EV group. This result is of special interest because RV/EV infection, even in patients with asymptomatic infection, in whom it could be considered a coincidental detection, is associated with changes in bacterial nasopharyngeal composition. This fact would cast doubt on defining as healthy

patients those asymptomatic children carrying the virus, but further longitudinal studies focused on this population are needed to elucidate if these changes are long-standing and have clinical consequences.

These findings are in line with previous reports by our group, describing significant reductions in bacterial richness and diversity in the microbiota of respiratory diseases such as invasive pneumococcal disease (IPD),²⁰ *Bordetella* infection,²¹ and similar to the ones found by other authors regarding URTI²² or asthma,²³ among others. Lower *Dolosigranulum* abundance associated to disease states in children has also been previously reported.^{24,25} *Dolosigranulum* is a genus with only one specie known so far, *D. pigrum*.²⁶ *D. pigrum* belongs to the group of lactic acid bacteria, a heterogeneous group of bacteria that produce lactate as the main metabolite from glucose.²⁶ These bacteria have been detected mainly in the gastrointestinal tract, where they exert numerous beneficial functions for human health.²⁶ The colonization of the upper respiratory tract by these bacteria has been defined as a protective factor against respiratory infections, asthma, and exacerbations of chronic respiratory diseases.^{20,27,28} Of note, in this study, we did not only describe reductions in the abundance of *Dolosigranulum* with RV/EV infection (regardless of disease severity) but also its positive correlation to genus *Corynebacterium*, a known commensal of the respiratory microbiota,^{29,30} and their negative correlation to genus *Streptococcus*^{31,32} which includes *S. pneumoniae*, a common opportunistic pathobiont in children. These negative correlations with *S. pneumoniae* were also observed in previous studies by our group,^{20,24} and in the literature.³³ This could allude to the existence of antagonistic interactions between both

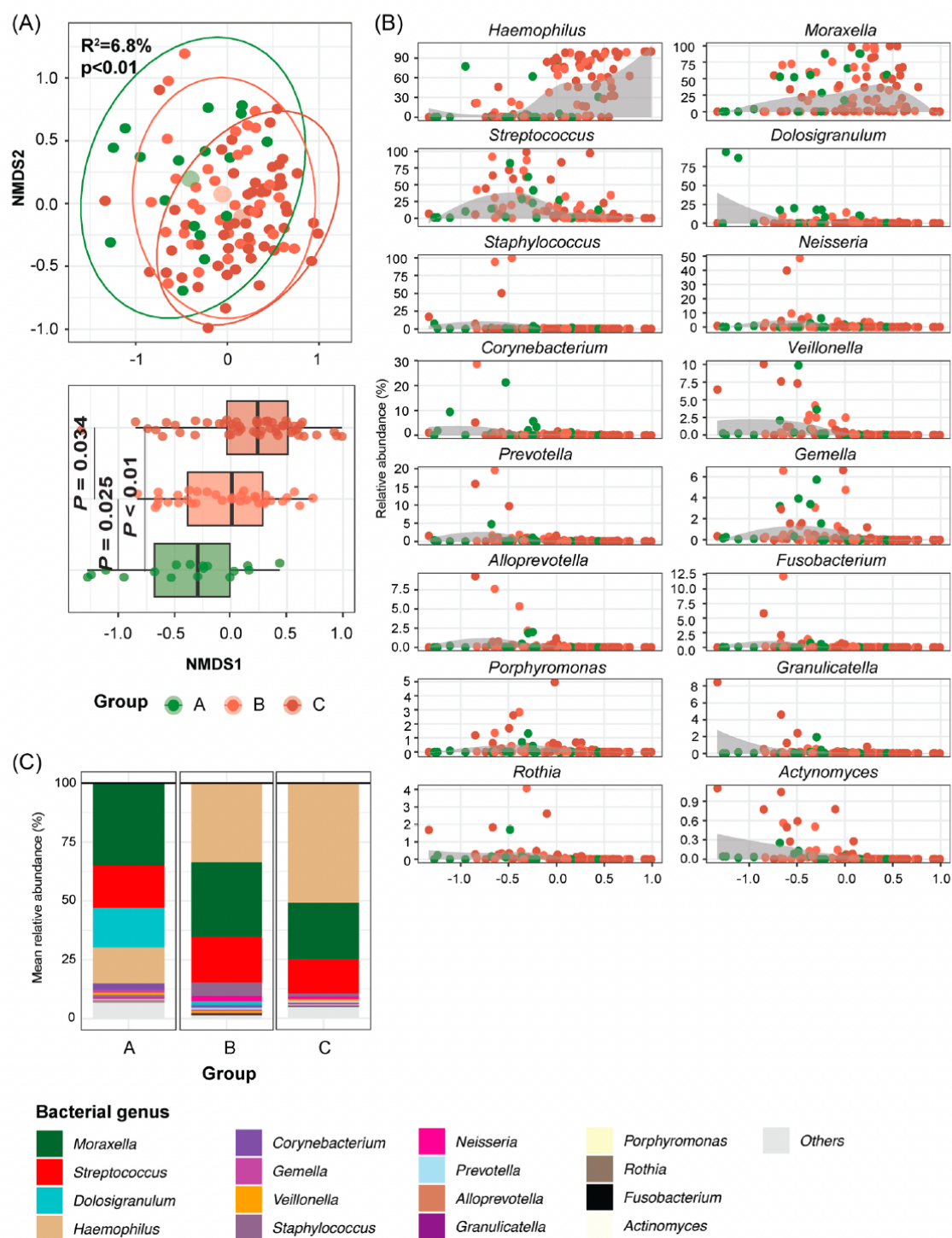


FIGURE 2 Overall nasopharyngeal bacterial genera composition between study groups. (A) Principal coordinates (PCoA) ordination analysis on Bray-Curtis ecological distance matrix calculated on complete bacterial genera abundance taxa (top). Each dot represents a sample and it is colored based on study group (Group A in green, Group B in orange, and Group C in the dark red). Boxplot below shows coordinates from axis 1 (NMDS1) from the ordination plot above. Nonadjusted p values for pairwise comparisons are shown as regular lines if <0.05 or dashed lines if $0.1 > x > 0.05$. (B) Bacterial genera abundance filtered by a minimum of 0.5% relative abundance in at least five samples and ordered from most to least mean abundant. Each dot represents a sample colored by its study group (Group A in green, Group B in orange, and Group C in the dark red). A local regression (gray) shows the relation between the bacterial families' relative abundance and the samples' distribution on Axis 1. (C) Bacterial genera filtered by a minimum of 0.5% relative abundance in at least five samples. Mean relative abundance per group is calculated and shown in each barplot. Bacterial genera not passing the abundance filter are grouped into the "Others" category. [Color figure can be viewed at [wileyonlinelibrary.com](https://onlinelibrary.wiley.com)]

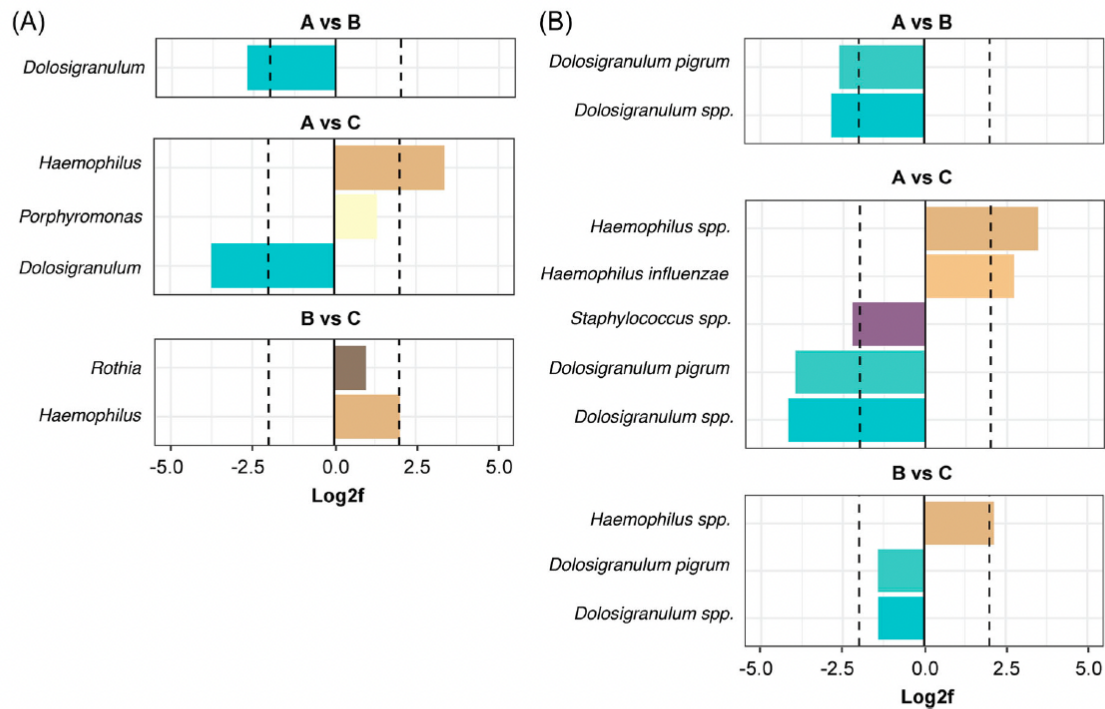


FIGURE 3 Differentially abundant bacterial taxa by RV/EV infection status and severity. Pairwise differential abundance analysis on bacterial taxa per study groups (A, B, and C). Bacterial genera (A) and species (B) filtered by a minimum of 0.5% relative abundance in at least five samples. Log2F is shown along the X-axis and taxa are colored based on their taxonomic classification. EV, enteroviruses; RV, rhinoviruses. [Color figure can be viewed at wileyonlinelibrary.com]

bacteria in the nasopharynx of children as a possible mechanism for the prevention of IPD. Moreover, studies have been carried out in animal models that advance a future clinical application of these observations. In vivo mouse models have shown an increased resistance to pneumococcal infection in those mice in which *D. pigrum* was administered intranasally, as well as differential cytokine production and a reduction in lung damage.^{34,35}

In addition to decreased *Dolosigranulum* abundance, severe RV/EV infection in our study showed increased *Haemophilus* abundance. Higher *Proteobacteria* abundance, specifically genus *Haemophilus*, has also been linked to many respiratory diseases such as childhood asthma^{36,37} as well as to increased incidence³⁸ and symptom severity³⁹ of viral infections. In a small experimental longitudinal series of young adults,⁴⁰ RV/EV infection was associated to a very significant increase of *Haemophilus* bacterial load, which is in line with our findings. A similar *Haemophilus* dominant profile has been also observed in children with severe bronchiolitis and RV infection.⁴¹

Regarding RSV infection, Mansbach et al. showed that clearance of RSV during bronchiolitis was more likely to be reduced in subjects with a *Haemophilus* dominant profile.⁴² A more severe RSV disease has been associated with a nasopharyngeal microbiota profile enriched in *H. influenzae* and *Streptococcus*.^{42,43} However, it is worth noting that in our study RSV infection, which was only detected in 1 (3%) mild/asymptomatic controls and in 22 (41%) cases, did not relate to significant changes neither on alpha diversity nor bacterial genera

differential abundance within our RV/EV case group. Therefore, we have not observed the high dominance of *Streptococcus* reported by others in RSV severe cases. We speculate that this fact could imply that RV/EV + RSV coinfection has differential features in reference to RSV bronchiolitis.

Vaccination strategies have also been reported to have beneficial effects through the modulation of commensal nasopharyngeal microbiota.⁴⁴ In our study, the subgroup of children subjected to mandatory vaccination was characterized by increased bacterial richness and diversity. These results are aligned with those of previous studies by our group²⁰ and in the literature,⁴⁵ suggesting that the microorganisms from the surrounding environment (for instance, the oral cavity) might occupy the nasopharyngeal niche left by bacteria serotypes included in vaccines. Of note, cases in our study were less vaccinated than controls and showed lower bacterial richness and diversity, as well as decreased *Dolosigranulum* abundance, reinforcing the potential beneficial effect of vaccination.

This study presents several limitations. First, the study population was small but of similar size to previous studies examining these relationships in respiratory contexts.⁴⁶ Second, due to the cross-sectional case-control design, no causality could be established from the outcomes, only associations, and no follow-up could be made on changes in the nasopharyngeal microbiota after PICU discharge.

In conclusion, different nasopharyngeal microbiota profiles according to RV/EV LRTI status in children were characterized in

our study. Richness and diversity were decreased among children with severe infection by viruses from the genus *Enterovirus*. Nasopharyngeal microbiota profiles enriched in genus *Dolosigranulum* were related to respiratory health, while genus *Haemophilus* was specifically predominant in children with severe RV/EV LRTI. Children with mild or asymptomatic RV/EV infection showed an intermediate profile. These findings suggest a close relationship between the nasopharyngeal microbiota and different clinical presentations of RV/EV infection.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Daniel Penela-Sánchez, Muntsa Rocafort, Desirée Henares, Iolanda Jordan, Maria Cabrerizo, and Cristian Launes performed case-control recruitment and data collection. Daniel Penela-Sánchez, Muntsa Rocafort, Desirée Henares, and Pedro Brotons did the bioinformatic and statistical analysis. Cristian Launes and Carmen Muñoz-Almagro conceptualized the study and obtained funding for its realization. All authors contributed to the manuscript preparation, revision and edition, and have provided approval for submission.

ACKNOWLEDGMENTS

We acknowledge the support of all families that participated in this study; FISABIO for their help in nasopharyngeal microbiota sequencing; and also we thanks to all the clinical, laboratory, and diagnostic imaging personnel who take care of all these patients. This project is supported by the Spanish National Health Institute Carlos III (Grant id. PI17/349). Cofunded by European Regional Development Fund/ European Social Fund "A way to make Europe"/"Investing in your future."

CONFLICT OF INTEREST STATEMENT

The authors declare no conflict of interest.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

Daniel Penela-Sánchez, Cristian Launes and Muntsa Rocafort have access to all study data and takes responsibility for the data integrity and accuracy of the data analysis. The datasets generated during and/or analyzed during the current study are available in the European Nucleotide Archive (ENA) repository (<https://www.ebi.ac.uk/ena/browser/home>) under Bioproject PRJEB52956. Code used for the bioinformatic and statistical analysis and plotting the data (10.6084/m9.figshare.19826008) as well as the input data file (10.6084/m9.figshare.19825837) and color dictionary (10.6084/m9.figshare.19825249; 10.6084/m9.figshare.19825450) have been uploaded to FigShare.

ORCID

Daniel Penela-Sánchez  <http://orcid.org/0000-0002-5289-6609>
Cristian Launes  <http://orcid.org/0000-0002-0913-9303>

REFERENCES

- GBD 2019 Under-5 Mortality Collaborators. Global, regional, and national progress towards Sustainable Development Goal 3.2 for neonatal and child health: all-cause and cause-specific mortality findings from the Global Burden of Disease Study 2019. *Lancet*. 2021;398(10303):870-905. doi:10.1016/S0140-6736(21)01207-1
- Lauinger IL, Bible JM, Halligan EP, et al. Patient characteristics and severity of human rhinovirus infections in children. *J Clin Virol*. 2013;58(1):216-220. doi:10.1016/j.jcv.2013.06.042
- Brotons P, Jordan I, Bassat Q, et al. The positive rhinovirus/enterovirus detection and SARS-CoV-2 persistence beyond the acute infection phase: an intra-household surveillance study. *Viruses*. 2021;13(8):1598. doi:10.3390/v13081598
- Meskill SD, O'Bryant SC. Respiratory virus co-infection in acute respiratory infections in children. *Curr Infect Dis Rep*. 2020;22(1):3. doi:10.1007/s11908-020-0711-8
- Penela-Sánchez D, González-de-Audicana J, Armero G, et al. Lower respiratory tract infection and genus enterovirus in children requiring intensive care: clinical manifestations and impact of viral co-Infections. *Viruses*. 2021;13(10):2059. doi:10.3390/v13102059
- Kloepfer KM, Lee WM, Pappas TE, et al. Detection of pathogenic bacteria during rhinovirus infection is associated with increased respiratory symptoms and asthma exacerbations. *J Allergy Clin Immunol*. 2014;133(5):1301-1307.e3. doi:10.1016/j.jaci.2014.02.030
- de Steenhuijsen Piters WAA, Sanders EAM, Bogaert D. The role of the local microbial ecosystem in respiratory health and disease. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2015;370(1675):20140294. doi:10.1098/rstb.2014.0294
- Di Pierro F, Colombo M, Zanvit A, Risso P, Rottoli A. Use of *Streptococcus salivarius* K12 in the prevention of streptococcal and viral pharyngotonsillitis in children. *Drug Healthc Patient Saf*. 2014;6:15-20. doi:10.2147/DHPS.S59665
- Allen EK, Koepfel AF, Hendley JO, Turner SD, Winther B, Sale MM. Characterization of the nasopharyngeal microbiota in health and during rhinovirus challenge. *Microbiome*. 2014;2:22. doi:10.1186/2049-2618-2-22
- Molyneux PL, Mallia P, Cox MJ, et al. Outgrowth of the bacterial airway microbiome after rhinovirus exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 2013;188(10):1224-1231. doi:10.1164/rccm.201302-0341OC
- Jartti T, Jartti L, Peltola V, Waris M, Ruuskanen O. Identification of respiratory viruses in asymptomatic subjects: asymptomatic respiratory viral infections. *Pediatr Infect Dis J*. 2008;27(12):1103-1107. doi:10.1097/INF.0b013e31817e695d
- Callahan BJ, McMurdie PJ, Rosen MJ, Han AW, Johnson AJA, Holmes SP. DADA2: high-resolution sample inference from illumina amplicon data. *Nature Methods*. 2016;13(7):581-583. doi:10.1038/nmeth.3869
- Cole JR, Wang Q, Fish JA, et al. Ribosomal database project: data and tools for high throughput rRNA analysis. *Nucleic Acids Res*. 2014;42(Database issue):D633-D642. doi:10.1093/nar/gkt1244
- Davis NM, Proctor DM, Holmes SP, Relman DA, Callahan BJ. Simple statistical identification and removal of contaminant sequences in marker-gene and metagenomics data. *Microbiome*. 2018;6(1):226. doi:10.1186/s40168-018-0605-2
- McMurdie PJ, Holmes S. phyloseq: an R package for reproducible interactive analysis and graphics of microbiome census data. *PLoS One*. 2013;8(4):e61217. doi:10.1371/journal.pone.0061217
- Oksanen J, Blanchet FG, Kindt R, et al. Package 'vegan.' *R Package Version 2.0-8*. 2013;2:254. <https://github.com/vegandevs/vegan>
- Lin H, Peddada SD. Analysis of compositions of microbiomes with bias correction. *Nat Commun*. 2020;11(1):3514. doi:10.1038/s41467-020-17041-7
- Bosch AATM, Piters WAAS, van Houten MA, et al. Maturation of the infant respiratory microbiota, environmental drivers, and health consequences. A prospective cohort study. *Am J Respir Crit Care Med*. 2017;196(12):1582-1590. doi:10.1164/rccm.201703-0554OC

