

INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL "PEDRO KOURÍ"
CENTRO DE INVESTIGACIÓN, DIAGNÓSTICO Y REFERENCIA
DEPARTAMENTO DE VIROLOGÍA

**Caracterización molecular del Coxsackievirus A24v en
Cuba, 1986-2009**

*TESIS PRESENTADA EN OPCIÓN AL GRADO CIENTÍFICO DE
DOCTOR EN CIENCIAS DE LA SALUD*

Autor: Lic. Magilé de la Caridad Fonseca Quintana, MSc

Tutores: Prof. Titular; Dra. Sonia Resik, DrC

Prof. Titular; Mayra Muné, DrC

Asesores: Prof. Mario Pupo Meriño, MSc

Prof. Luis Antonio García González, MSc

LA HABANA, 2019

La FE

es el pájaro que canta cuando el amanecer todavía está

OSCURO

Rabindranath Tagore

Agradecimientos

Posiblemente la sección más difícil de la tesis resulte la presente, por el simple hecho de aunque no sea la intención, algún(os) nombre(s) pueden quedar omitidos sin merecerlo.

Agradecer a

Dios, a mis Padres y a la madre Natura, por permitirme existir rodeada de eterno amor incondicional, apoyo, fuerza y confianza.

A mi hijo, por ser la principal razón de mi vida y fuerza motriz que me ha permitido seguir adelante bajo cualquier circunstancia sin tregua al cansancio, la desilusión y la derrota.

A mi compañero, novio, esposo, amigo y confidente, que por más de diez años ha logrado sobrevivir a todo lo que he significado, siempre fiel y amante, Gracias.

Al resto de mis familiares: hermanos, sobrinos, primos, tíos y en especial a las dos parejas inolvidables y queridas de mis abuelos, a todos, gracias por el apoyo y el cariño infinito durante todos estos años.

A mis madres y padre adoptivos que durante casi 22 años han hecho mejor mis días colmándolos de comprensión y cariño, gracias Isa, Tere, Dalgis, Luis y Haila.

A mi ángel de la guarda y guía científico, mi amigo Luis Sarmiento.

A la eterna e incansable abogada defensora de los sin tierra, mi estimada Clarita, gracias infinitas por todo tu apoyo durante todo este tiempo de tanto batallar.

Al dúo dinámico de Mario y Luis por permitirme hacer realidad este sueño anhelado que anduvo largo camino, hasta que felizmente la vida los puso en el momento indicado, gracias por tantos conocimientos, cariño y por soportarme.

A las Dras. Helene Norder y María G. Guzmán por sus apoyos y conocimientos en las diferentes etapas de los estudios.

A las tutoras por la paciencia e invaluable ayuda cada vez que fue necesaria, así como a todos los oponentes que permitieron la mejora continua del documento y de mi formación.

A mis otras hermanas y hermanos, a todas las amigas y buenas compañeras, que no mencionaré el nombre por temor al orden en que podrían ser mencionadas, pero a todos y a cada una de ellos, ya sea los cercanos o los más distantes separados por cientos de millas, o kilómetros; las ausentes, en horas, días o años, pero siempre presentes, gracias por formar parte de mi vida, gracias por el cariño y el apoyo.

A todas las personas que brindaron cariño, apoyo, confianza y ayuda en la realización de este estudio, documento y hecho en sí, tanto del IPK, del SMI, como de la UCI.

Y por último y no menos importantes, a todos aquellos que una y otra vez cortaron algunas o todas las flores, pero nunca lograron detener la primavera, permitiendo así que su disfrute fuera más pleno y celestial.

A todos *Gracias*.

*A mis Padres e Hijo,
Fuentes de Inspiración y Continuidad*

LISTADO DE ABREVIATURAS Y UNIDADES DE MEDIDAS

‰: porcentaje

°C: grados Celsius

µL: micro litros

µM: micro molar

ppm: parte por millón

% HPD: porcentaje de densidad posterior más alta, siglas del inglés highest posterior density

aa: referente a aminoácido(s) según el contexto

ADN: ácido desoxirribonucleico

AIC: Criterio de Información de Akaike, siglas del inglés Akaike Information Criterion

ARN: ácido ribonucleico

ARNt: ácido ribonucleico de transferencia

BEAST: programa de inferencia filogenética, siglas del inglés Bayesian Evolutionary Analysis Sampling Trees

BF: factor de Bayes

BIC: Criterio de Información Bayesiano, siglas del inglés Bayesian Information Criterion