19. Dewhirst FE, Chen T, Izard J, et al. The human oral microbiome. *J Bacteriol*. 2010;192(19):5002-5017. doi:10.1128/JB.00542-10
20. Henares D, Brotons P, de Sevilla MF, et al. Differential nasopharyngeal microbiota composition in children according to respiratory health status. *Microb Genom*. 2021;7(10):000661. doi:10.1099/mgen.0.000661
21. Rocafort M, Henares D, Brotons P, et al. Exploring the nasopharyngeal microbiota composition in infants with whooping cough: a test-negative case-control study. *PLoS One*. 2021;16(10):e0259318. doi:10.1371/journal.pone.0259318
22. Sakwinska O, Bastic Schmid V, Berger B, et al. Nasopharyngeal microbiota in healthy children and pneumonia patients. *J Clin Microbiol*. 2014;52(5):1590-1594. doi:10.1128/JCM.03280-13
23. Chen M, He S, Miles P, et al. Nasal bacterial microbiome differs between healthy controls and those with asthma and allergic rhinitis. *Front Cell Infect Microbiol*. 2022;12:841995. doi:10.3389/fcimb.2022.841995
24. Camelo-Castillo A, Henares D, Brotons P, et al. Nasopharyngeal microbiota in children with invasive pneumococcal disease: identification of bacteria with potential disease-promoting and protective effects. *Front Microbiol*. 2019;10:11. doi:10.3389/fmicb.2019.00011
25. Lappan R, Imbrogno K, Sikazwe C, et al. A microbiome case-control study of recurrent acute otitis media identified potentially protective bacterial genera. *BMC Microbiol*. 2018;18(1):13. doi:10.1186/s12866-018-1154-3
26. Mokoena MP. Lactic acid bacteria and their bacteriocins: classification, biosynthesis and applications against uropathogens: a mini-review. *Molecules*. 2017;22(8):1255. doi:10.3390/molecules22081255
27. Hasegawa K, Linnemann RW, Mansbach JM, et al. Nasal airway microbiota profile and severe bronchiolitis in infants: a case-control study. *Pediatr Infect Dis J*. 2017;36(11):1044-1051. doi:10.1097/INF.0000000000001500
28. Kaul D, Rathnasinghe R, Ferres M, et al. Microbiome disturbance and resilience dynamics of the upper respiratory tract during influenza A virus infection. *Nat Commun*. 2020;11(1):2537. doi:10.1038/s41467-020-16429-9
29. Cremers AJ, Zomer AL, Gritfeld JF, et al. The adult nasopharyngeal microbiome as a determinant of pneumococcal acquisition. *Microbiome*. 2014;2:44. doi:10.1186/2049-2618-2-44
30. De Boeck I, Wittouck S, Wuyts S, et al. Comparing the healthy nose and nasopharynx microbiota reveals continuity as well as niche-specificity. *Front Microbiol*. 2017;8:2372. doi:10.3389/fmicb.2017.02372
31. Bomar L, Brugger SD, Yost BH, Davies SS, Lemon KP. *Corynebacterium accolens* releases antipneumococcal free fatty acids from human nostril and skin surface triacylglycerols. *mBio*. 2016;7(1):e01725-15. doi:10.1128/mBio.01725-15
32. Brugger SD, Eslami SM, Pettigrew MM, et al. *Dolosigranulumpigrum* cooperation and competition in human nasal microbiota. *mSphere*. 2020;5(5):e00852-20. doi:10.1128/mSphere.00852-20
33. de Steenhuijsen Piters WAA, Jochems SP, Mitsi E, et al. Interaction between the nasal microbiota and *S. pneumoniae* in the context of live-attenuated influenza vaccine. *Nat Commun*. 2019;10(1):2981. doi:10.1038/s41467-019-10814-9
34. Ortiz Moyano R, Raya Tonetti F, Tomokiyo M, et al. The ability of respiratory commensal bacteria to beneficially modulate the lung innate immune response is a strain dependent characteristic. *Microorganisms*. 2020;8(5):727. doi:10.3390/MICROORGANISMS8050727
35. Raya Tonetti F, Tomokiyo M, Ortiz Moyano R, et al. The respiratory commensal bacterium *Dolosigranulum pigrum* 040417 improves the innate immune response to *Streptococcus pneumoniae*. *Microorganisms*. 2021;9(6):1324. doi:10.3390/MICROORGANISMS9061324
36. Hyde ER, Petrosino JF, Piedra PA, Camargo CA, Jr., Espinola JA, Mansbach JM. Nasopharyngeal proteobacteria are associated with viral etiology and acute wheezing in children with severe bronchiolitis. *J Allergy Clin Immunol*. 2014;133(4):1220-1222.e3. doi:10.1016/j.jaci.2013.10.049
37. Teo SM, Mok D, Pham K, et al. The infant nasopharyngeal microbiome impacts severity of lower respiratory infection and risk of asthma development. *Cell Host Microbe*. 2015;17(5):704-715.
38. Rosas-Salazar C, Shilts MH, Tovchigrechko A, et al. Nasopharyngeal microbiome in respiratory syncytial virus resembles profile associated with increased childhood asthma risk. *Am J Respir Crit Care Med*. 2016;193(10):1180-1183. doi:10.1016/j.chom.2015.03.008
39. Langevin S, Pichon M, Smith E, et al. Early nasopharyngeal microbial signature associated with severe influenza in children: a retrospective pilot study. *J Gen Virol*. 2017;98(10):2425-2437. doi:10.1099/jgv.0.000920
40. Hofstra JJ, Matamoros S, van de Pol MA, et al. Changes in microbiota during experimental human rhinovirus infection. *BMC Infect Dis*. 2015;15:336. doi:10.1186/s12879-015-1081-y
41. Toivonen L, Camargo CA, Jr., Gern JE, et al. Association between rhinovirus species and nasopharyngeal microbiota in infants with severe bronchiolitis. *J Allergy Clin Immunol*. 2019;143(5):1925-1928.e7. doi:10.1016/j.jaci.2018.12.1004
42. Mansbach JM, Hasegawa K, Piedra PA, et al. Haemophilus-dominant nasopharyngeal microbiota is associated with delayed clearance of respiratory syncytial virus in infants hospitalized for bronchiolitis. *J Infect Dis*. 2019;219(11):1804-1808. doi:10.1093/infdis/jiy741
43. de SteenhuijsenPiters WAA, Heinonen S, Hasrat R, et al. Nasopharyngeal microbiota, host transcriptome, and disease severity in children with respiratory syncytial virus infection. *Am J Respir Crit Care Med*. 2016;194(9):1104-1115. doi:10.1164/rccm.201602-0220OC
44. Mika M, Maurer J, Korten I, et al. Influence of the pneumococcal conjugate vaccines on the temporal variation of pneumococcal carriage and the nasal microbiota in healthy infants: a longitudinal analysis of a case-control study. *Microbiome*. 2017;5(1):85. doi:10.1186/s40168-017-0302-6
45. Biesbroek G, Wang X, Keijser BJF, et al. Seven-valent pneumococcal conjugate vaccine and nasopharyngeal microbiota in healthy children. *Emerging Infect Dis*. 2014;20(2):201-210. doi:10.3201/eid2002.131220
46. Marsh RL, Smith-Vaughan HC, Chen ACH, et al. Multiple respiratory microbiota profiles are associated with lower airway inflammation in children with protracted bacterial bronchitis. *Chest*. 2019;155(4):778-786. doi:10.1016/j.chest.2019.01.002

SUPPORTING INFORMATION

Additional supporting information can be found online in the Supporting Information section at the end of this article.

How to cite this article: Penela-Sánchez D, Rocafort M, Henares D, et al. Impact of the bacterial nasopharyngeal microbiota on the severity of genus enterovirus lower respiratory tract infection in children: a case-control study. *Pediatr Pulmonol*. 2023;1-10. doi:10.1002/ppul.26393

5. DISCUSIÓN

Los estudios que conforman la presente tesis ayudan a entender el papel que la co-infección viral y la microbiota nasofaríngea bacteriana ejercen a la hora de modular la gravedad de la infección respiratoria por RV/EV en población pediátrica.

Con respecto a las comunidades virales, la relación entre co-infección viral y gravedad de la ITRI es objeto de controversia en la literatura. En un estudio realizado por Chauhan JC et al, en el que se evaluaron retrospectivamente pacientes menores de 5 años que ingresaron en una UCIP por una ITRI grave causada por un solo agente viral vs co-infección con múltiples virus, observaron que éstos últimos presentaron un riesgo incrementado de ingreso prolongado y una necesidad prolongada de VMI [153]. En cambio, otros trabajos no muestran diferencias clínicamente significativas en pacientes co-infectados [154, 239-240]. Sin embargo, como ya hemos señalado el papel de la co-infección viral como factor de gravedad puede ser diferente en función de la etiología vírica [155], y este aspecto a menudo no se ha tenido en cuenta en la literatura.

En el primer estudio de esta tesis se describe que la co-infección de RV/EV con múltiples virus respiratorios no representa un factor que incremente la gravedad de dicha infección. De hecho, en nuestra serie, los pacientes que presentaron una ITRI grave por RV/EV en mono-infección precisaron VMI y tuvieron una estancia media en UCIP significativamente mayor que los pacientes con múltiples co-infecciones. Este dato es relevante, en tanto que pone en valor el papel patogénico de los propios RV/EV. Como se ha comentado, los RV/EV pueden ser detectados en niños asintomáticos [241], motivo por el cual estos microorganismos han sido clásicamente minusvalorados. Sin embargo, como señalábamos, en nuestra serie prácticamente la mitad de los pacientes presentaron una mono-infección por RV/EV, con resultados clínicos similares a los co-infectados por VRS, cuya virulencia esta fuera de todo debate [242]. De hecho, en el subanálisis realizado teniendo en cuenta la presencia o no de VRS, se mantenía el comportamiento descrito en la mono-infección por RV/EV cuando el VRS no estaba presente, reforzando como comentábamos la virulencia de los RV/EV. Se han descrito en la literatura hallazgos similares, en trabajos que comparaban niños con infección con VRS y RV/EV en co-infección vs niños con VRS en mono-infección, presentando en

el primer caso estancias hospitalarias más prolongadas [243]. Además, la etiología viral de las ITRI puede ser un factor que determine el pronóstico y la morbilidad a medio y largo plazo [53]. En este sentido, las infecciones por RV/EV se han asociado a predisposición atópica y a un riesgo incrementado de asma; en cambio esta situación ocurre en menor frecuencia en las infecciones por VRS [244]. Todos estos datos refuerzan el papel específico de los RV/EV en mono-infección como agente etiológico de ITRI grave en el paciente pediátrico, especialmente en aquellos niños de menor edad.

Por lo que respecta al papel de la co-infección viral en la modulación de la gravedad de la infección por RV/EV, señalar que en nuestra serie este papel fue diferente en función de si la co-infección era con VRS o con múltiples virus. Por un lado, los pacientes con ITRI grave por RV/EV en co-infección con VRS presentaron una estancia más prolongada en UCIP y mayor tiempo de VMI en comparación con los otros subgrupos. Estos resultados son similares a los reportados por otros autores, en los que se señalaba que el VRS puede causar neumonía de forma más frecuente cuando se asocia a co-infección con RV/EV [245-246]. En cambio, los pacientes con ITRI grave por RV/EV con múltiples co-infecciones virales presentaron estancias en UCIP significativamente más cortas y ninguno de estos pacientes precisó de soporte respiratorio con VMI. Es interesante señalar que dentro de este subgrupo también se detectaron algunos pacientes con VRS, presentando un comportamiento clínico similar, a diferencia del subgrupo de RV/EV en co-infección con VRS aislada.

Existen diferentes teorías que podrían explicar estas diferencias. Por un lado, la exposición a múltiples virus en ITRI sucesivas podría condicionar un mejor acondicionamiento del sistema inmunitario, mediante una activación sinérgica de la inmunidad innata causada por la infección por RV/EV o por VRS [22, 247], aunque no existe una evidencia clara de que estos pacientes cursen con infecciones más leves que los niños que no presentan estas infecciones de repetición [248]. Por otra parte, los diferentes patrones de infección viral (mono-infección vs co-infección con un virus patogénico vs co-infección con múltiples virus) pueden causar diversos cambios en la microbiota respiratoria y diversos grados de inflamación de la vía aérea inducidos por la interacción de estos microorganismos [249].

En este sentido, y de forma similar a los resultados de la presente tesis, algunos estudios realizados con técnicas convencionales, como cultivos y microbiología molecular convencional, referían que los RV/EV se asociaban con una detección incrementada en la nasofaringe de niños sanos de patobiontes como *S.pneumoniae* y *H.influenzae*, mientras que el VRS se ha asociado a *H.influenzae* [250-251]. Otro estudio de cohortes longitudinal prospectivo demostró que las infecciones por RV/EV sintomáticas a lo largo del primer año de vida se podían asociar a un incremento de la riqueza bacteriana, pero con una pérdida de diversidad; sin embargo, estas diferencias no se observaron en niños sanos [252]. Por otra parte, se han descrito también asociaciones de RV/EV con microbiotas nasales ricas en *Moraxella spp*, condicionando un daño epitelial y una expresión incrementada de citoquinas pro-inflamatorias en niños asmáticos [253]. Posteriormente discutiremos con mayor detalle el papel de la microbiota nasofaríngea bacteriana en la infección por RV/EV.

Concerniente a las especies de RV/EV, en nuestra serie prácticamente todas las especies que se detectaron fueron RV, con unas proporciones similares a las previamente descritas en la literatura [254], con un predominio de los RV-A y C. A pesar del patrón clásico de circulación de los RV-C, con un pico de incidencia en los meses de invierno [35], en nuestra serie fueron detectados a lo largo de todo el año, en línea con lo publicado por otros autores [183]. No se observaron diferencias en cuanto a la gravedad de las infecciones en función de la especie de RV, tal y como se había descrito en otros trabajos, donde se reportaron proporciones similares de ingreso en UCIP, necesidad de VMI y estancia hospitalaria entre las diferentes especies [255-256]. Sin embargo, es interesante señalar que los RV-B solo se detectaron en nuestra serie en co-infección con VRS, por lo que no se puede descartar que, en estos casos, esta especie requiriera de una co-infección para expresar clínica grave. La menor gravedad de RV-B respecto a RV-A y C es objeto de controversia [92-94]. Así mismo, hay que destacar también que no se detectó ningún EV-D68, a pesar de que se había aislado en algún paciente en otra serie publicada por nuestro grupo [257]. Esto puede ser debido a que el patrón de circulación de este microorganismo es cambiante en función del año, alternando temporadas de alta incidencia con otras de baja circulación [258].

A continuación se discute el papel que la microbiota nasofaríngea bacteriana ejerce a la hora de modular la gravedad de la infección por RV/EV. En los últimos años, como comentábamos en la introducción, la microbiota nasofaríngea ha ganado protagonismo como factor modulador de la gravedad de las ITRI de causa viral; sin embargo, no existía demasiada información en este campo en el escenario específico de la infección por RV/EV. En el segundo estudio de esta tesis se describen diferentes perfiles de microbiota nasofaríngea bacteriana en función de la presentación clínica de la infección por RV/EV.

En cuanto a la composición en términos de géneros bacterianos de la nasofaringe de los pacientes de nuestro estudio, los géneros más abundantes fueron *Moraxella*, *Haemophilus*, *Streptococcus* y *Dolosigranulum*. Estos hallazgos están alineados con lo descrito previamente por la literatura: durante el primer año de vida, cuando la composición de la microbiota nasofaríngea bacteriana es más inestable, los colonizadores iniciales como *Staphylococcus*, *Dolosigranulum* y *Corynebacterium* son gradualmente reemplazados por patobiontes comunes como *Moraxella*, *Streptococcus* y *Haemophilus* [168]. Otros géneros que encontramos en nuestra muestra, aunque con una abundancia menor, fueron géneros bacterianos propios de la cavidad oral de niños sanos; este hecho, de nuevo, también se había descrito previamente en la literatura [259].

Hasta la fecha, no se conoce con exactitud la composición de la microbiota nasofaríngea bacteriana madura y “saludable”, dado que la mayoría de los estudios existentes en la literatura se basan en las variaciones de la composición de esta microbiota en relación con diferentes enfermedades [260]. Por el contrario, sí que se han estudiado diferentes factores que podrían modular dicha composición en los primeros meses de vida. Las comunidades bacterianas que colonizan el tracto respiratorio superior durante las primeras horas de vida parecen estar relacionadas con el tipo de parto [171]. En este sentido, la nasofaringe de recién nacidos vía parto vaginal es rica inicialmente en bacterias fecales, de la vagina y de la piel; sin embargo, los neonatos vía cesárea presentan una composición rica en bacterias de la piel o del entorno, sin observarse bacterias fecales [171]. En las siguientes 24 horas al nacimiento se expanden las bacterias propias de la cavidad oral, para ser reemplazadas posteriormente a la semana de vida

por un perfil rico en *S.aureus*, *Corynebacterium* y *Dolosigranulum pigrum*. Estos dos últimos constituyen los géneros dominantes a la edad de 6 meses.

Sin embargo, esta transición desde un perfil rico en *S.aureus* a un perfil con predominancia de *Corynebacterium/Dolosigranulum* ocurre antes en niños nacidos vía vaginal. Este fenómeno es incluso más pronunciado en aquellos niños que se alimentan con lactancia materna exclusiva [170], probablemente porque *Dolosigranulum* se halla también entre las bacterias que conforman la microbiota de la leche materna [261]. En cambio, los niños alimentados mediante leche artificial presentan un perfil de microbiota nasofaríngea dominado por *S.aureus* durante un período de tiempo más prolongado [170]. En nuestro estudio, no obstante, analizamos una muestra de pacientes en la que no existieron diferencias estadísticamente significativas en cuanto a los rangos etarios y la alimentación mediante LM entre los diferentes subgrupos, con lo que asumimos que los cambios observados a nivel de composición de la microbiota nasofaríngea bacteriana se deben a los diferentes cuadros de presentación clínica de la infección por RV/EV.

En cuanto a la modalidad de parto, en nuestro estudio los pacientes con infección grave por RV/EV presentaron una mayor proporción de partos por cesárea que el resto de los subgrupos. Sin embargo, no se observaron diferencias en cuanto a riqueza, diversidad o composición de géneros bacterianos entre aquellos niños nacidos por vía vaginal y los nacidos vía cesárea.

La composición de la microbiota nasofaríngea bacteriana en los primeros meses de vida podría tener por tanto consecuencias en esta etapa vital, particularmente en lo que respecta a la predisposición a presentar sibilancias recurrentes [167] o en la respuesta ante la infección por nuevos agentes infecciosos.

Respecto a los diferentes perfiles de microbiota nasofaríngea bacteriana en función de la presentación clínica de la infección por RV/EV, en nuestro estudio los niños con ITRI grave por RV/EV presentaron una microbiota nasofaríngea significativamente menos rica y diversa que los controles sanos. Además, la infección grave por RV/EV también se asoció significativamente con una menor abundancia de *Dolosigranulum* y una mayor abundancia de *Haemophilus*. Curiosamente, los niños con infección leve o asinto-

mática por RV/EV mostraron un perfil intermedio entre los otros dos grupos con menos abundancia de *Dolosigranulum* que el grupo de control sano, pero también tendencias a una mayor riqueza y significativamente menor abundancia de *Haemophilus* que el grupo grave de RV/EV. Este resultado es de especial interés porque la infección por RV/EV, incluso en pacientes con infección asintomática, en los que podría considerarse una detección coincidente, se asocia a cambios en la composición nasofaríngea bacteriana, traduciendo una disbiosis gradual de ésta. Este hecho pondría en duda definir como pacientes sanos a aquellos niños asintomáticos portadores del virus, pero se necesitan más estudios longitudinales centrados en esta población para dilucidar si estos cambios son duraderos y tienen consecuencias clínicas.

Los hallazgos que se acaban de describir son similares a los previamente publicados en trabajos realizados por nuestro grupo de investigación, demostrando reducciones significativas en la riqueza y diversidad de la microbiota nasofaríngea bacteriana en relación con enfermedades respiratorias como la enfermedad neumocócica invasiva [179], la infección por *Bordetella* [38], y similares a los encontrados por otros autores con respecto a las ITRS [227] o asma [262], entre otros. La menor abundancia de *Dolosigranulum* asociada a estados patológicos en niños también ha sido reportada previamente [263-264]. *Dolosigranulum* es un género con una sola especie conocida hasta el momento, *Dolosigranulum pigrum* [265]. *D.pigrum* pertenece a un grupo heterogéneo de bacterias que producen lactato como principal metabolito a partir de la glucosa [265]. Estas bacterias se han detectado principalmente en el tracto gastrointestinal, donde ejercen numerosas funciones beneficiosas para la salud humana [265]. La colonización del tracto respiratorio superior por estas bacterias ha sido definida como un factor protector frente a infecciones respiratorias, asma y exacerbaciones de enfermedades respiratorias crónicas [179, 266-267].

Cabe destacar que, en nuestro estudio, no solo describimos reducciones en la abundancia de *Dolosigranulum* en relación con la infección por RV/EV (independientemente de la gravedad de la enfermedad), sino también su correlación positiva con el género *Corynebacterium*, un comensal conocido de la microbiota respiratoria [268-269], y su correlación negativa con el género *Streptococcus* [270-271], que incluye *Streptococcus pneumoniae*, un patógeno oportunista común en niños. Una microbiota nasofaríngea

bacteriana rica en *Corynebacterium spp* se había asociado a salud respiratoria en estudios previos de nuestro grupo de investigación [179], encontrándose también una correlación positiva entre este género y *Dolosigranulum*, lo que invita a pensar en relaciones sinérgicas entre estas bacterias, como se ha reportado en la literatura [271], observándose que diferentes especies de *Corynebacterium* incrementaban la tasa de crecimiento de *D.pigrum in vitro*. En este sentido, un estudio realizado por nuestro grupo de investigación, en el que se caracterizó la microbiota nasofaríngea de niños y adultos durante el confinamiento decretado por la pandemia por el SARS-CoV-2, describió una predominancia de *Corynebacterium* y *Dolosigranulum*, así como una disminución de patobiontes como *Haemophilus* y *Streptococcus*, reforzando el papel de estos dos géneros bacterianos como representantes de salud respiratoria [272].

Las correlaciones negativas con *S.pneumoniae* también se observaron en estudios previos de nuestro grupo [179, 263] y en la literatura [273]. Estos hallazgos podrían aludir a la existencia de interacciones antagónicas entre ambas bacterias en la nasofaringe de los niños como posible mecanismo de prevención de la enfermedad neumocócica invasiva. Además, se han llevado a cabo estudios en modelos animales que avanzan en una futura aplicación clínica de estas observaciones. Los modelos de ratón *in vivo* han demostrado una mayor resistencia a la infección neumocócica en aquellos ratones a los que se administró *D. pigrum* por vía intranasal, así como una producción diferencial de citocinas y una reducción del daño pulmonar [274-275].

Además de la disminución de la abundancia de *Dolosigranulum*, los niños con infección grave por RV/EV en nuestro estudio presentaron una microbiota nasofaríngea bacteriana con mayor abundancia de *Haemophilus*. Una mayor abundancia de proteobacterias, específicamente del género *Haemophilus*, también se ha relacionado con muchas enfermedades respiratorias, como por ejemplo el asma [276-277], así como con una mayor incidencia [278] y gravedad de los síntomas [279] de infecciones virales. En una pequeña serie longitudinal experimental de adultos jóvenes [280], la infección por RV/EV se asoció con un aumento muy significativo de la carga bacteriana de *Haemophilus*, lo que está en consonancia con nuestros hallazgos. También se ha observado un perfil similar con dominancia de *Haemophilus* en niños con bronquiolitis grave e infección por RV/EV [281].

Existe también evidencia que ha relacionado perfiles de microbiota nasofaríngea bacteriana con predominio de *Haemophilus spp* con la gravedad de la infección por VRS. En este sentido, Mansbach *et al.* mostró que la reducción de la carga viral de VRS durante una bronquiolitis causada por este microorganismo era menos probable en sujetos con un perfil dominante de *Haemophilus* [282]. Una enfermedad por VRS más grave se ha asociado con un perfil de microbiota nasofaríngea enriquecido en *Haemophilus influenzae* y *Streptococcus* [282, 188]. Sin embargo, cabe destacar que en nuestro estudio la infección por VRS, que solo se detectó en 1 (3 %) de los controles leves/asintomáticos y en 22 (41 %) de los casos, no se relacionó con cambios significativos ni en la diversidad alfa ni en la abundancia diferencial de géneros bacterianos, incluso dentro del grupo de casos con infección grave RV/EV en los que se comparó el perfil de microbiota en función de la presencia o no de VRS. Por lo tanto, no hemos observado la alta dominancia de *Streptococcus* reportada por otros trabajos en casos severos de VRS. Este hecho podría implicar que la coinfección RV/EV + VRS presenta un perfil de microbiota nasofaríngea bacteriana propio, que difiere del previamente descrito cuando se da VRS en monoinfección.

Otro de los géneros bacterianos predominantes en nuestro estudio fue *Moraxella spp*. El papel de esta bacteria en la salud respiratoria resulta controvertido, a diferencia de lo comentado hasta ahora respecto *Dolosigranulum/Corynebacterium* y *Haemophilus*. Algunos autores señalan que podría tener un impacto negativo [283-285], mientras que otros preconizan sus efectos beneficiosos en cuanto a estabilidad de la microbiota respiratoria y prevención de infecciones respiratorias virales [264, 286-287].

Estos resultados contradictorios pueden explicarse por diferentes factores. En el caso de *Moraxella*, parece ser que el momento de colonización de la nasofaringe por parte de esta bacteria influye en su papel sobre la salud respiratoria del individuo. En este sentido, si la colonización del tracto respiratorio superior se da durante el primer mes de vida, esto conllevaría una mayor inestabilidad y riesgo de infecciones respiratorias [283, 285]. En cambio, si esta colonización se da más allá de los 2-3 meses de vida, la dominancia de *Moraxella* en la nasofaringe parece tener el efecto contrario, relacionándose con resistencia a la infección [174, 286]. Por otra parte, la mayoría de los estudios sobre microbiota humana son incapaces de diferenciar las distintas especies de

Moraxella, dadas las limitaciones del análisis gen ARNr 16S para la asignación de secuencias a nivel de especie [288], y dado que se conocen hasta la fecha dieciocho especies de *Moraxella* distintas es de suponer que no todas tienen la misma capacidad de producir enfermedad [289]. De hecho, en un estudio realizado por nuestro grupo se observó que perfiles de microbiota ricos en *Moraxella linconii* se asociaban con salud respiratoria [179].

A continuación, se analizan diferentes factores que podrían modular la composición de la microbiota nasofaríngea bacteriana. Anteriormente hemos discutido acerca del papel que la lactancia materna y la vía de parto podrían tener en este contexto. Hablaremos ahora sobre la vacunación. Se ha descrito en la literatura que las estrategias de vacunación pueden tener efectos beneficiosos a través de la modulación de la microbiota nasofaríngea comensal [290]. Sin embargo, existe controversia acerca del efecto real que las vacunas puedan tener sobre dicha microbiota. Algunos estudios defienden que la vacunación tiene tan solo un efecto directo sobre el patógeno diana, y no sobre el resto de microbiota comensal [291-292]. En cambio, otros estudios han demostrado que la vacunación aumenta la diversidad de la microbiota nasofaríngea [293] y modifica la composición taxonómica de ésta. En nuestro estudio, el subgrupo de niños sometidos a vacunación obligatoria se caracterizó por una mayor riqueza y diversidad bacteriana. Estos resultados están alineados con estudios previos de nuestro grupo [179], y como comentábamos de la literatura [293], sugiriendo que los microorganismos del ambiente circundante (por ejemplo, la cavidad oral) podrían ocupar el nicho nasofaríngeo que dejan los serotipos de bacterias incluidos en las vacunas. Es de destacar que los niños con infección grave por RV/EV en nuestro estudio estaban menos vacunados que los controles, y mostraron una menor riqueza y diversidad bacteriana, así como una disminución de la abundancia de *Dolosigranulum*, lo que refuerza el efecto beneficioso potencial de la vacunación.

Se discutirá ahora sobre la antibioterapia. En el segundo estudio de esta tesis se excluyeron aquellos pacientes que consumieron antibióticos durante más de 24 horas en el momento de la recogida del aspirado nasofaríngeo o en el mes previo al ingreso hospitalario. El consumo de antibióticos supone un importante factor confusor en los estudios de microbiota humana. Se ha descrito, por ejemplo, la reducción de géneros con

especies típicamente comensales, como *Corynebacterium* y *Dolosigranulum*, en el tracto respiratorio superior de niños sanos con historia de consumo antibiótico en los meses previos [168, 175-176, 277, 294], así como un aumento de géneros con potencial papel patogénico como *Streptococcus*, *Moraxella* y *Haemophilus* [277]. En este sentido, se ha sugerido que los antibióticos podrían tener consecuencias negativas en la salud respiratoria del individuo a través de las modificaciones de la microbiota respiratoria. Otros estudios, en cambio, han descrito fenómenos opuestos. Por ejemplo, en un estudio se observó una reducción del género *Moraxella* y de la carga bacteriana total en la cavidad nasal de niños menores de un año tras el tratamiento con azitromicina endovenosa durante 14 días para la bronquiolitis por VRS, hecho que se correlacionó con un menor riesgo de desarrollar sibilancias recurrentes posteriores y mayor salud respiratoria [295]. En esta línea, un estudio realizado por nuestro grupo identificó mayores niveles de diversidad en la microbiota nasofaríngea de niños con enfermedad neumocócica invasiva expuestos a antibióticos betalactámicos en comparación con los no expuestos, con una menor tasa de colonización por especies del género *Streptococcus* y una mayor abundancia de bacterias típicas de la cavidad oral [296].

Finalmente, otro factor que podría alterar la composición de la microbiota nasofaríngea bacteriana es la estacionalidad. En una cohorte de 96 pacientes pediátricos se observó que la microbiota nasofaríngea era más rica en bacterias pertenecientes al género Proteobacteria y Fusobacteria durante el otoño y el invierno y, en cambio, presentaba mayor predominancia de bacterias del género Firmicutes y Bacteroides durante la primavera. Además, la colonización nasal por *S.pneumoniae* fue mayor durante los meses fríos y secos [297]. Sin embargo, estos hallazgos no se han confirmado hasta la fecha en población adulta, en la cual la variabilidad estacional es menos pronunciada [269, 298]. Adicionalmente, estos datos no serían generalizables ni aplicables a nivel global, dado que los porcentajes de colonización por neumococo pueden variar en función del área geográfica, especialmente en aquellas regiones donde existe una clara alternancia entre estaciones secas y lluviosas [299-300]. En el segundo estudio de esta tesis existió un mayor reclutamiento de pacientes del grupo que presentó una infección grave por RV/EV durante los meses de invierno; sin embargo, no se obtuvieron diferencias significativas al analizar la composición de la microbiota nasofaríngea bac-

teriana de aquellos pacientes reclutados durante el invierno en comparación con los reclutados en otras estaciones.

Los estudios que conforman esta tesis presentan una serie de limitaciones. Por un lado, el diseño de los trabajos incluidos tan solo permite establecer relaciones de asociación, pero no de causalidad. En este sentido, por ejemplo, y en relación con los resultados comentados del segundo artículo de esta tesis, es difícil determinar si la presencia de una microbiota bacteriana nasofaríngea disbiótica favorece la infección grave por RV/EV o, por el contrario, es la infección por estos virus la que favorece estos cambios en la microbiota que posteriormente conducen a la gravedad del cuadro clínico. En este sentido, se desconoce el mecanismo fisiopatológico que podría explicar que la microbiota nasofaríngea bacteriana promoviera infecciones virales más graves. La hipótesis más plausible existente en la literatura es a través de un mecanismo inmunomodulador. Por ejemplo, existe un modelo de infección por RV/EV que demostró que la incubación de células respiratorias epiteliales con *H.influenzae* incrementaba los niveles de moléculas de adhesión intercelular y la expresión de TLR3 [301]. Otro modelo de infección por VRS en el que también se incubaban células epiteliales con *H.influenzae* no tipable mostró un incremento de los niveles de citocinas proinflamatorias IL-6 e IL-8 [302-303]. Sin embargo, a pesar de que el diseño caso-control del mencionado segundo estudio no ha permitido establecer una secuencia temporal de los hechos, sí que ha sido capaz de establecer una asociación de diferentes perfiles de microbiota bacteriana nasofaríngea con los diferentes cuadros clínicos de la infección por RV/EV en función de su gravedad.

Otra limitación consiste en que, a la hora de interpretar los resultados, hay que tener en consideración que el reducido tamaño muestral puede haber contribuido a una menor potencia estadística, lo que podría haber dificultado la detección de cambios biológicos más sutiles. A pesar de ello, la escasez de estudios previos que evalúen el papel de la co-infección viral en el escenario específico de la infección por RV/EV, así como la relación de la microbiota bacteriana nasofaríngea con las diferentes presentaciones clínicas de dicha infección, pone en valor los resultados de esta tesis a pesar del tamaño muestral.

Por último, la metodología empleada en los estudios que conforman esta tesis para el estudio de las comunidades microbianas de la nasofaringe también puede resultar una limitación. Las técnicas de PCR y la secuenciación del gen ARNr 16S carecen de capacidad para discernir la viabilidad de virus y bacterias detectados, así como tampoco pueden aportar datos directos sobre la funcionalidad de estas comunidades. En este sentido, cada vez es más frecuente el estudio del metatranscriptoma, en combinación con la secuenciación de amplicones o la metagenómica *shotgun* a la que nos referíamos en la introducción. La metatranscriptómica es capaz de analizar la expresión génica de las comunidades microbianas a estudio y además provee información complementaria sobre la función activa de esta comunidad [304], con lo que es probable que en el futuro los estudios sobre la microbiota nasofaríngea utilicen cada vez más esta metodología. Además, la resolución taxonómica a nivel de especie del gen ARNr 16S es baja si se utilizan regiones hipervariables en vez del gen completo, especialmente con tecnologías de secuenciación de lecturas cortas, como por ejemplo MiSeq de Illumina, en las que se secuencian amplicones de las regiones V3-V4 del gen ARNr 16S; dicha tecnología fue, de hecho, la utilizada en el segundo estudio de esta tesis. Sin embargo, se creyó conveniente asignar las secuencias hasta nivel de especie, en tanto que la identificación taxonómica de especie refuerza la relevancia clínica de los estudios de microbiota humana, y por ello se utilizaron programas para la asignación específicamente diseñados para la clasificación de lecturas cortas del gen ARNr 16S, con elevados niveles de identidad o confianza. En este sentido, el desarrollo futuro de las técnicas de metagenómica *shotgun* permitirá mejorar la resolución taxonómica a nivel de especie e incluso de cepa [198].

Sin embargo, a pesar de las limitaciones comentadas, las evidencias aportadas por los estudios incluidos en esta tesis demuestran el potencial papel que la microbiota nasofaríngea ejercería a la hora de modular la gravedad de la infección respiratoria por RV/EV en población pediátrica. Existen pocos grupos que estudien dicha microbiota como factor modulador de la salud respiratoria, y menos aún en el escenario específico de la infección por RV/EV. Se trata de un campo en continua actualización y con múltiples perspectivas de futuro. En este sentido, el desarrollo de técnicas diagnósticas basadas en el análisis de la microbiota nasofaríngea que permitieran diferenciar de

forma precoz aquellos niños con mayor riesgo de presentar una infección grave por RV/EV se antoja como una interesante línea de investigación. De hecho, en el caso de la enfermedad neumocócica invasiva, un estudio realizado por nuestro grupo demostró la capacidad de la microbiota nasofaríngea para discernir entre aquellos pacientes con infección bacteriana potencialmente grave de aquellos pacientes con infección viral en el tracto respiratorio autolimitada y leve [178].

No obstante, la aplicabilidad de este tipo de estudios en la práctica clínica diaria es aún hoy día complicada. Los estudios de microbiota nasofaríngea basados en tecnologías de secuenciación masiva presentan un elevado coste y precisan grandes requerimientos computacionales, con una preparación de librerías laboriosa y lenta. Sin embargo, en los últimos años la aparición de tecnología de secuenciación en tiempo (*Oxford Nanopore Technologies* (MinION-Nanopore)) real ha resuelto algunos de estos inconvenientes, al tratarse de una alternativa menos laboriosa, más rápida y coste-efectiva [207, 305], lo que podría mejorar la viabilidad de los estudios de microbiota nasofaríngea para su uso clínico. De hecho, existen ya algunos estudios que han evaluado la implementación de esta tecnología para el diagnóstico etiológico temprano y la detección de resistencias en la práctica clínica en casos aislados [306-310].

Además de las dificultades técnicas, otros problemas que complican la aplicación clínica de estos estudios radican en la no existencia de una composición taxonómica claramente establecida en individuos sanos, lo que implica que la identificación de biomarcadores se base en una comparación de poblaciones de casos frente a controles sanos [311]. Así mismo, los cambios taxonómicos en individuos con una misma enfermedad no son totalmente consistentes, como consecuencia de diferencias en procesamiento de las muestras, extracción, secuenciación, análisis de datos, poblaciones a estudio, o factores de confusión comentados como la exposición a antibióticos [162, 312-313]. Por todas estas razones, el principal desafío asociado al diagnóstico basado en la microbiota radica en la validación, lo que implica que es necesario acumular el mayor número de datos posible para poder definir los perfiles de microbiota respiratoria asociados a estados de salud y enfermedad.

Otro campo de investigación futura radica en el diseño de terapias destinadas a la modulación de la composición de la microbiota nasofaríngea, con el objetivo de enriquecer dicha microbiota en bacterias saludables que pudieran prevenir la infección grave por RV/EV. En este sentido, existe evidencia en la literatura acerca de la utilidad de los probióticos en las infecciones respiratorias [314-315]. Los probióticos se definen como aquellos microorganismos vivos que consumidos en cantidades adecuadas ejercen efectos beneficiosos sobre el huésped que los consume [316]. Estas sustancias han demostrado capacidad para reducir el número y duración de episodios de infección respiratoria del tracto respiratorio superior [317], mejoran el curso clínico de la neumonía [318], y también podrían tener un papel protector en la neumonía asociada a ventilación mecánica [319]. Sin embargo, la mayoría de probióticos comercializados hasta la fecha y empleados en la práctica clínica basan su composición en especies que forman parte de la microbiota intestinal, como *Lactobacillus* o *Bifidobacterium* [320], y su efecto sobre la microbiota respiratoria podría ser diferente. En este sentido, se podrían diseñar probióticos ricos en bacterias con un potencial efecto beneficioso más directo sobre la microbiota nasofaríngea, como por ejemplo los que se han descrito en los estudios incluidos en esta tesis (*D.pigrum* o algunas especies de *Corynebacterium*). Los efectos beneficiosos de estas especies en la modulación del sistema inmune y la resistencia frente a patógenos ya se han demostrado en modelos de ratones in vivo [274-275], aunque es posible que no todas las cepas de estas bacterias puedan presentar este efecto protector, como señalan otros autores [271, 321-322], por lo que es preciso continuar con la investigación y caracterización de microorganismos que pudieran representar una nueva generación de probióticos.

6. CONCLUSIONES

1. Los RV/EV en mono-infección pueden constituir el agente etiológico de ITRI grave en el paciente pediátrico, especialmente en niños de menor edad.
2. La co-infección con otros virus respiratorios no resulta un factor determinante para conferir gravedad a las ITRI por RV/EV.
3. Las especies de RV/EV no mostraron diferencias en su capacidad de causar cuadros clínicos más graves.
4. Se han identificado perfiles de microbiota nasofaríngea bacteriana relacionados con salud respiratoria. Estos perfiles son ricos en bacterias pertenecientes al género *Dolosigranulum* y *Corynebacterium*, entre los que existe una correlación positiva.
5. Existen diferentes perfiles de microbiota nasofaríngea bacteriana en función de la presentación clínica de la infección por RV/EV:
 - 5.1 Los niños sanos sin detección de RV/EV presentaron una microbiota rica y diversa, con abundancia del género *Dolosigranulum* y *Corynebacterium*.
 - 5.2 Los niños con ITRS por RV/EV presentaron un perfil de microbiota nasofaríngea bacteriana intermedio, traduciendo que no se ha producido una disbiosis completa de la microbiota, conservando la presencia de bacterias beneficiosas del género *Dolosigranulum* así como niveles intermedios de riqueza y diversidad.
 - 5.3 Los niños con ITRI grave por RV/EV presentan una microbiota menos rica y diversa, con un predominio de bacterias del género *Haemophilus*, y pérdida de géneros relacionados con salud respiratoria.

7. REFERENCIAS

- [1] Royston L, Tapparel C. Rhinoviruses and Respiratory Enteroviruses: Not as Simple as ABC. *Viruses*. 2016 Jan;8(1):16. Disponible en doi: 10.3390/v8010016.
- [2] Gern JE. The ABCs of rhinoviruses, wheezing, and asthma. *J. Virol.* 2010 Aug; 84(15): 7418–7426. Disponible en doi: 10.1128/JVI.02290-09.
- [3] Bizot E, Bousquet A, Charpié M, Coquelin F, Lefevre S, Le Lorier J, et al. Rhinovirus: A Narrative Review on Its Genetic Characteristics, Pediatric Clinical Presentations, and Pathogenesis. *Front Pediatr.* 2021 Mar; 22:9:643219. Disponible en doi: 10.3389/fped.2021.643219.
- [4] Vandini S, Biagi C, Fischer M, Lanari M. Impact of Rhinovirus Infections in Children. *Viruses*. 2019 Jun;11(6):521. Disponible en doi: 10.3390/v11060521.
- [5] Fendrick, A.M.; Monto, A.S.; Nightengale, B.; Sarnes, M. The economic burden of non-influenza-related viral respiratory tract infection in the United States. *Arch. Intern. Med.* 2003 Feb; 163(4):487–94. Disponible en doi: 10.1001/archinte.163.4.487.
- [6] International Committee on Taxonomy of Viruses. Disponible online: <https://talk.ictvonline.org/taxonomy/> [Citado el 16 de marzo de 2022].
- [7] Palmenberg AC, Spiro D, Kuzmickas R, Wang S, Djikeng A, Rathe JA, et al. Sequencing and analyses of all known human rhinovirus genomes reveal structure and evolution. *Science*. 2009 Apr; 324(5923):55–9. Disponible en doi: 10.1126/science.1165557.
- [8] To KKW, Yip CCY, Yuen KY. Rhinovirus—From bench to bedside. *J. Formos. Med. Assoc.* 2017 Jul; 116(7), 496–504. Disponible en doi: 10.1016/j.jfma.2017.04.009.
- [9] McLean GR, Walton RP, Shetty S, Peel TJ, Paktiawal N, Keadze T, et al. Rhinovirus infections and immunisation induce cross-serotype reactive antibodies to

- VP1. *Antivir. Res.* 2012 Sep;95(3): 193–201. Disponible en doi: 10.1016/j.antiviral.2012.06.006.
- [10] Mosser AG, Vrtis R, Burchell L, Lee WM, Dick CR, Weisshaar E, et al. Quantitative and qualitative analysis of rhinovirus infection in bronchial tissues. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2005 Mar;171(6):645–51. Disponible en doi: 10.1164/rccm.200407-970OC.
- [11] Papadopoulos NG, Bates PJ, Bardin PG, Papi A, Leir SH, Fraenkel DJ, et al. Rhinoviruses infect the lower airways. *J. Infect. Dis.* 2000 Jun;181(6):1875–84. Disponible en doi: 10.1086/315513.
- [12] Renwick N, Schweiger B, Kapoor V, Liu Z, Villari J, Bullmann R, et al. A recently identified rhinovirus genotype is associated with severe respiratory-tract infection in children in Germany. *J. Infect. Dis.* 2007 Dec;196(12):1754–60. Disponible en doi: 10.1086/524312.
- [13] Hicks LA, Shepard CW, Britz PH, Erdman DD, Fischer M, Flannery BL, et al. Two outbreaks of severe respiratory disease in nursing homes associated with rhinovirus. *J. Am. Geriatr. Soc.* 2006 Feb;54(2):284–9. Disponible en doi: 10.1111/j.1532-5415.2005.00529.x.
- [14] Pitkäranta A, Arruda E, Malmberg H, Hayden FG. Detection of rhinovirus in sinus brushings of patients with acute community-acquired sinusitis by reverse transcription-PCR. *J Clin Microbiol.* 1997 Jul;35(7):1791–3. Disponible en doi: 10.1128/jcm.35.7.1791-1793.1997.
- [15] Chantzi FM, Papadopoulos NG, Bairamis T, Tsiakou M, Bournousouzis N, Constantopoulos AG, et al. Human rhinoviruses in otitis media with effusion. *Pediatric Allergy Immunol.* 2006 Nov;17(7):514–8. Disponible en doi:10.1111/j.13993038.2006.00448.x.
- [16] Esposito S, Daleno C, Scala A, Castellazzi L, Terranova L, Sferrazza Papa S, et al. Impact of rhinovirus nasopharyngeal viral load and viremia on severity of respiratory infections in children. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2014 Jan;33(1):41–8. Disponible en doi: 10.1007/s10096-013-1926-5.

- [17] Lupo J, Schuffenecker I, Morel-Baccard C, Bardet J, Payen V, Kaiser L, et al. Disseminated rhinovirus C8 infection with infectious virus in blood and fatal outcome in a child with repeated episodes of bronchiolitis. *J Clin Microbiol.* 2015 May;53(5):1775-7. Disponible en doi: 10.1128/JCM.03484-14.
- [18] Harvala H, McIntyre CL, McLeish NJ, Kondracka J, Palmer J, Molyneaux P, et al. High detection frequency and viral loads of human rhinovirus species A to C in fecal samples; diagnostic and clinical implications. *J Med Virol.* 2012 Mar;84(3):536-42. Disponible en doi: 10.1002/jmv.23203.
- [19] FuchsR, BlaasD. Uncoating of human rhinoviruses. *Rev. Med. Virol.* 2010 sep;20(5): 281–97. Disponible en doi: 10.1002/rmv.654.
- [20] Belov GA. Modulation of lipid synthesis and trafficking pathways by picornaviruses. *Curr Opin Virol.* 2014 Dec;9:19-23. Disponible en doi: 10.1016/j.coviro.2014.08.007.
- [21] van der Linden L, Wolthers KC, van Kuppeveld FJ. Replication and Inhibitors of Enteroviruses and Parechoviruses. *Viruses.* 2015 Aug;7(8):4529-62. Disponible en doi: 10.3390/v7082832.
- [22] Papi A, Johnston SL. Rhinovirus infection induces expression of its own receptor intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) via increased NF-kappaB-mediated transcription. *J Biol Chem.* 1999 Apr;274(14):9707-20. Disponible en doi: 10.1074/jbc.274.14.9707.
- [23] Basnet S, Palmenberg AC, Gern JE. Rhinoviruses and Their Receptors. *Chest.* 2019 May;155(5):1018-25. Disponible en doi: 10.1016/j.chest.2018.12.012.
- [24] Winther B, Gwaltney JM, Hendley JO. Respiratory virus infection of monolayer cultures of human nasal epithelial cells. *Am Rev Respir Dis.* 1990 Apr;141:839-45. Disponible en doi: 10.1164/ajrccm/141.4_Pt_1.839.
- [25] Unger BL, Ganesan S, Comstock AT, Faris AN, Hershenson MB, Sajjan US. Nod-like receptor X-1 is required for rhinovirus-induced barrier dysfunction in airway

- epithelial cells. *J Virol*. 2014 Apr;88(7):3705-18. Disponible en doi: 10.1128/JVI.03039-13.
- [26] Korpi-Steiner NL, Bates ME, Lee WM, Hall DJ, Bertics PJ. Human rhinovirus induces robust IP-10 release by monocytic cells, which is independent of viral replication but linked to type I interferon receptor ligation and STAT1 activation. *J Leukoc Biol*. 2006 Dec;80(6):1364-74. Disponible en doi: 10.1189/jlb.0606412.
- [27] Alexopoulou L, Holt AC, Medzhitov R, Flavell RA. Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3. *Nature*. 2001 Oct;413(6857):732-8. Disponible en doi: 10.1038/35099560.
- [28] Van Cauwenberge PB, van Kempen MJ, Bachert C. The common cold at the turn of the millennium. *Am J Rhinol*. 2000 Sep-Oct;14(5):339-43. Disponible en doi: 10.2500/105065800781329555.
- [29] Palmenberg AC, Rathe JA, Liggett SB. Analysis of the complete genome sequences of human rhinovirus. *J Allergy Clin Immunol*. 2010 Jun;125(6):1190-9. Disponible en doi: 10.1016/j.jaci.2010.04.010.
- [30] L'Huillier AG, Tapparel C, Turin L, Boquete-Suter P, Thomas Y, Kaiser L. Survival of rhinoviruses on human fingers. *Clin Microbiol Infect*. 2015 Apr;21(4):381-5. Disponible en doi: 10.1016/j.cmi.2014.12.002.
- [31] Dick EC, Jennings LC, Mink KA, Wartgow CD, Inhorn SL. Aerosol transmission of rhinovirus colds. *J Infect Dis*. 1987 Sep;156(3):442-8. Disponible en doi: 10.1093/infdis/156.3.442.
- [32] Andrup L, Krogfelt KA, Hansen KS, Madsen AM. Transmission route of rhinovirus -the causative agent for common cold. A systematic review. *Am J Infect Control*. 2022 Dec 17:S0196-6553(22)00866-5. Disponible en doi: 10.1016/j.ajic.2022.12.005.

- [33] Monto AS. The seasonality of rhinovirus infections and its implications for clinical recognition. *Clin Ther.* 2002 Dec;24(12):1987-97. Disponible en doi: 10.1016/s0149-2918(02)80093-5.
- [34] Winther B, Hayden FG, Hendley JO. Picornavirus infections in children diagnosed by RT-PCR during longitudinal surveillance with weekly sampling: Association with symptomatic illness and effect of season. *J Med Virol.* 2006 May;78(5):644-50. Disponible en doi: 10.1002/jmv.20588.
- [35] Linder JE, Kraft DC, Mohamed Y, Lu Z, Heil L, Tollefson S, et al. Human rhinovirus C: Age, season, and lower respiratory illness over the past 3 decades. *J Allergy Clin Immunol.* 2013 Jan;131(1):69-77.e1-6. Disponible en doi: 10.1016/j.jaci.2012.09.033.
- [36] Reese SM, Thompson M, Price CS, Young HL. Evidence of nosocomial transmission of human rhinovirus in a neonatal intensive care unit. *Am J Infect Control.* 2016 Mar;44(3):355-7. Disponible en doi: 10.1016/j.ajic.2015.10.018.
- [37] Turner RB. Epidemiology, pathogenesis, and treatment of the common cold. *Ann Allergy Asthma Immunol.* 1997 Jun;78(6):531-9. Disponible en doi: 10.1016/S1081-1206(10)63213-9.
- [38] Rocafort M, Henares D, Brotons P, Barrabeig I, Launes C, Merdrignac L, et al. Exploring the nasopharyngeal microbiota composition in infants with whooping cough: A test-negative case-control study. *PLoS One.* 2021 Oct 29;16(10):e0259318. Disponible en doi: 10.1371/journal.pone.0259318.
- [39] van der Zalm MM, van Ewijk BE, Wilbrink B, Uiterwaal CS, Wolfs TF, van der Ent CK. Respiratory pathogens in children with and without respiratory symptoms. *J Pediatr.* 2009 Mar;154(3):396-400, 400.e1. Disponible en doi: 10.1016/j.jpeds.2008.08.036.
- [40] Mäkelä MJ, Puhakka T, Ruuskanen O, Leinonen M, Saikku P, Kimpimäki M, et al. Viruses and bacteria in the etiology of the common cold. *J Clin Microbiol.* 1998 Feb;36(2):539-42. Disponible en doi: 10.1128/JCM.36.2.539-542.1998.

- [41] Lessler J, Reich NG, Brookmeyer R, Perl TM, Nelson KE, Cummings DA. Incubation periods of acute respiratory viral infections: a systematic review. *Lancet Infect Dis*. 2009 May;9(5):291-300. Disponible en doi: 10.1016/S1473-3099(09)70069-6.
- [42] Pappas DE, Hendley JO, Hayden FG, Winther B. Symptom profile of common colds in school-aged children. *Pediatr Infect Dis J*. 2008 Jan;27(1):8-11. Disponible en doi: 10.1097/INF.0b013e31814847d9.
- [43] Gwaltney JM. Clinical significance and pathogenesis of viral respiratory infections. *Am J Med*. 2002 Apr 22;112 Suppl 6A:13S-18S. Disponible en doi: 10.1016/s0002-9343(01)01059-2.
- [44] Hellgren J, Cervin A, Nordling S, Bergman A, Cardell LO. Allergic rhinitis and the common cold--high cost to society. *Allergy*. 2010 Jun 1;65(6):776-83. Disponible en doi: 10.1111/j.1398-9995.2009.02269.x.
- [45] Nokso-Koivisto J, Marom T, Chonmaitree T. Importance of viruses in acute otitis media. *Curr Opin Pediatr*. 2015 Feb;27(1):110-5. Disponible en doi: 10.1097/MOP.0000000000000184.
- [46] Chonmaitree T, Alvarez-Fernandez P, Jennings K, Trujillo R, Marom T, Loeffelholz MJ, et al. Symptomatic and asymptomatic respiratory viral infections in the first year of life: association with acute otitis media development. *Clin Infect Dis*. 2015 Jan 1;60(1):1-9. Disponible en doi: 10.1093/cid/ciu714.
- [47] Meissner HC. Viral Bronchiolitis in Children. *N Engl J Med*. 2016 Jan 7;374(1):62-72. Disponible en doi: 10.1056/NEJMra1413456.
- [48] Jartti T, Smits HH, Bønnelykke K, Bircan O, Elenius V, Konradsen JR, et al. Bronchiolitis needs a revisit: Distinguishing between virus entities and their treatments. *Allergy*. 2019 Jan;74(1):40-52. Disponible en doi: 10.1111/all.13624.
- [49] Jartti T, Aakula M, Mansbach JM, Piedra PA, Bergroth E, Koponen P, et al. Hospital length-of-stay is associated with rhinovirus etiology of bronchiolitis. *Pedi-*

atr Infect Dis J. 2014 Aug;33(8):829-34. Disponible en doi: 10.1097/INF.0000000000000313.

- [50] Richard N, Komurian-Pradel F, Javouhey E, Perret M, Rajoharison A, Bagnaud A, et al. The impact of dual viral infection in infants admitted to a pediatric intensive care unit associated with severe bronchiolitis. *Pediatr Infect Dis J.* 2008 Mar;27(3):213-7. Disponible en doi: 10.1097/INF.0b013e31815b4935.
- [51] Nicolai A, Frassanito A, Nenna R, Cangiano G, Petrarca L, Papoff P, et al. Risk Factors for Virus-induced Acute Respiratory Tract Infections in Children Younger Than 3 Years and Recurrent Wheezing at 36 Months Follow-Up After Discharge. *Pediatr Infect Dis J.* 2017 Feb;36(2):179-183. Disponible en doi: 10.1097/INF.0000000000001385.
- [52] Turunen R, Koistinen A, Vuorinen T, Arku B, Söderlund-Venermo M, Ruuskanen O, et al. The first wheezing episode: respiratory virus etiology, atopic characteristics, and illness severity. *Pediatr Allergy Immunol.* 2014 Dec;25(8):796-803. Disponible en doi: 10.1111/pai.12318.
- [53] Jartti T, Gern JE. Role of viral infections in the development and exacerbation of asthma in children. *J Allergy Clin Immunol.* 2017 Oct;140(4):895-906. Disponible en doi: 10.1016/j.jaci.2017.08.003.
- [54] Jartti T, Lehtinen P, Vuorinen T, Ruuskanen O. Bronchiolitis: age and previous wheezing episodes are linked to viral etiology and atopic characteristics. *Pediatr Infect Dis J.* 2009 Apr;28(4):311-7. Disponible en doi: 10.1097/INF.0b013e31818ee0c1.
- [55] Jain S, Self WH, Wunderink RG, Fakhran S, Balk R, Bramley AM, et al. Community-Acquired Pneumonia Requiring Hospitalization among U.S. Adults. *N Engl J Med.* 2015 Jul 30;373(5):415-27. Disponible en doi: 10.1056/NEJMoa1500245.
- [56] Esposito S, Daleno C, Tagliabue C, Scala A, Tenconi R, Borzani I, et al. Impact of rhinoviruses on pediatric community-acquired pneumonia. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2012 Jul;31(7):1637-45. Disponible en doi:10.1007/s10096-011-1487-4.

- [57] Cox DW, Le Souëf PN. Rhinovirus and the developing lung. *Paediatr Respir Rev*. 2014 Sep;15(3):268-74. Disponible en doi:10.1016/j.prrv.2014.03.002.]
- [58] Merckx J, Ducharme FM, Martineau C, Zemek R, Gravel J, Chalut D, et al. Pediatric Emergency Research Canada (PERC) DOORWAY team. Respiratory Viruses and Treatment Failure in Children With Asthma Exacerbation. *Pediatrics*. 2018 Jul;142(1):e20174105. Disponible en doi:10.1542/peds.2017-4105.
- [59] Johnston SL, Pattemore PK, Sanderson G, Smith S, Campbell MJ, Josephs LK, et al. The relationship between upper respiratory infections and hospital admissions for asthma: a time-trend analysis. *Am J Respir Crit Care Med*. 1996 Sep;154(3 Pt 1):654-60. Disponible en doi:10.1164/ajrccm.154.3.8810601.
- [60] Lemanske RF Jr. The childhood origins of asthma (COAST) study. *Pediatr Allergy Immunol*. 2002;13(s15):38-43. Disponible en doi:10.1034/j.1399-3038.13.s.15.8.x.
- [61] Hyvärinen MK, Kotaniemi-Syrjänen A, Reijonen TM, Korhonen K, Korppi MO. Teenage asthma after severe early childhood wheezing: an 11-year prospective follow-up. *Pediatr Pulmonol*. 2005 Oct;40(4):316-23. Disponible en doi:10.1002/ppul.20273.
- [62] Harvala H, McIntyre CL, McLeish NJ, Kondracka J, Palmer J, Molyneaux P, et al. High detection frequency and viral loads of human rhinovirus species A to C in fecal samples; diagnostic and clinical implications. *J Med Virol*. 2012 Mar;84(3):536-42. Disponible en doi:10.1002/jmv.23203.
- [63] Lupo J, Schuffenecker I, Morel-Baccard C, Bardet J, Payen V, Kaiser L, Constant S, et al. Disseminated rhinovirus C8 infection with infectious virus in blood and fatal outcome in a child with repeated episodes of bronchiolitis. *J Clin Microbiol*. 2015 May;53(5):1775-7. Disponible en doi:10.1128/JCM.03484-14.
- [64] Pfeiffer HC, Bragstad K, Skram MK, Dahl H, Knudsen PK, Chawla MS, et al. Two cases of acute severe flaccid myelitis associated with enterovirus D68 infection in children, Norway, autumn 2014. *Euro Surveill*. 2015 Mar 12;20(10):21062. Disponible en doi:10.2807/1560-7917.es2015.20.10.21062.

- [65] Kreuter JD, Barnes A, McCarthy JE, Schwartzman JD, Oberste MS, Rhodes CH, et al. A fatal central nervous system enterovirus 68 infection. *Arch Pathol Lab Med.* 2011 Jun;135(6):793-6. Disponible en doi:10.5858/2010-0174-CR.1.
- [66] González-Sanz R, Casas-Alba D, Launes C, Muñoz-Almagro C, Ruiz-García MM, Alonso M, et al. Molecular epidemiology of an enterovirus A71 outbreak associated with severe neurological disease, Spain, 2016. *Euro Surveill.* 2019 Feb;24(7):1800089. Disponible en doi:10.2807/1560-7917.ES.2019.24.7.1800089.
- [67] Blaschke AJ, Korgenski EK, Wilkes J, Presson AP, Thorell EA, Pavia AT, et al. Rhinovirus in Febrile Infants and Risk of Bacterial Infection. *Pediatrics.* 2018 Feb;141(2):e20172384. Disponible en doi: 10.1542/peds.2017-2384.
- [68] Lieberman D, Lieberman D, Shimoni A, Keren-Naus A, Steinberg R, Shemer-Avni Y. Identification of respiratory viruses in adults: nasopharyngeal versus oropharyngeal sampling. *J Clin Microbiol.* 2009 Nov;47(11):3439-43. Disponible en doi: 10.1128/JCM.00886-09.
- [69] Koenig-Zores C, Stoll-Keller F, Ammouche C, Donato L. Does the nasopharyngeal samples virological analysis reflect the lower respiratory tract infection in children population? A PCR multiplex study. *Rev Fr Allergol.* 2013 Mar;53(2):59-64. Disponible en doi: 10.1016/j.reval.2012.11.007.
- [70] Gilbert LL, Dakhama A, Bone BM, Thomas EE, Hegele RG. Diagnosis of viral respiratory tract infections in children by using a reverse transcription-PCR panel. *J Clin Microbiol.* 1996 Jan;34(1):140-3. Disponible en doi:10.1128/JCM.34.1.140-143.1996.
- [71] Bard JD, McElvania E. Panels and Syndromic Testing in Clinical Microbiology. *Clin Lab Med.* 2020 Dec;40(4):393-420. Disponible en: doi:10.1016/J.CLL.2020.08.001.
- [72] Casas I, Pozo F, Trallero G, Echevarría JM, Tenorio A. Viral diagnosis of neurological infection by RT multiplex PCR: a search for entero- and herpesviruses in

- a prospective study. *J Med Virol.* 1999 Feb;57(2):145-51. Disponible en doi: 10.1002/(sici)1096 9071(199902)57:2<145::aid-jmv10>3.0.co;2-n.
- [73] Basnet S, Palmenberg AC, Gern JE. Rhinoviruses and Their Receptors. *Chest.* 2019 May;155(5):1018-1025. Disponible en doi: 10.1016/j.chest.2018.12.012.
- [74] White DO, Fenner FJ. Medical virology. 1994. Academic Press, San Diego, CA.
- [75] Hayden FG, Hippskind GJ, Woerner DH, Eisen GF, Janssens M, Janssen PA, et al. Intranasal pirodavir (R77,975) treatment of rhinovirus colds. *Antimicrob Agents Chemother.* 1995 Feb;39(2):290-4. Disponible en doi: 10.1128/AAC.39.2.290.
- [76] Hayden FG, Herrington DT, Coats TL, Kim K, Cooper EC, Villano SA, et al. Efficacy and safety of oral pleconaril for treatment of colds due to picornaviruses in adults: results of 2 double-blind, randomized, placebo-controlled trials. *Clin Infect Dis.* 2003 Jun 15;36(12):1523-32. Disponible en doi: 10.1086/375069.
- [77] Pevear DC, Hayden FG, Demenczuk TM, Barone LR, McKinlay MA, Collett MS. Relationship of pleconaril susceptibility and clinical outcomes in treatment of common colds caused by rhinoviruses. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005 Nov;49(11):4492-9. Disponible en doi: 10.1128/AAC.49.11.4492-4499.2005.
- [78] Coultas JA, Cafferkey J, Mallia P, Johnston SL. Experimental Antiviral Therapeutic Studies for Human Rhinovirus Infections. *J Exp Pharmacol.* 2021 Jul 9;13:645-659. Disponible en doi: 10.2147/JEP.S255211.
- [79] Kawatkar SP, Gagnon M, Hoesch V, Tiong-Yip C, Johnson K, Ek M, et al. Design and structure-activity relationships of novel inhibitors of human rhinovirus 3C protease. *Bioorg Med Chem Lett.* 2016 Jul 15;26(14):3248-52. Disponible en doi:10.1016/j.bmcl.2016.05.066.
- [80] Mello C, Aguayo E, Rodriguez M, Lee G, Jordan R, Cihlar T, et al. Multiple classes of antiviral agents exhibit in vitro activity against human rhinovirus type C. *Antimicrob Agents Chemother.* 2014;58(3):1546-55. Disponible en doi: 10.1128/AAC.01746-13.

- [81] Turner RB, Wecker MT, Pohl G, Witek TJ, McNally E, George R, et al. Efficacy of tremacamra, a soluble intercellular adhesion molecule 1, for experimental rhinovirus infection: a randomized clinical trial. *JAMA*. 1999;281(19):1797–1804. Disponible en doi:10.1001/jama.281.19.179775
- [82] Traub S, Nikonova A, Carruthers A, Dunmore R, Vousden KA, Gogsadze L, et al. An anti-human ICAM-1 antibody inhibits rhinovirus-induced exacerbations of lung inflammation. *PLoS Pathog*. 2013;9(8):e1003520. Disponible en doi: 10.1371/journal.ppat.1003520.
- [83] Hayward G, Thompson MJ, Perera R, Del Mar CB, Glasziou PP, Heneghan CJ. Corticosteroids for the common cold. *Cochrane Database Syst Rev*. 2015 Oct 13;2015(10):CD008116. Disponible en doi: 10.1002/14651858.CD008116.pub3.
- [84] Lehtinen P, Ruohola A, Vanto T, Vuorinen T, Ruuskanen O, Jartti T. Prednisolone reduces recurrent wheezing after a first wheezing episode associated with rhinovirus infection or eczema. *J Allergy Clin Immunol*. 2007 Mar;119(3):570-5. Disponible en doi: 10.1016/j.jaci.2006.11.003.
- [85] Gibson PG, Yang IA, Upham JW, Reynolds PN, Hodge S, James AL, et al. Effect of azithromycin on asthma exacerbations and quality of life in adults with persistent uncontrolled asthma (AMAZES): a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet*. 2017 Aug 12;390(10095):659-68. Disponible en doi: 10.1016/S0140-6736(17)31281-3.
- [86] Jolliffe DA, Camargo CA Jr, Sluyter JD, Aglipay M, Aloia JF, Ganmaa D, et al. Vitamin D supplementation to prevent acute respiratory infections: a systematic review and meta-analysis of aggregate data from randomised controlled trials. *Lancet Diabetes Endocrinol*. 2021 May;9(5):276-292. Disponible en doi: 10.1016/S2213-8587(21)00051-6.
- [87] Djukanović R, Harrison T, Johnston SL, Gabbay F, Wark P, Thomson NC, et al. The effect of inhaled IFN- β on worsening of asthma symptoms caused by viral infections. A randomized trial. *Am J Respir Crit Care Med*. 2014 Jul;190(2):145-54. Disponible en doi: 10.1164/rccm.201312-2235OC.

- [88] Stobart CC, Nosek JM, Moore ML. Rhinovirus Biology, Antigenic Diversity, and Advancements in the Design of a Human Rhinovirus Vaccine. *Front Microbiol.* 2017 Dec 5;8:2412. Disponible en doi: 10.3389/fmicb.2017.02412.
- [89] Glanville N, McLean GR, Guy B, Lecouturier V, Berry C, Girerd Y, et al. Cross-serotype immunity induced by immunization with a conserved rhinovirus capsid protein. *PLoS Pathog.* 2013;9(9):e1003669. Disponible en doi: 10.1371/journal.ppat.1003669.
- [90] Chaudhary N, Weissman D, Whitehead KA. mRNA vaccines for infectious diseases: principles, delivery and clinical translation. *Nat Rev Drug Discov.* 2021 Nov;20(11):817-838. Disponible en doi: 10.1038/s41573-021-00283-5.
- [91] Hammitt LL, Dagan R, Yuan Y, Baca Cots M, Bosheva M, Madhi SA, et al. Nirsevimab for Prevention of RSV in Healthy Late-Preterm and Term Infants. *N Engl J Med.* 2022 Mar 3;386(9):837-846. Disponible en doi: 10.1056/NEJMoa2110275.
- [92] Golke P, Hönemann M, Bergs S, Liebert UG. Human Rhinoviruses in Adult Patients in a Tertiary Care Hospital in Germany: Molecular Epidemiology and Clinical Significance. *Viruses.* 2021 Oct 8;13(10):2027. Disponible en doi: 10.3390/v13102027.
- [93] Li W, Yu B, Zhou J, Wang Y, Xue B, Pan J, et al. Genetic diversity and epidemiology of human rhinovirus among children with severe acute respiratory tract infection in Guangzhou, China. *Virol J.* 2021 Aug 23;18(1):174. Disponible en doi: 10.1186/s12985-021-01645-6.
- [94] Lee WM, Lemanske RF Jr, Evans MD, Vang F, Pappas T, Gangnon R, et al. Human rhinovirus species and season of infection determine illness severity. *Am J Respir Crit Care Med.* 2012 Nov 1;186(9):886-91. Disponible en doi: 10.1164/rccm.201202-0330OC.
- [95] Han TH, Chung JY, Hwang ES, Koo JW. Detection of human rhinovirus C in children with acute lower respiratory tract infections in South Korea. *Arch Virol.* 2009;154(6):987-91. Disponible en doi: 10.1007/s00705-009-0383-z.

- [96] Piotrowska Z, Vázquez M, Shapiro ED, Weibel C, Ferguson D, Landry ML, et al. Rhinoviruses are a major cause of wheezing and hospitalization in children less than 2 years of age. *Pediatr Infect Dis J*. 2009 Jan;28(1):25-9. Disponible en doi: 10.1097/INF.0b013e3181861da0.
- [97] Iwane MK, Prill MM, Lu X, Miller EK, Edwards KM, Hall CB, et al. Human rhinovirus species associated with hospitalizations for acute respiratory illness in young US children. *J Infect Dis*. 2011 Dec 1;204(11):1702-10. Disponible en doi: 10.1093/infdis/jir634.
- [98] Miller EK, Williams JV, Gebretsadik T, Carroll KN, Dupont WD, Mohamed YA, et al. Host and viral factors associated with severity of human rhinovirus-associated infant respiratory tract illness. *J Allergy Clin Immunol*. 2011 Apr;127(4):883-91. Disponible en doi: 10.1016/j.jaci.2010.11.041.
- [99] Ma X, Conrad T, Alchikh M, Reiche J, Schweiger B, Rath B. Can we distinguish respiratory viral infections based on clinical features? A prospective pediatric cohort compared to systematic literature review. *Rev Med Virol*. 2018 Sep;28(5):e1997. Disponible en doi: 10.1002/rmv.1997.
- [100] CDC Report: Enterovirus D68 in the United States. 2014. Disponible online: <http://www.Cdc.Gov/non-polio-enterovirs/about/ev-d68.Html> (Consultado el 16 abril 2022).
- [101] Van Leer-Buter CC, Poelman R, Borger R, Niesters HG. Newly Identified Enterovirus C Genotypes, Identified in the Netherlands through Routine Sequencing of All Enteroviruses Detected in Clinical Materials from 2008 to 2015. *J Clin Microbiol*. 2016 Sep;54(9):2306-14. Disponible en doi: 10.1128/JCM.00207-16.
- [102] Merovitz L, Demers AM, Newby D, McDonald J. Enterovirus 71 infections at a Canadian center. *Pediatr Infect Dis J*. 2000 Aug;19(8):755-7. Disponible en doi: 10.1097/00006454-200008000-00017.
- [103] Granados A, Goodall EC, Luinstra K, Smieja M, Mahony J. Comparison of Asymptomatic and Symptomatic Rhinovirus Infections in University Students: Inci-

- dence, Species Diversity, and Viral Load. *Diagn. Microbiol Infect Dis*. 2015 Aug;82(4):292–6. Disponible en doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2015.05.001.
- [104] Tomlinson RH, Harrison LG, Meals EA, DeVincenzo JP. Do asymptomatic respiratory viral infections occur? *J Clin Virol*. 2018 May;102:93-94. Disponible en doi: 10.1016/j.jcv.2018.03.002.
- [105] Xiao Q, Zheng S, Zhou L, Ren L, Xie X, Deng Y, Tian D, Zhao Y, Fu Z, Li T, Huang A, Liu E. Impact of Human Rhinovirus Types and Viral Load on the Severity of Illness in Hospitalized Children With Lower Respiratory Tract Infections. *Pediatr Infect Dis J*. 2015 Nov;34(11):1187-92. Disponible en doi: 10.1097/INF.0000000000000879.
- [106] Ahn JG, Kim DS, Kim KH. Clinical characteristics and cytokine profiles of children with acute lower respiratory tract infections caused by human rhinovirus. *PLoS One*. 2018 Jul 3;13(7):e0198624. Disponible en doi: 10.1371/journal.pone.0198624.
- [107] Busse WW, Lemanske RF Jr, Gern JE. Role of viral respiratory infections in asthma and asthma exacerbations. *Lancet*. 2010 Sep 4;376(9743):826-34. Disponible en doi: 10.1016/S0140-6736(10)61380-3.
- [108] Tovey ER, Rawlinson WD. A modern miasma hypothesis and back-to-school asthma exacerbations. *Med Hypotheses*. 2011 Jan;76(1):113-6. Disponible en doi: 10.1016/j.mehy.2010.08.045.
- [109] Satia I, Adatia A, Yaqoob S, Greene JM, O'Byrne PM, Killian KJ, et al. Emergency department visits and hospitalisations for asthma, COPD and respiratory tract infections: what is the role of respiratory viruses, and return to school in September, January and March? *ERJ Open Res*. 2020 Nov 2;6(4):00593-2020. Disponible en doi: 10.1183/23120541.00593-2020.
- [110] Baillie VL, Moore DP, Mathunjwa A, Morailane P, Simões EAF, Madhi SA. Molecular Subtyping of Human Rhinovirus in Children from Three Sub-Saharan African Countries. *J Clin Microbiol*. 2019 Aug 26;57(9):e00723-19. Disponible en doi: 10.1128/JCM.00723-19.

- [111] Arden KE, Greer RM, Wang CYT, Mackay IM. Genotypic diversity, circulation patterns and co-detections among rhinoviruses in Queensland, 2001. *Access Microbiol.* 2019 Nov 4;2(1):acmi000075. Disponible en doi: 10.1099/acmi.0.000075.
- [112] Zlateva KT, de Vries JJ, Coenjaerts FE, van Loon AM, Verheij T, Little P, et al. Prolonged shedding of rhinovirus and re-infection in adults with respiratory tract illness. *Eur Respir J.* 2014 Jul;44(1):169-77. Disponible en doi: 10.1183/09031936.00172113.
- [113] Ko FW, Chan PK, Chan RWY, Chan KP, Ip A, Kwok A, et al. Molecular detection of respiratory pathogens and typing of human rhinovirus of adults hospitalized for exacerbation of asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Respir Res.* 2019 Sep 13;20(1):210. Disponible en doi: 10.1186/s12931-019-1181-0.
- [114] Wildenbeest JG, van der Schee MP, Hashimoto S, Benschop KS, Minnaar RP, Sprickelman AB, et al. Prevalence of rhinoviruses in young children of an unselected birth cohort from the Netherlands. *Clin Microbiol Infect.* 2016 Aug;22(8):736.e9-736.e15. Disponible en doi: 10.1016/j.cmi.2016.05.022.
- [115] Pierangeli A, Scagnolari C, Selvaggi C, Verzaro S, Spina MT, Bresciani E, et al. Rhinovirus frequently detected in elderly adults attending an emergency department. *J Med Virol.* 2011 Nov;83(11):2043-7. Disponible en doi: 10.1002/jmv.22205.
- [116] Hung IF, Zhang AJ, To KK, Chan JF, Zhu SH, Zhang R, et al. Unexpectedly Higher Morbidity and Mortality of Hospitalized Elderly Patients Associated with Rhinovirus Copared with Influenza Virus Respiratory Tract Infection. *Int J Mol Sci.* 2017 Jan 26;18(2):259. Disponible en doi: 10.3390/ijms18020259.
- [117] Gern JE. How rhinovirus infections cause exacerbations of asthma. *Clin Exp Allergy.* 2015 Jan;45(1):32-42. Disponible en doi: 10.1111/cea.12428.
- [118] Ortega H, Nickle D, Carter L. Rhinovirus and asthma: Challenges and opportunities. *Rev Med Virol.* 2021 Jul;31(4):e2193. Disponible en doi: 10.1002/rmv.2193.

- [119] Calvo C, Aguado I, García-García ML, Ruiz-Chercoles E, Díaz-Martínez E, Albañil RM, et al. Respiratory viral infections in a cohort of children during the first year of life and their role in the development of wheezing. *An Pediatr (Engl Ed)*. 2017 Aug;87(2):104-110. Disponible en doi: 10.1016/j.anpede.2016.08.008.
- [120] Mak RK, Tse LY, Lam WY, Wong GW, Chan PK, Leung TF. Clinical spectrum of human rhinovirus infections in hospitalized Hong Kong children. *Pediatr Infect Dis J*. 2011 Sep;30(9):749-53. Disponible en doi: 10.1097/INF.0b013e31821b8c71.
- [121] de Winter JJ, Bont L, Wilbrink B, van der Ent CK, Smit HA, Houben ML. Rhinovirus wheezing illness in infancy is associated with medically attended third year wheezing in low risk infants: results of a healthy birth cohort study. *ImmunInflamm Dis*. 2015 Aug 27;3(4):398-405. Disponible en doi: 10.1002/iid3.77.
- [122] Saraya T, Kimura H, Kurai D, Ishii H, Takizawa H. The molecular epidemiology of respiratory viruses associated with asthma attacks: A single-center observational study in Japan. *Medicine (Baltimore)*. 2017 Oct;96(42):e8204. Disponible en doi: 10.1097/MD.00000000000008204.
- [123] Arden KE, Faux CE, O'Neill NT, McErlean P, Nitsche A, Lambert SB, et al. Molecular characterization and distinguishing features of a novel human rhinovirus (HRV) C, HRVC-QCE, detected in children with fever, cough and wheeze during 2003. *J Clin Virol*. 2010 Mar;47(3):219-23. Disponible en doi: 10.1016/j.jcv.2010.01.001.
- [124] Bizzintino J, Lee WM, Laing IA, Vang F, Pappas T, Zhang G, et al. Association between human rhinovirus C and severity of acute asthma in children. *Eur Respir J*. 2011 May;37(5):1037-42. Disponible en doi: 10.1183/09031936.00092410.
- [125] Arden KE, Chang AB, Lambert SB, Nissen MD, Sloots TP, Mackay IM. Newly identified respiratory viruses in children with asthma exacerbation not requiring admission to hospital. *J Med Virol*. 2010 Aug;82(8):1458-61. Disponible en doi: 10.1002/jmv.21819.

- [126] Miller EK, Bugna J, Libster R, Shepherd BE, Scalzo PM, Acosta PL, et al. Human rhinoviruses in severe respiratory disease in very low birth weight infants. *Pediatrics*. 2012 Jan;129(1):e60-7. Disponible en doi: 10.1542/peds.2011-0583.
- [127] Perez GF, Kurdi B, Megalaa R, Pancham K, Huseni S, Isaza N, et al. Phenotypical characterization of human rhinovirus infections in severely premature children. *Pediatr Neonatol*. 2018 Jun;59(3):244-250. Disponible en doi: 10.1016/j.pedneo.2017.04.008.
- [128] Pancham K, Sami I, Perez GF, Huseni S, Kurdi B, Rose MC, et al. Human Metapneumovirus Infection is Associated with Severe Respiratory Disease in Pre-school Children with History of Prematurity. *Pediatr Neonatol*. 2016 Feb;57(1):27-34. Disponible en doi: 10.1016/j.pedneo.2015.03.008.
- [129] Rodríguez DA, Rodríguez-Martínez CE, Cárdenas AC, Quilaguy IE, Mayorga LY, Falla LM, et al. Predictors of severity and mortality in children hospitalized with respiratory syncytial virus infection in a tropical region. *Pediatr Pulmonol*. 2014 Mar;49(3):269-76. Disponible en doi: 10.1002/ppul.22781.
- [130] Simsic J, Phelps C, Yates A, Galantowicz M. Management strategies after cardiac surgery in an infant with human rhinovirus. *Pediatr Cardiol*. 2013;34(8):1922-4. Disponible en doi: 10.1007/s00246-012-0459-5.
- [131] Delgado-Corcoran C, Witte MK, Ampofo K, Castillo R, Bodily S, Bratton SL. The impact of human rhinovirus infection in pediatric patients undergoing heart surgery. *Pediatr Cardiol*. 2014 Dec;35(8):1387-94. Disponible en doi: 10.1007/s00246-014-0941-3.
- [132] Khongphatthanayothin A, Wong PC, Samara Y, Newth CJ, Wells WJ, Starnes VA, et al. Impact of respiratory syncytial virus infection on surgery for congenital heart disease: postoperative course and outcome. *Crit Care Med*. 1999 Sep;27(9):1974-81. Disponible en doi: 10.1097/00003246-199909000-00042.
- [133] García CG, Bhore R, Soriano-Fallas A, Trost M, Chason R, Ramilo O, et al. Risk factors in children hospitalized with RSV bronchiolitis versus non-RSV bronchio-

litis. *Pediatrics*. 2010 Dec;126(6):e1453-60. Disponible en doi: 10.1542/peds.2010-0507.

- [134] Lee N, Smith S, Zelyas N, Klarenbach S, Zapernick L, Bekking C, et al. Burden of noninfluenza respiratory viral infections in adults admitted to hospital: analysis of a multiyear Canadian surveillance cohort from 2 centres. *CMAJ*. 2021 Mar 29;193(13):E439-E446. Disponible en doi: 10.1503/cmaj.201748.
- [135] Tapparel C, Cordey S, Junier T, Farinelli L, Van Belle S, Soccal PM, Aubert JD, Zdobnov E, Kaiser L. Rhinovirus genome variation during chronic upper and lower respiratory tract infections. *PLoS One*. 2011;6(6):e21163. Disponible en: doi:10.1371/journal.pone.0021163.
- [136] Pierangeli A, Ciccozzi M, Chiavelli S, Concato C, Giovanetti M, Cella E, et al. Molecular epidemiology and genetic diversity of human rhinovirus affecting hospitalized children in Rome. *Med Microbiol Immunol*. 2013 Aug;202(4):303-11. Disponible en doi: 10.1007/s00430-013-0296-z.
- [137] Megremis S, Demetriou P, Makrinioti H, Manoussaki AE, Papadopoulos NG. The genomic signature of human rhinoviruses A, B and C. *PLoS One*. 2012;7(9):e44557. Disponible en doi: 10.1371/journal.pone.0044557.
- [138] Naughtin M, Sareth R, Sentilhes AC, Vong S, Joffret ML, Cornillot E, et al. Genetic diversity of human rhinoviruses in Cambodia during a three-year period reveals novel genetic types. *Infect Genet Evol*. 2015 Oct;35:42-9. Disponible en doi: 10.1016/j.meegid.2015.07.030.
- [139] Cuevas MT, Molinero M, Pozo F, Calvo C, García-García ML, Reyes N, et al. Spread of different rhinovirus B genotypes in hospitalized children in Spain. *Influenza Other Respir Viruses*. 2013 Sep;7(5):623-8. Disponible en doi: 10.1111/irv.12061.
- [140] Nenna R, Evangelisti M, Frassanito A, Scagnolari C, Pierangeli A, Antonelli G, et al. Respiratory syncytial virus bronchiolitis, weather conditions and air pollution in an Italian urban area: An observational study. *Environ Res*. 2017 Oct;158:188-193. Disponible en doi: 10.1016/j.envres.2017.06.014.

- [141] Meerhoff TJ, Paget JW, Kimpen JL, Schellevis F. Variation of respiratory syncytial virus and the relation with meteorological factors in different winter seasons. *Pediatr Infect Dis J.* 2009 Oct;28(10):860-6. Disponible en doi: 10.1097/INF.0b013e3181a3e949.
- [142] Shaman J, Pitzer VE, Viboud C, Grenfell BT, Lipsitch M. Absolute humidity and the seasonal onset of influenza in the continental United States. *PLoS Biol.* 2010 Feb 23;8(2):e1000316. Disponible en doi: 10.1371/journal.pbio.1000316.
- [143] Lopes GP, Amorim ÍPS, Melo BO, Maramaldo CEC, Bomfim MRQ, Lima Neto LG, et al. Identification and seasonality of rhinovirus and respiratory syncytial virus in asthmatic children in tropical climate. *Biosci Rep.* 2020 Sep 30;40(9):BSR20200634. Disponible en doi: 10.1042/BSR20200634.
- [144] Vittucci AC, Piccioni L, Coltella L, Ciarlito C, Antilici L, Bozzola E, et al. The Disappearance of Respiratory Viruses in Children during the COVID-19 Pandemic. *Int J Environ Res Public Health.* 2021 Sep 10;18(18):9550. Disponible en doi: 10.3390/ijerph18189550.
- [145] Melé M, Henares D, Pino R, Asenjo S, Matamoros R, Fumadó V, et al; Kids-Corona Paediatric Hospitalist group. Low impact of SARS-CoV-2 infection among paediatric acute respiratory disease hospitalizations. *J Infect.* 2021 Mar;82(3):414-451. Disponible en doi: 10.1016/j.jinf.2020.10.013.
- [146] Mansuy JM, Bourcier M, Trémeaux P, Dimeglio C, Izopet J. COVID-19 pandemic period, where are the seasonal viruses? *J Med Virol.* 2021 Jul;93(7):4097-4098. Disponible en doi: 10.1002/jmv.26959.
- [147] Nhung NTT, Schindler C, Dien TM, Probst-Hensch N, Perez L, Künzli N. Acute effects of ambient air pollution on lower respiratory infections in Hanoi children: An eight-year time series study. *Environ Int.* 2018 Jan;110:139-148. Disponible en doi: 10.1016/j.envint.2017.10.024.
- [148] MacIntyre EA, Gehring U, Mölter A, Fuertes E, Klümper C, Krämer U, et al. Air pollution and respiratory infections during early childhood: an analysis of 10 Eu-

- ropean birth cohorts within the ESCAPE Project. *Environ Health Perspect.* 2014 Jan;122(1):107-13. Disponible en doi: 10.1289/ehp.1306755.
- [149] Mehta S, Shin H, Burnett R, North T, Cohen AJ. Ambient particulate air pollution and acute lower respiratory infections: a systematic review and implications for estimating the global burden of disease. *Air Qual Atmos Health.* 2013 Mar;6(1):69-83. Disponible en doi: 10.1007/s11869-011-0146-3.
- [150] de SteenhuijsenPiters WA, Sanders EA, Bogaert D. The role of the local microbial ecosystem in respiratory health and disease. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2015;370(1675):20140294. Disponible en doi: 10.1098/rstb.2014.0294.
- [151] Berg G, Rybakova D, Fischer D, Cernava T, Vergès MC, Charles T, et al. Microbiome definition re-visited: old concepts and new challenges. *Microbiome.* 2020 Jun 30;8(1):103. Disponible en doi: 10.1186/s40168-020-00875-0.
- [152] Kong D, Zheng Y, Hu L, Chen J, Wu H, Teng Z, et al. Epidemiological and co-infection characteristics of common human coronaviruses in Shanghai, 2015–2020: A retrospective observational study. *Emerg Microbes Infect.* 2021 Dec;10(1):1660-1668. Disponible en doi: 10.1080/22221751.2021.1965498.
- [153] Chauhan JC, Slamon NB. The impact of multiple viral respiratory infections on outcomes for critically ill children. *Pediatr Crit Care Med.* 2017 Aug;18(8):e333-e338. Disponible en doi: 10.1097/PCC.0000000000001232.
- [154] Scotta MC, Chakr VC, de Moura A, Becker RG, Duarte de Souza AP, Jones MH, et al. Respiratory viral coinfection and disease severity in children: a systematic review and meta-analysis. *J Clin Virol.* 2016 Jul;80:45-56. Disponible en doi: 10.1016/j.jcv.2016.04.019.
- [155] Meskill SD, O'Bryant SC. Respiratory virus co-infection in acute respiratory infections in children. *Curr Infect Dis Rep.* 2020 Jan 24;22(1):3. Disponible en doi: 10.1007/s11908-020-0711-8.
- [156] Amat F, Plantard C, Mulliez A, Petit I, Rochette E, Verdan M, Henquell C, et al. RSV-hRV co-infection is a risk factor for recurrent bronchial obstruction and

early sensitization 3 years after bronchiolitis. *J Med Virol*. 2018 May;90(5):867-872. Disponible en doi: 10.1002/jmv.25037.

- [157] Yoshida LM, Suzuki M, Nguyen HA, Le MN, DinhVu T, Yoshino H, et al. Respiratory syncytial virus: co-infection and paediatric lower respiratory tract infections. *Eur Respir J*. 2013 Aug;42(2):461-9. Disponible en doi: 10.1183/09031936.00101812.
- [158] Smith AM. Host-pathogen kinetics during influenza infection and coinfection: insights from predictive modeling. *Immunol Rev*. 2018 Sep;285(1):97-112. Disponible en doi: 10.1111/imr.12692.
- [159] Kim D, Quinn J, Pinsky B, Shah NH, Brown I. Rates of Co-infection Between SARS-CoV-2 and Other Respiratory Pathogens. *JAMA*. 2020 May 26;323(20):2085-2086. Disponible en doi:10.1001/jama.2020.6266.
- [160] Sender R, Fuchs S, Milo R. Are We Really Vastly Outnumbered? Revisiting the Ratio of Bacterial to Host Cells in Humans. *Cell*. 2016 Jan 28;164(3):337-40. Disponible en doi: 10.1016/j.cell.2016.01.013.
- [161] Grice EA, Segre JA. The human microbiome: our second genome. *Annu Rev Genomics Hum Genet*. 2012;13:151-70. Disponible en doi: 10.1146/annurev-genom-090711-163814.
- [162] Jandhyala SM, Talukdar R, Subramanyam C, Vuyyuru H, Sasikala M, Nageshwar Reddy D. Role of the normal gut microbiota. *World J Gastroenterol*. 2015 Aug 7;21(29):8787-803. Disponible en doi: 10.3748/wjg.v21.i29.8787.
- [163] Grice EA, Segre JA. The skin microbiome. *Nat Rev Microbiol*. 2011 Apr;9(4):244-53. Disponible en doi: 10.1038/nrmicro2537.
- [164] Ravel J, Gajer P, Abdo Z, Schneider GM, Koenig SS, McCulle SL, et al. Vaginal microbiome of reproductive-age women. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011 Mar 15;108 Suppl 1(Suppl 1):4680-7. Disponible en doi: 10.1073/pnas.1002611107.
- [165] Bogaert D, Keijser B, Huse S, Rossen J, Veenhoven R, van Gils E, et al. Variability and diversity of nasopharyngeal microbiota in children: a metagenomic analy-

sis. *PLoS One*. 2011 Feb 28;6(2):e17035. Disponible en doi: 10.1371/journal.pone.0017035.

- [166] García-Rodríguez JA, Fresnadillo Martínez MJ. Dynamics of nasopharyngeal colonization by potential respiratory pathogens. *J Antimicrob Chemother*. 2002 Dec;50 Suppl S2:59-73. Disponible en doi: 10.1093/jac/dkf506.
- [167] Biesbroek G, Tsivtsivadze E, Sanders EA, Montijn R, Veenhoven RH, Keijser BJ, et al. Early respiratory microbiota composition determines bacterial succession patterns and respiratory health in children. *Am J Respir Crit Care Med*. 2014 Dec 1;190(11):1283-92. Disponible en doi: 10.1164/rccm.201407-1240OC.
- [168] Bosch AATM, de SteenhuijsenPiters WAA, van Houten MA, Chu MLJN, Biesbroek G, Kool J, et al. Maturation of the Infant Respiratory Microbiota, Environmental Drivers, and Health Consequences. A Prospective Cohort Study. *Am J Respir Crit Care Med*. 2017 Dec 15;196(12):1582-1590. Disponible en doi: 10.1164/rccm.201703-0554OC.
- [169] Man WH, de SteenhuijsenPiters WA, Bogaert D. The microbiota of the respiratory tract: gatekeeper to respiratory health. *Nat Rev Microbiol*. 2017 May;15(5):259-270. Disponible endoi: 10.1038/nrmicro.2017.14.
- [170] Biesbroek G, Bosch AA, Wang X, Keijser BJ, Veenhoven RH, Sanders EA, et al. The impact of breastfeeding on nasopharyngeal microbial communities in infants. *Am J Respir Crit Care Med*. 2014 Aug 1;190(3):298-308. Disponible endoi: 10.1164/rccm.201401-0073OC.
- [171] Bosch AATM, Levin E, van Houten MA, Hasrat R, Kalkman G, Biesbroek G, et al. Development of Upper Respiratory Tract Microbiota in Infancy is Affected by Mode of Delivery. *EBioMedicine*. 2016 Jul;9:336-345. Disponible en doi: 10.1016/j.ebiom.2016.05.031.
- [172] Sun Y, Sundell J. Early daycare attendance increase the risk for respiratory infections and asthma of children. *J Asthma*. 2011 Oct;48(8):790-6. Disponible en doi: 10.3109/02770903.2011.604884.

- [173] Olwage CP, Adrian PV, Nunes MC, Madhi SA. Evaluation of the association of pneumococcal conjugate vaccine immunization and density of nasopharyngeal bacterial colonization using a multiplex quantitative polymerase chain reaction assay. *Vaccine*. 2018 May 31;36(23):3278-3285. Disponible en doi: 10.1016/j.vaccine.2018.04.068.
- [174] Salter SJ, Turner C, Watthanaworawit W, de Goffau MC, Wagner J, Parkhill J, et al. A longitudinal study of the infant nasopharyngeal microbiota: The effects of age, illness and antibiotic use in a cohort of South East Asian children. *PLoS Negl Trop Dis*. 2017 Oct 2;11(10):e0005975. Disponible en doi: 10.1371/journal.pntd.0005975.
- [175] Chonmaitree T, Jennings K, Golovko G, Khanipov K, Pimenova M, Patel JA, et al. Nasopharyngeal microbiota in infants and changes during viral upper respiratory tract infection and acute otitis media. *PLoS One*. 2017 Jul 14;12(7):e0180630. Disponible en doi: 10.1371/journal.pone.0180630.
- [176] Pettigrew MM, Laufer AS, Gent JF, Kong Y, Fennie KP, Metlay JP. Upper respiratory tract microbial communities, acute otitis media pathogens, and antibiotic use in healthy and sick children. *Appl Environ Microbiol*. 2012 Sep;78(17):6262-70. Disponible en doi: 10.1128/AEM.01051-12.
- [177] Toivonen L, Hasegawa K, Waris M, Ajami NJ, Petrosino JF, Camargo CA Jr, et al. Early nasal microbiota and acute respiratory infections during the first years of life. *Thorax*. 2019 Jun;74(6):592-599. Disponible en doi: 10.1136/thoraxjnl-2018-212629.
- [178] Lécuyer H, Audibert J, Bobigny A, Eckert C, Janni re-Nartey C, Buu-Ho  A, et al. *Dolosigranulum pigrum* causing nosocomial pneumonia and septicemia. *J Clin Microbiol*. 2007 Oct;45(10):3474-5. Disponible en doi: 10.1128/JCM.01373-07.
- [179] Henares D, Brotons P, de Sevilla MF, Fernandez-Lopez A, Hernandez-Bou S, Perez-Arg uello A, et al. Differential nasopharyngeal microbiota composition in children according to respiratory health status. *Microb Genom*. 2021 Oct;7(10):000661. Disponible en doi: 10.1099/mgen.0.000661.

- [180] Di Pierro F, Colombo M, Zanvit A, Risso P, Rottoli AS. Use of *Streptococcus salivarius* K12 in the prevention of streptococcal and viral pharyngotonsillitis in children. *Drug Healthc Patient Saf.* 2014 Feb 13;6:15-20. Disponible en doi: 10.2147/DHPS.S5966.
- [181] Allen EK, Koeppel AF, Hendley JO, Turner SD, Winther B, Sale MM. Characterization of the nasopharyngeal microbiota in health and during rhinovirus challenge. *Microbiome.* 2014 Jun 25;2:22. Disponible en doi: 10.1186/2049-2618-2-22.
- [182] Kloepper KM, Lee WM, Pappas TE, Kang TJ, Vrtis RF, Evans MD, et al. Detection of pathogenic bacteria during rhinovirus infection is associated with increased respiratory symptoms and asthma exacerbations. *J Allergy Clin Immunol.* 2014 May;133(5):1301-7. Disponible en doi: 10.1016/j.jaci.2014.02.030.
- [183] Adam DC, Chen X, Scotch M, MacIntyre CR, Dwyer D, Kok J. The Molecular Epidemiology and Clinical Phylogenetics of Rhinoviruses Among Paediatric Cases in Sydney, Australia. *Int J Infect Dis.* 2021 Sep;110:69-74. Disponible en doi: 10.1016/j.ijid.2021.06.046.
- [184] Honkinen M, Lahti E, Österback R, Ruuskanen O, Waris M. Viruses and bacteria in sputum samples of children with community-acquired pneumonia. *Clin Microbiol Infect.* 2012 Mar;18(3):300-7. Disponible en doi: 10.1111/j.1469-0691.2011.03603.x.
- [185] Hung HM, Yang SL, Chen CJ, Chiu CH, Kuo CY, Huang KA, et al. Molecular epidemiology and clinical features of rhinovirus infections among hospitalized patients in a medical center in Taiwan. *J Microbiol Immunol Infect.* 2019 Apr;52(2):233-241. Disponible en doi: 10.1016/j.jmii.2018.08.009.
- [186] Mallia P, Footitt J, Sotero R, Jepson A, Contoli M, Trujillo-Torralbo MB, et al. Rhinovirus infection induces degradation of antimicrobial peptides and secondary bacterial infection in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med.* 2012 Dec 1;186(11):1117-24. Disponible en doi: 10.1164/rccm.201205-0806OC.

- [187] Molyneaux PL, Mallia P, Cox MJ, Footitt J, Willis-Owen SA, Homola D, et al. Out-growth of the bacterial airway microbiome after rhinovirus exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 2013 Nov 15;188(10):1224-31. Disponible en doi: 10.1164/rccm.201302-0341OC.
- [188] de SteenhuijsenPiters WA, Heinonen S, Hasrat R, Bunsow E, Smith B, Suarez-Arrabal MC, et al. Nasopharyngeal Microbiota, Host Transcriptome, and Disease Severity in Children with Respiratory Syncytial Virus Infection. *Am J Respir Crit Care Med*. 2016 Nov 1;194(9):1104-1115. Disponible en doi: 10.1164/rccm.201602-0220OC.
- [189] Dai W, Wang H, Zhou Q, Feng X, Lu Z, Li D, et al. The concordance between upper and lower respiratory microbiota in children with Mycoplasma pneumoniae pneumonia. *Emerg Microbes Infect*. 2018 May 23;7(1):92. Disponible en doi: 10.1038/s41426-018-0097-y.
- [190] Fukuda K, Ogawa M, Taniguchi H, Saito M. Molecular Approaches to Studying Microbial Communities: Targeting the 16S Ribosomal RNA Gene. *J UOEH*. 2016 Sep;38(3):223-32. Disponible en doi: 10.7888/juoeh.38.223.
- [191] Buerger L. Studies of the pneumococcus and allied organisms with reference to their occurrence in the human mouth. *J Exp Med*. 1905 Aug 25;7(5):497-546. Disponible en doi: 10.1084/jem.7.5.497.
- [192] Cunliffe AC. Incidence of Staphylococcus aureus in the anterior nares of healthy children. *Lancet*. 1949 Sep 3;2(6575):411-4. Disponible en doi: 10.1016/s0140-6736(49)90118-x.
- [193] Gama RE, Hughes PJ, Bruce CB, Stanway G. Polymerase chain reaction amplification of rhinovirus nucleic acids from clinical material. *Nucleic Acids Res*. 1988 Oct 11;16(19):9346. Disponible en doi: 10.1093/nar/16.19.9346.
- [194] Zeldis JB, Lee JH, Mamish D, Finegold DJ, Sircar R, Ling Q, et al. Direct method for detecting small quantities of hepatitis B virus DNA in serum and plasma using the polymerase chain reaction. *J Clin Invest*. 1989 Nov;84(5):1503-8. Disponible en doi: 10.1172/JCI114326.

- [195] Edwards MC, Gibbs RA. Multiplex PCR: advantages, development, and applications. *PCR Methods Appl.* 1994 Feb;3(4):S65-75. Disponible en doi: 10.1101/gr.3.4.s65.
- [196] Peterson J, Garges S, Giovanni M, McInnes P, Wang L, Schloss JA, et al. The NIH Human *Microbiome Project Genome Res.* 2009 Dec;19(12):2317-23. Disponible en doi: 10.1101/gr.096651.109.
- [197] Zuñiga C, Zaramela L, Zengler K. Elucidation of complexity and prediction of interactions in microbial communities. *Microb Biotechnol.* 2017 Nov;10(6):1500-1522. Disponible en doi: 10.1111/1751-7915.12855.
- [198] Quince C, Walker AW, Simpson JT, Loman NJ, Segata N. Shotgun metagenomics, from sampling to analysis. *Nat Biotechnol.* 2017 Sep 12;35(9):833-844. Disponible en doi: 10.1038/nbt.3935.
- [199] Fox GE, Pechman KR, Woese CR. Comparative Cataloging of 16S Ribosomal Ribonucleic Acid: Molecular Approach to Procaryotic Systematics. *Int J Syst Evol Microbiol.* 1977 Jan;27(1):44-57. Disponible en doi:10.1099/00207713-27-1-44.
- [200] Whitman WB, editor. *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria.* Nueva Jersey, EEUU: Wiley; 2015. Disponible en doi:10.1002/9781118960608.
- [201] Fukuda K, Ogawa M, Taniguchi H, Saito M. Molecular Approaches to Studying Microbial Communities: Targeting the 16S Ribosomal RNA Gene. *J UOEH.* 2016 Sep;38(3):223-32. Disponible en doi: 10.7888/juoeh.38.223.
- [202] Klindworth A, Pruesse E, Schweer T, Peplies J, Quast C, Horn M, et al. Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies. *Nucleic Acids Res.* 2013 Jan;41(1):e1. Disponible en doi:10.1093/nar/gks808.
- [203] Graspeuntner S, Loeper N, Künzel S, Baines JF, Rupp J. Selection of validated hypervariable regions is crucial in 16S-based microbiota studies of the female genital tract. *Sci Rep.* 2018 Jun 26;8(1):9678. Disponible en doi: 10.1038/s41598-018-27757-8.

- [204] Goodwin S, McPherson JD, McCombie WR. Coming of age: ten years of next-generation sequencing technologies. *Nat Rev Genet.* 2016 May 17;17(6):333-51. Disponible en: doi: 10.1038/nrg.2016.49.
- [205] Liu L, Li Y, Li S, Hu N, He Y, Pong R, et al. Comparison of next-generation sequencing systems. *J Biomed Biotechnol.* 2012;2012:251364. Disponible en doi: 10.1155/2012/251364.
- [206] Bentley DR, Balasubramanian S, Swerdlow HP, Smith GP, Milton J, Brown CG, et al. Accurate whole human genome sequencing using reversible terminator chemistry. *Nature.* 2008 Nov 6;456(7218):53-9. Disponible en doi: 10.1038/nature07517.
- [207] Winand R, Bogaerts B, Hoffman S, Lefevre L, Delvoye M, Braekel JV, et al. Targeting the 16s rRNA gene for bacterial identification in complex mixed samples: comparative evaluation of second (illumina) and third (oxford nanopore technologies) generation sequencing technologies. *Int J Mol Sci.* 2019 Dec 31;21(1):298. Disponible en doi: 10.3390/ijms21010298.
- [208] Caporaso JG, Kuczynski J, Stombaugh J, Bittinger K, Bushman FD, Costello EK, et al. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nat Methods.* 2010 May;7(5):335-6. Disponible en doi: 10.1038/nmeth.f.303.
- [209] Schloss PD, Westcott SL, Ryabin T, Hall JR, Hartmann M, Hollister EB, et al. Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. *Appl Environ Microbiol.* 2009 Dec;75(23):7537-41. Disponible en doi: 10.1128/AEM.01541-09.
- [210] Edgar RC. UPARSE: highly accurate OTU sequences from microbial amplicon reads. *Nat Methods.* 2013 Oct;10(10):996-8. Disponible en doi: 10.1038/nmeth.2604.
- [211] Callahan BJ, McMurdie PJ, Rosen MJ, Han AW, Johnson AJ, Holmes SP. DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nat Methods.* 2016 Jul;13(7):581-3. Disponible en doi: 10.1038/nmeth.3869.

- [212] Amir A, McDonald D, Navas-Molina JA, Kopylova E, Morton JT, ZechXu Z, et al. DeblurRapidly Resolves Single-Nucleotide Community Sequence Patterns. *mSystems*. 2017 Apr;2(2):e00191-16. Disponible en: doi:10.1128/MSYSTEMS.00191-16.
- [213] Edgar RC. UNOISE2: improved error-correction for Illumina 16S and ITS amplicon sequencing. *bioRxiv* [Preprint] 2016. Disponible en: doi:10.1101/081257.
- [214] Walker SP, Barrett M, Hogan G, Flores Bueso Y, Claesson MJ, Tangney M. Non-specific amplification of human DNA is a major challenge for 16S rRNA gene sequence analysis. *Sci Rep*. 2020 Oct 1;10(1):16356. Disponible en doi: 10.1038/s41598-020-73403-7.
- [215] Salter SJ, Cox MJ, Turek EM, Calus ST, Cookson WO, Moffatt MF, et al. Reagent and laboratory contamination can critically impact sequence-based microbiome analyses. *BMC Biol*. 2014 Nov 12;12:87. Disponible en doi: 10.1186/s12915-014-0087-z.
- [216] Eisenhofer R, Minich JJ, Marotz C, Cooper A, Knight R, Weyrich LS. Contamination in Low Microbial Biomass Microbiome Studies: Issues and Recommendations. *Trends Microbiol*. 2019 Feb;27(2):105-117. Disponible en doi: 10.1016/j.tim.2018.11.003.
- [217] Davis NM, Proctor DM, Holmes SP, Relman DA, Callahan BJ. Simple statistical identification and removal of contaminant sequences in marker-gene and metagenomics data. *Microbiome*. 2018 Dec;6(1):226. Disponible en doi:10.1186/s40168-018-0605-2.
- [218] Blaxter M, Mann J, Chapman T, Thomas F, Whitton C, Floyd R, Abebe E. Defining operational taxonomic units using DNA barcode data. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2005 Oct 29;360(1462):1935-43. Disponible en doi: 10.1098/rstb.2005.1725.
- [219] Meier-Kolthoff JP, Auch AF, Klenk HP, Göker M. Genome sequence-based species delimitation with confidence intervals and improved distance functions.

BMC Bioinformatics. 2013 Feb 21;14:60. Disponible en doi: 10.1186/1471-2105-14-60.

- [220] Callahan BJ, McMurdie PJ, Holmes SP. Exact sequence variants should replace operational taxonomic units in marker-gene data analysis. *ISME J*. 2017 Dec;11(12):2639-2643. Disponible en doi: 10.1038/ismej.2017.119.
- [221] Sun DL, Jiang X, Wu QL, Zhou NY. Intragenomic heterogeneity of 16S rRNA genes causes overestimation of prokaryotic diversity. *Appl Environ Microbiol*. 2013 Oct;79(19):5962-9. Disponible en doi: 10.1128/AEM.01282-13.
- [222] Schloss PD. Amplicon Sequence Variants Artificially Split Bacterial Genomes into Separate Clusters. *mSphere*. 2021 Aug 25;6(4):e0019121. Disponible en doi: 10.1128/mSphere.00191-21.
- [223] Sierra MA, Li Q, Pushalkar S, Paul B, Sandoval TA, Kamer AR, et al The Influences of Bioinformatics Tools and Reference Databases in Analyzing the Human Oral Microbial Community. *Genes (Basel)*. 2020 Aug 3;11(8):878. Disponible en doi: 10.3390/genes11080878.
- [224] McDonald D, Price MN, Goodrich J, Nawrocki EP, DeSantis TZ, Probst A, et al. An improved Greengenes taxonomy with explicit ranks for ecological and evolutionary analyses of bacteria and archaea. *ISME J*. 2012 Mar;6(3):610-8. Disponible en doi: 10.1038/ismej.2011.139.
- [225] Quast C, Pruesse E, Yilmaz P, Gerken J, Schweer T, Yarza P, et al. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Res*. 2013 Jan;41(Database issue):D590-6. Disponible en doi: 10.1093/nar/gks1219.
- [226] Cole JR, Wang Q, Fish JA, Chai B, McGarrell DM, Sun Y, et al. Ribosomal Database Project: data and tools for high throughput rRNA analysis. *Nucleic Acids Res*. 2014 Jan;42(Database issue):D633-42. Disponible en doi: 10.1093/nar/gkt1244.

- [227] Sakwinska O, Bastic Schmid V, Berger B, Bruttin A, Keitel K, Lepage M, et al. Nasopharyngeal microbiota in healthy children and pneumonia patients. *J Clin Microbiol.* 2014 May;52(5):1590-4. Disponible en doi: 10.1128/JCM.03280-13.
- [228] Whittaker RH. Evolution and measurement of species diversity. *Taxon.* 1972 May;21(2-3):213-51. Disponible en doi:10.2307/1218190.
- [229] Chao A. Nonparametric Estimation of the number of classes in a population. *Scand J Stat.* 1984;11(4):265-70. Disponible en: [http://dns2.asia.edu.tw/~ysho/YSHOEnglish/1000%20Taiwan%20\(Independent\)/PDF/Sca%20J%20Sta11,%20265.pdf](http://dns2.asia.edu.tw/~ysho/YSHOEnglish/1000%20Taiwan%20(Independent)/PDF/Sca%20J%20Sta11,%20265.pdf) [Citado el 24 de octubre de 2022].
- [230] Shannon CE. A mathematical theory of communication. *Bell Syst Tech J.* 1948 Jul;27(1928):379-423. Disponible en: doi:10.1145/584091.584093.
- [231] Simpson EH. Measurement of Diversity. *Nat.* 1949 Apr;163(4148):688-8. Disponible en: doi:10.1038/163688a0.
- [232] Ricotta C, Podani J, Pavoine S. A family of functional dissimilarity measures for presence and absence data. *Ecol Evol.* 2016 Jul 5;6(15):5383-9. Disponible en doi: 10.1002/ece3.2214.
- [233] Bray JR, Curtis JT. An Ordination of the Upland Forest Communities of Southern Wisconsin. *Ecol Monogr.* 1957 Feb;27(4):325-49. Disponible en: doi:10.2307/1942268.
- [234] Lozupone CA, Hamady M, Kelley ST, Knight R. Quantitative and qualitative beta diversity measures lead to different insights into factors that structure microbial communities. *Appl Environ Microbiol.* 2007 Mar;73(5):1576-85. Disponible en doi: 10.1128/AEM.01996-06.
- [235] Anderson MJ. A new method for non-parametric multivariate analysis of variance. *Austral Ecol.* 2001 Feb;26(1):32-46. Disponible en: doi:10.1111/j.1442-9993.2001.01070.pp.x.

- [236] Clarke KR. Non-parametric multivariate analyses of changes in community structure. *Aust J Ecol.* 1993 Mar;18(1):117-43. Disponible en doi:10.1111/J.1442-9993.1993.TB00438.X.
- [237] Mantel N. The Detection of Disease Clustering and a Generalized Regression Approach. *Cancer Res.* 1967;27(2):209-20. Disponible en: https://cancerres.aacrjournals.org/content/27/2_Part_1/209.long [Citado el 24 de octubre de 2022].
- [238] Lin H, Peddada SD. Analysis of compositions of microbiomes with bias correction. *Nat Commun.* 2020 Jul;11(1):1-11. Disponible en doi:10.1038/s41467-020-17041-7.
- [239] Wishaupt JO, van der Ploeg T, de Groot R, Versteegh FG, Hartwig NG. Single- and multiple viral respiratory infections in children: disease and management cannot be related to a specific pathogen. *BMC Infect Dis.* 2017 Jan 11;17(1):62. Disponible en doi: 10.1186/s12879-016-2118-6.
- [240] Chorazy ML, Lebeck MG, McCarthy TA, Richter SS, Torner JC, Gray GC. Polymicrobial acute respiratory infections in a hospital-based pediatric population. *Pediatr Infect Dis J.* 2013 May;32(5):460-6. Disponible en doi: 10.1097/INF.0b013e31828683ce.
- [241] Jartti T, Jartti L, Peltola V, Waris M, Ruuskanen O. Identification of respiratory viruses in asymptomatic subjects: asymptomatic respiratory viral infections. *Pediatr Infect Dis J.* 2008 Dec;27(12):1103-7. Disponible en doi: 10.1097/INF.0b013e31817e695d.
- [242] RalstonSL, LieberthalAS, Meissner HC, Alverson BK, BaleyJE, Gadomski AM, et al. Clinical practice guideline: The diagnosis, management, and prevention of bronchiolitis. *Pediatrics.* 2014, 134, e1474–e1502. Disponible en doi: 10.1542/peds.2014-2742
- [243] da SilvaER, Pitrez MC, Arruda E,Mattiello R, Sarria EE, de PaulaFE, et al. Severe lower respiratory tract infection in infants and toddlers from a non-affluent

population: Viral etiology and co-detection as risk factors. *BMC Infect. Dis.* 2013, 13, 41. Disponible en doi: 10.1186/1471-2334-13-41

- [244] Lehtinen P, Vuorinen T, Jartti T. Rhinovirus-induced first wheezing episode predicts a topic but not nonatopic asthma at school age. *J Allergy Clin Immunol.* 2017 Oct;140(4):988-995. Disponible en doi: 10.1016/j.jaci.2016.12.991.
- [245] Asner SA, Rose W, Petrich A, Richardson S, Tran DJ. Is virus coinfection a predictor of severity in children with viral respiratory infections? *Clin Microbiol Infect.* 2015 Mar;21(3):264.e1-6. Disponible en doi: 10.1016/j.cmi.2014.08.024.
- [246] Mansbach JM, Piedra PA, Teach SJ, Sullivan AF, Forgey T, Clark S, et al. Prospective multicenter study of viral etiology and hospital length of stay in children with severe bronchiolitis. *Arch Pediatr Adolesc Med.* 2012 Aug;166(8):700-6. Disponible en doi: 10.1001/archpediatrics.2011.1669.
- [247] Bont L, Heijnen CJ, Kavelaars A, van Aalderen WM, Brus F, Draaisma JM, et al. Local interferon-gamma levels during respiratory syncytial virus lower respiratory tract infection are associated with disease severity. *J Infect Dis.* 2001 Aug 1;184(3):355-8. Disponible en doi: 10.1086/322035.
- [248] Boonyaratanakornkit J, Englund JA, Magaret AS, Bu Y, Tielsch JM, Khatry SK, et al. Primary and Repeated Respiratory Viral Infections Among Infants in Rural Nepal. *J Pediatric Infect Dis Soc.* 2020 Feb 28;9(1):21-29. Disponible en doi: 10.1093/jpids/piy107.
- [249] Li Y, Fu X, Ma J, Zhang J, Hu Y, Dong W, et al. Altered respiratory virome and serum cytokine profile associated with recurrent respiratory tract infections in children. *Nat Commun.* 2019 May 23;10(1):2288. Disponible en doi: 10.1038/s41467-019-10294-x.
- [250] Lee KH, Gordon A, Foxman B. The role of respiratory viruses in the etiology of bacterial pneumonia: An ecological perspective. *Evol Med Public Health.* 2016 Feb 15;2016(1):95-109. Disponible en doi: 10.1093/emph/eow007.

- [251] van den Bergh MR, Biesbroek G, Rossen JW, de Steenhuijsen Piters WA, Bosch AA, et al. Associations between pathogens in the upper respiratory tract of young children: interplay between viruses and bacteria. *PLoS One*. 2012;7(10):e47711. Disponible en doi: 10.1371/journal.pone.0047711.
- [252] Korten I, Mika M, Klenja S, Kieninger E, Mack I, Barbani MT, et al. Interactions of Respiratory Viruses and the Nasal Microbiota during the First Year of Life in Healthy Infants. *mSphere*. 2016 Nov 23;1(6):e00312-16. Disponible en doi: 10.1128/mSphere.00312-16.
- [253] McCauley K, Durack J, Valladares R, Fadrosch DW, Lin DL, Calatroni A, et al. Distinct nasal airway bacterial microbiotas differentially relate to exacerbation in pediatric patients with asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 2019 Nov;144(5):1187-1197. Disponible en doi: 10.1016/j.jaci.2019.05.035.
- [254] Calvo C, Casas I, García-García ML, Pozo F, Reyes N, Cruz N, et al. Role of rhinovirus C respiratory infections in sick and healthy children in Spain. *Pediatr Infect Dis J*. 2010 Aug;29(8):717-20. Disponible en doi: 10.1097/INF.0b013e3181d7a708.
- [255] Iwane MK, Prill MM, Lu X, Miller EK, Edwards KM, Hall CB, et al. Human rhinovirus species associated with hospitalizations for acute respiratory illness in young US children. *J Infect Dis*. 2011 Dec 1;204(11):1702-10. Disponible en doi: 10.1093/infdis/jir634.
- [256] Tapparel C, Siegrist F, Petty TJ, Kaiser L. Picornavirus and enterovirus diversity with associated human diseases. *Infect Genet Evol*. 2013 Mar;14:282-93. Disponible en doi: 10.1016/j.meegid.2012.10.016.
- [257] Launes C, Armero G, Anton A, Hernandez L, Gimferrer L, Cisneros C, et al. Molecular epidemiology of severe respiratory disease by human rhinoviruses and enteroviruses at a tertiary paediatric hospital in Barcelona, Spain. *Clin Microbiol Infect*. 2015 Aug;21(8):799.e5-7. Disponible en doi: 10.1016/j.cmi.2015.04.021.
- [258] González-Sanz R, Taravillo I, Reina J, Navascués A, Moreno-Docón A, Aranzamendi M, et al. Enterovirus D68-associated respiratory and neurological illness

in Spain, 2014-2018. *Emerg Microbes Infect.* 2019;8(1):1438-1444. Disponible en doi: 10.1080/22221751.2019.1668243

- [259] Dewhirst FE, Chen T, Izard J, Paster BJ, Tanner AC, Yu WH, et al. The human oral microbiome. *J Bacteriol.* 2010 Oct;192(19):5002-17. Disponible en doi: 10.1128/JB.00542-10.
- [260] Dubourg G, Edouard S, Raoult D. Relationship between nasopharyngeal microbiota and patient's susceptibility to viral infection. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2019 Jun;17(6):437-447. Disponible en doi: 10.1080/14787210.2019.1621168.
- [261] Togo A, Dufour JC, Lagier JC, Dubourg G, Raoult D, Million M. Repertoire of human breast and milk microbiota: a systematic review. *Future Microbiol.* 2019 May;14:623-641. Disponible en doi: 10.2217/fmb-2018-0317.
- [262] Chen M, He S, Miles P, Li C, Ge Y, Yu X, et al. Nasal Bacterial Microbiome Differs Between Healthy Controls and Those With Asthma and Allergic Rhinitis. *Front Cell Infect Microbiol.* 2022 Mar 3;12:841995. Disponible en doi: 10.3389/fcimb.2022.841995.
- [263] Camelo-Castillo A, Henares D, Brotons P, Galiana A, Rodríguez JC, Mira A, et al. Nasopharyngeal Microbiota in Children With Invasive Pneumococcal Disease: Identification of Bacteria With Potential Disease-Promoting and Protective Effects. *Front Microbiol.* 2019 Jan 28;10:11. Disponible en doi: 10.3389/fmicb.2019.00011.
- [264] Lappan R, Imbrogno K, Sikazwe C, Anderson D, Mok D, Coates H, et al. A microbiome case-control study of recurrent acute otitis media identified potentially protective bacterial genera. *BMC Microbiol.* 2018 Feb 20;18(1):13. Disponible en doi: 10.1186/s12866-018-1154-3.
- [265] Mokoena MP. Lactic Acid Bacteria and Their Bacteriocins: Classification, Biosynthesis and Applications against Uropathogens: A Mini-Review. *Molecules.* 2017 Jul 26;22(8):1255. Disponible en doi: 10.3390/molecules22081255.

- [266] Hasegawa K, Linnemann RW, Mansbach JM, Ajami NJ, Espinola JA, Petrosino JF, et al. Nasal Airway Microbiota Profile and Severe Bronchiolitis in Infants: A Case-control Study. *Pediatr Infect Dis J*. 2017 Nov;36(11):1044-1051. Disponible en doi: 10.1097/INF.0000000000001500.
- [267] Kaul D, Rathnasinghe R, Ferres M, Tan GS, Barrera A, Pickett BE, et al. Microbiome disturbance and resilience dynamics of the upper respiratory tract during influenza A virus infection. *Nat Commun*. 2020 May 21;11(1):2537. Disponible en doi: 10.1038/s41467-020-16429-9.
- [268] Cremers AJ, Zomer AL, Gritzfeld JF, Ferwerda G, van Hijum SA, Ferreira DM, et al. The adult nasopharyngeal microbiome as a determinant of pneumococcal acquisition. *Microbiome*. 2014 Dec 15;2:44. Disponible en doi: 10.1186/2049-2618-2-44.
- [269] De Boeck I, Wittouck S, Wuyts S, Oerlemans EFM, van den Broek MFL, Vandenheuvel D, et al. Comparing the Healthy Nose and Nasopharynx Microbiota Reveals Continuity As Well As Niche-Specificity. *Front Microbiol*. 2017 Nov 29;8:2372. Disponible en doi: 10.3389/fmicb.2017.02372.
- [270] Bomar L, Brugger SD, Yost BH, Davies SS, Lemon KP. *Corynebacterium accolens* Releases Antipneumococcal Free Fatty Acids from Human Nostril and Skin Surface Triacylglycerols. *mBio*. 2016 Jan 5;7(1):e01725-15. Disponible en doi: 10.1128/mBio.01725-15.
- [271] Brugger SD, Eslami SM, Pettigrew MM, Escapa IF, Henke MT, Kong Y, Lemon KP. *Dolosigranulum pigrum* Cooperation and Competition in Human Nasal Microbiota. *mSphere*. 2020 Sep 9;5(5):e00852-20. Disponible en doi: 10.1128/mSphere.00852-20.
- [272] Rocafort M, Henares D, Brotons P, Launes C, Fernandez de Sevilla M, Fumado V, et al. Impact of COVID-19 Lockdown on the Nasopharyngeal Microbiota of Children and Adults Self-Confined at Home. *Viruses*. 2022 Jul 12;14(7):1521. Disponible en doi: 10.3390/v14071521.

- [273] de Steenhuijsen Piters WAA, Jochems SP, Mitsi E, Rylance J, Pojar S, Nikolaou E, et al. Interaction between the nasal microbiota and *S. pneumoniae* in the context of live-attenuated influenza vaccine. *Nat Commun*. 2019 Jul 5;10(1):2981. Disponible en doi: 10.1038/s41467-019-10814-9.
- [274] Moyano RO, Tonetti FR, Tomokiyo M, Kanmani P, Vizoso-Pinto MG, Kim H, et al. The Ability of Respiratory Commensal Bacteria to Beneficially Modulate the Lung Innate Immune Response Is a Strain Dependent Characteristic. *Microorganisms*. 2020 May;8(5):727. Disponible en doi:10.3390/MICROORGANISMS8050727.
- [275] Raya Tonetti F, Tomokiyo M, Ortiz Moyano R, Quilodr  n-Vega S, Yamamuro H, Kanmani P, et al. The Respiratory Commensal Bacterium *Dolosigranulum pigrum* 040417 Improves the Innate Immune Response to *Streptococcus pneumoniae*. *Microorg*. 2021 Jun;9(6):1324. Disponible en doi:10.3390/MICROORGANISMS9061324.
- [276] Hyde ER, Petrosino JF, Piedra PA, Camargo CA Jr, Espinola JA, Mansbach JM. Nasopharyngeal Proteobacteria are associated with viral etiology and acute wheezing in children with severe bronchiolitis. *J Allergy Clin Immunol*. 2014 Apr;133(4):1220-2. Disponible en doi: 10.1016/j.jaci.2013.10.049.
- [277] Teo SM, Mok D, Pham K, Kusel M, Serralha M, Troy N, et al. The infant nasopharyngeal microbiome impacts severity of lower respiratory infection and risk of asthma development. *Cell Host Microbe*. 2015 May 13;17(5):704-15. Disponible en doi: 10.1016/j.chom.2015.03.008.
- [278] Rosas-Salazar C, Shilts MH, Tovchigrechko A, Chappell JD, Larkin EK, Nelson KE, et al. Nasopharyngeal Microbiome in Respiratory Syncytial Virus Resembles Profile Associated with Increased Childhood Asthma Risk. *Am J Respir Crit Care Med*. 2016 May 15;193(10):1180-3. Disponible en doi: 10.1164/rccm.201512-2350LE.
- [279] Langevin S, Pichon M, Smith E, Morrison J, Bent Z, Green R, et al. Early nasopharyngeal microbial signature associated with severe influenza in children: a ret-

respective pilot study. *J Gen Virol.* 2017 Oct;98(10):2425-2437. Disponible en doi: 10.1099/jgv.0.000920.

- [280] Hofstra JJ, Matamoros S, van de Pol MA, de Wever B, Tanck MW, Wendt-Knol H, et al. Changes in microbiota during experimental human Rhinovirus infection. *BMC Infect Dis.* 2015 Aug 14;15:336. Disponible en doi: 10.1186/s12879-015-1081-y.
- [281] Toivonen L, Camargo CA Jr, Gern JE, Bochkov YA, Mansbach JM, Piedra PA, et al. Association between rhinovirus species and nasopharyngeal microbiota in infants with severe bronchiolitis. *J Allergy Clin Immunol.* 2019 May;143(5):1925-1928.e7. Disponible en doi: 10.1016/j.jaci.2018.12.1004.
- [282] Mansbach JM, Hasegawa K, Piedra PA, Avadhanula V, Petrosino JF, Sullivan AF, et al. Haemophilus-Dominant Nasopharyngeal Microbiota Is Associated With Delayed Clearance of Respiratory Syncytial Virus in Infants Hospitalized for Bronchiolitis. *J Infect Dis.* 2019 May 5;219(11):1804-1808. Disponible en doi: 10.1093/infdis/jiy741.
- [283] Chapman TJ, Morris MC, Xu L, Pichichero ME. Nasopharyngeal colonization with pathobionts is associated with susceptibility to respiratory illnesses in young children. *PLoS One.* 2020 Dec;15(12):e0243942. Disponible en doi:10.1371/JOURNAL.PONE.0243942.
- [284] Pillarisetti N, Broderick D, Ainsworth A, Mulholland A, MacKenzie BW, Middleton D, et al. The airway microbiota in children newly diagnosed with bronchiectasis largely retains its diversity. *Eur Respir J.* 2019 Aug;54(2):1900704. Disponible en doi:10.1183/13993003.00704-2019.
- [285] Vissing NH, Chawes BLK, Bisgaard H. Increased risk of pneumonia and bronchiolitis after bacterial colonization of the airways as neonates. *Am J Respir Crit Care Med.* 2013 Nov;188(10):1246-52. Disponible en doi:10.1164/rccm.201302-0215OC.
- [286] Toivonen L, Karppinen S, Schuez-Havupalo L, Waris M, He Q, Hoffman KL, et al. Longitudinal Changes in Early Nasal Microbiota and the Risk of Childhood

Asthma. *Pediatrics*. 2020 Oct;146(4):e20200421. Disponible en doi:10.1542/PEDS.2020-0421.

- [287] Hasegawa K, Mansbach JM, Ajami NJ, Petrosino JF, Freishtat RJ, Teach SJ, et al. The relationship between nasopharyngeal CCL5 and microbiota on disease severity among infants with bronchiolitis. *Allergy*. 2017 Nov;72(11):1796. Disponible en doi:10.1111/ALL.13160.
- [288] Kim M, Oh HS, Park SC, Chun J. Towards a taxonomic coherence between average nucleotide identity and 16S rRNA gene sequence similarity for species demarcation of prokaryotes. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2014 Feb;64(Pt 2):346-51. Disponible en doi:10.1099/IJS.0.059774-0.
- [289] Hays JP. The Genus *Moraxella*. In: Dworkin M, Resnik S, Falkow S, editor. *The Prokaryotes*. New York, USA: Springer; 2006. p. 958-87. Disponible en: doi:10.1007/0-387-30746-x 38.
- [290] Mika M, Maurer J, Korten I, Allemann A, Aebi S, Brugger SD, et al. Influence of the pneumococcal conjugate vaccines on the temporal variation of pneumococcal carriage and the nasal microbiota in healthy infants: a longitudinal analysis of a case-control study. *Microbiome*. 2017 Jul 24;5(1):85. Disponible en doi: 10.1186/s40168-017-0302-6.
- [291] Salgado V, Fukutani K, Fukutani E, Lima J, Rossi E, Barral A, et al. Effects of 10-valent pneumococcal conjugate (PCV10) vaccination on the nasopharyngeal microbiome. *Vaccine*. 2020 Feb;38(6):1436-43. Disponible en doi:10.1016/J.VACCINE.2019.11.079.
- [292] Boelsen LK, Dunne EM, Mika M, Eggers S, Nguyen CD, Ratu FT, et al. The association between pneumococcal vaccination, ethnicity, and the nasopharyngeal microbiota of children in Fiji. *Microbiome*. 2019 Jul;7(1):1-16. Disponible en doi:10.1186/S40168-019-0716-4.
- [293] Biesbroek G, Wang X, Keijser BJ, Eijkemans RM, Trzciński K, Rots NY, et al. Seven-valent pneumococcal conjugate vaccine and nasopharyngeal microbiota in

healthy children. *Emerg Infect Dis*. 2014 Feb;20(2):201-10. Disponible en doi: 10.3201/eid2002.131220.

- [294] Prevaes SMPJ, De Winter-De Groot KM, Janssens HM, De Steenhuijsen P, WAA, Tramper-Stranders GA, Wyllie AL, et al. Development of the Nasopharyngeal Microbiota in Infants with Cystic Fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2016 Mar;193(5):504-15. Disponible en doi:10.1164/RCCM.201509-1759OC.
- [295] Zhou Y, Bacharier LB, Isaacson-Schmid M, Baty J, Schechtman KB, Sajol G, et al. Azithromycin therapy during respiratory syncytial virus bronchiolitis: Upper airway microbiome alterations and subsequent recurrent wheeze. *J Allergy Clin Immunol*. 2016 Oct;138(4):1215-9.e5. Disponible en doi:10.1016/j.jaci.2016.03.054.
- [296] Henares D, Rocafort M, Brotons P, de Sevilla MF, Mira A, Launes C, et al. Rapid Increase of Oral Bacteria in Nasopharyngeal Microbiota After Antibiotic Treatment in Children With Invasive Pneumococcal Disease. *Front Cell Infect Microbiol*. 2021 Oct 12;11:744727. Disponible en doi: 10.3389/fcimb.2021.744727.
- [297] Numminen E, Chewapreecha C, Turner C, Goldblatt D, Nosten F, Bentley SD, et al. Climate induces seasonality in pneumococcal transmission. *Sci Rep*. 2015 Jun 12;5:11344. Disponible en doi: 10.1038/srep11344.
- [298] Hang J, Zavaljevski N, Yang Y, Desai V, Ruck RC, Macareo LR, et al. Composition and variation of respiratory microbiota in healthy military personnel. *PLoS One*. 2017 Dec 7;12(12):e0188461. Disponible en doi: 10.1371/journal.pone.0188461.
- [299] Abdullahi O, Nyiro J, Lewa P, Slack M, Scott JA. The descriptive epidemiology of *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae* nasopharyngeal carriage in children and adults in Kilifi district, Kenya. *Pediatr Infect Dis J*. 2008 Jan;27(1):59-64. Disponible en doi: 10.1097/INF.0b013e31814da70c.
- [300] Bojang A, Jafali J, Egere UE, Hill PC, Antonio M, Jeffries D, et al. Seasonality of Pneumococcal Nasopharyngeal Carriage in Rural Gambia Determined within the

Context of a Cluster Randomized Pneumococcal Vaccine Trial. *PLoS One*. 2015 Jul 1;10(7):e0129649. Disponible en doi: 10.1371/journal.pone.0129649.

- [301] Sajjan US, Jia Y, Newcomb DC, Bentley JK, Lukacs NW, LiPuma JJ, et al. H. influenzae potentiates airway epithelial cell responses to rhinovirus by increasing ICAM-1 and TLR3 expression. *FASEB J*. 2006 Oct;20(12):2121-3. Disponible en doi: 10.1096/fj.06-5806fje.
- [302] Gulraiz F, Bellinghausen C, Bruggeman CA, Stassen FR. Haemophilus influenzae increases the susceptibility and inflammatory response of airway epithelial cells to viral infections. *FASEB J*. 2015 Mar;29(3):849-58. Disponible en doi: 10.1096/fj.14-254359.
- [303] Bellinghausen C, Gulraiz F, Heinzmann AC, Dentener MA, Savelkoul PH, Wouters EF, et al. Exposure to common respiratory bacteria alters the airway epithelial response to subsequent viral infection. *Respir Res*. 2016 Jun 3;17(1):68. Disponible en doi: 10.1186/s12931-016-0382-z.
- [304] Zhang X, Li L, Butcher J, Stintzi A, Figeys D. Advancing functional and translational microbiome research using meta-omics approaches. *Microbiome*. 2019 Dec 6;7(1):154. Disponible en doi: 10.1186/s40168-019-0767-6.
- [305] Santos A, van Aerle R, Barrientos L, Martinez-Urtaza J. Computational methods for 16S metabarcoding studies using Nanopore sequencing data. *Comput Struct Biotechnol J*. 2020 Jan 31;18:296-305. Disponible en doi: 10.1016/j.csbj.2020.01.005.
- [306] Kai S, Matsuo Y, Nakagawa S, Kryukov K, Matsukawa S, Tanaka H, et al. Rapid bacterial identification by direct PCR amplification of 16S rRNA genes using the MinION™ nanopore sequencer. *FEBS Open Bio*. 2019 Mar;9(3):548-57. Disponible en doi:10.1002/2211-5463.12590.
- [307] Pendleton KM, Erb-Downward JR, Bao Y, Branton WR, Falkowski NR, Newton DW, et al. Rapid Pathogen Identification in Bacterial Pneumonia Using Real-Time Metagenomics. *Am J Respir Crit Care Med*. 2017 Dec;196(12):1610-2. Disponible en doi:10.1164/RCCM.201703-0537LE.

- [308] Yang L, Haidar G, Zia H, Nettles R, Qin S, Wang X, et al. Metagenomic identification of severe pneumonia pathogens in mechanically-ventilated patients: A feasibility and clinical validity study. *Respir Res*. 2019 Nov;20(1):1-12. Disponible en doi:10.1186/S12931-019-1218-4/TABLES/2.
- [309] Chapman R, Jones L, D'Angelo A, Suliman A, Anwar M, Bagby S. Nanopore-Based Metagenomic Sequencing in Respiratory Tract Infection: A Developing Diagnostic Platform. *Lung*. 2023 Apr 2:1–9. Disponible en doi: 10.1007/s00408-023-00612-y.
- [310] Serpa PH, Deng X, Abdelghany M, Crawford E, Malcolm K, Caldera S, et al. Metagenomic prediction of antimicrobial resistance in critically ill patients with lower respiratory tract infections. *Genome Med*. 2022 Jul 12;14(1):74. Disponible en doi: 10.1186/s13073-022-01072-4.
- [311] Rinninella E, Raoul P, Cintoni M, Franceschi F, Miggiano GAD, Gasbarrini A, et al. What is the Healthy Gut Microbiota Composition? A Changing Ecosystem across Age, Environment, Diet, and Diseases. *Microorganisms*. 2019 Jan;7(1):14. Disponible en doi:10.3390/MICROORGANISMS7010014.
- [312] Schlager R. Microbiome Diagnostics. *Clin Chem*. 2020 Jan;66(1):68-76. Disponible en doi:10.1373/CLINCHEM.2019.303248.
- [313] Rizal NSM, Neoh HM, Ramli R, Periyasamy PRALK, Hanafiah A, Samat MNA, et al. Advantages and Limitations of 16S rRNA Next-Generation Sequencing for Pathogen Identification in the Diagnostic Microbiology Laboratory: Perspectives from a Middle-Income Country. *Diagnostics*. 2020 Oct;10(10):816. Disponible en doi:10.3390/DIAGNOSTICS10100816.
- [314] Coffey MJ, Garg M, Homaira N, Jaffe A, Ooi CY. Probiotics for people with cystic fibrosis. *Cochrane Database Syst Rev*. 2020 Jan;2020(1):CD012949. Disponible en doi:10.1002/14651858.CD012949.PUB2.
- [315] Lin J, Zhang Y, He C, Dai J. Probiotics supplementation in children with asthma: A systematic review and meta-analysis. *J Paediatr Child Health*. 2018 Sep;54(9):953-61. Disponible en doi:10.1111/JPC.14126.

- [316] Joint FAO/WHO Expert Consultation. Probiotics in food. Health and Nutrition Properties of Probiotics in Food including Powder Milk with Live Lactic Acid Bacteria; 2006. Disponible en: <https://www.fao.org/3/a0512e/a0512e.pdf> [Citado el 26 de abril de 2023].
- [317] Hao Q, Dong BR, Wu T. Probiotics for preventing acute upper respiratory tract infections. *Cochrane Database Syst Rev*. 2015 Feb;2015(2):CD006895. Disponible en doi:10.1002/14651858.CD006895.PUB3.
- [318] Lee CH, Choi Y, Seo SY, Kim SH, Kim IH, Kim SW, et al. Addition of probiotics to antibiotics improves the clinical course of pneumonia in young people without comorbidities: a randomized controlled trial. *Sci Rep*. 2021 Dec;11(1):1-9. Disponible en doi:10.1038/s41598-020-79630-2.
- [319] Bo L, Li J, Tao T, Bai Y, Ye X, Hotchkiss RS, et al. Probiotics for preventing ventilator-associated pneumonia. *Cochrane Database Syst Rev*. 2014 Oct;(10):CD009066. Disponible en doi:10.1002/14651858.CD009066.PUB2.
- [320] Oliveira G, González-Molero I. Actualización de probióticos, prebióticos y simbióticos en nutrición clínica. *Endocrinol y Nutr*. 2016 Nov;63(9):482-94. Disponible en doi:10.1016/J.ENDONU.2016.07.006.
- [321] Ding T, Song T, Zhou B, Geber A, Ma Y, Zhang L, et al. Microbial composition of the human nasopharynx varies according to influenza virus type and vaccination status. *MBio*. 2019 Jul;10(4):e01296-19. Disponible en doi:10.1128/MBIO.01296-19.
- [322] Laclaire L, Facklam R. Antimicrobial Susceptibility and Clinical Sources of *Dolosigranulum pigrum* Cultures. *Antimicrob Agents Chemother*. 2000 Jul;44(7):2001-3. Disponible en doi:10.1128/AAC.44.7.2001-2003.2000.