BSP: modelo de coalescencia no paramétrico Bayesian Skyride Plot

cDNA: ADN complementario

cDNAs: ADN complementarios

CPHE: Centro Provincial de Higiene y Epidemiología

CsCl: cloruro de Cesio

CV-A24: coxsackievirus A24

CV-A24v: variante antigénica del Coxsackievirus A24

ECP: efecto citopático

EDTA: ácido etilendiaminotetraacético

EUA: Estados Unidos de América

EV: enterovirus

EV-D70: enterovirus de la especie D 70

F81: modelo de Felsenstein

g: gravedades

GA: Genotipo A

GB: Genotipo B

GC: Genotipo C

GD: Genotipo D

GE: Genotipo E

GI: Genotipo I

GII: Genotipo II

GIII: Genotipo III

GIV: Genotipo IV

GTR: modelo de sustitución nucleotídica Tiempo Reversible General, siglas del inglés General Time Reversible

HeLa: línea celular, siglas del nombre Henrietta Lacks

HEp-2: línea celular de carcinoma laríngeo

HKy85: modelo Hasegawa-Kishino-Yano

hLTRs: prueba jerárquica del radio de verosimilitud

HTU: unidades taxonómicas hipotéticas, siglas del inglés hypothetical taxonomic units

IFN: interferón

IFNs: interferones

IgA: inmunoglobulina A

IgG: inmunoglobulina G

IgM: inmunoglobulina M

IPK: Instituto de Medicina Tropical Pedro Kourí

JC: Jukes-Cantor

MCC: árbol de mayor credibilidad, siglas del inglés Maximum Clade Credibility

MCMC: cadenas de Markov y Monte Carlo

MEGA6: programa de inferencia filogenética versión 6.0, siglas del inglés Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0

mg: miligramo

MINSAP: Ministerio de Salud Pública

ML: máxima verosimilitud, siglas del inglés Maximun Likelihood

mL: mililitro(s)

mM: milimolar

MP: máxima parsimonia

MRC-5: células embrionarias de pulmón humano

Ne: tamaño de población efectiva

NJ: Neighbor-joining

NPEV: enterovirus no polio, siglas del inglés Non-polio Enteroviruses

nt: nucleótido

NTR: región no traducida del genoma, siglas del inglés non translate region

OPS: Organización Panamericana de la Salud

ORF: marco abierto de lectura, siglas del inglés Open Reading Frame

OTU: unidades taxonómicas operacionales, siglas del inglés operational taxonomic units

UCED: distribución exponencial no correlacionada, siglas del inglés uncorrelated exponential distribution

UCLD: distribución logarítmica normal no correlacionada, siglas del inglés uncorrelated logaritmic distribution

PFA: parálisis flácida aguda, siglas del inglés acute flaccid paralysis

pb: pares de base

pmol: pico moles

RCP: reacción en cadena de la polimerasa

RD: línea celular de rhabdomiosarcoma humano

SNC: sistema nervioso central

TBE: disolución tampón formada por Tris, Borato y EDTA

TCID50: 50 % de la Dosis Infecciosa en Cultivo de Tejidos, siglas del inglés Tissue Culture Infective Dose

TMRCA: tiempo del ancestro común más reciente, siglas del inglés most recent common ancestor

TrN: modelo de sustitución nucleotídica siglas del nombre Tamura Nei

TR-RCP: reacción de transcripción reversa y reacción en cadena de la polimerasa

UPGMA: método de inferencia filogenética, siglas del inglés unweighted pair group method with arithmetic means

VEB: virus de Epstein-Barr

Vero: línea celular de riñón de mono verde africano

VHS: virus Herpes Simple

VIH: virus de la Inmunodeficiencia Humana

VVZ: virus de la Varicela Zóster

CONTROL SEMÁNTICO

Identidad de secuencias nucleotídicas: número de residuos idénticos entre 2 o más secuencias.

Homología de secuencias nucleotídicas: dos o más secuencias son homólogas cuando provienen de un ancestro común. Es una medida cualitativa.

HPD del 95% o 95% HPD: Intervalo de densidad posterior más alta (HPD). Un intervalo que representa la incertidumbre de una estimación de parámetros en la inferencia bayesiana. El HPD es el intervalo más corto en el espacio de parámetros que contiene x% de los valores muestreados, con x generalmente siendo 95.

SÍNTESIS

Se presenta el análisis filogenético y filodinámico de las regiones genómicas parciales 3C y VP1 de cepas de la variante antigénica del Coxsackievirus A24 (CV-A24v), aisladas en cinco periodos epidémicos de conjuntivitis hemorrágica aguda ocurridos en Cuba, entre los años 1986 y 2009. Se identificó que cada periodo fue causado por variantes genéticas diferentes, y homólogas a variantes que circularon en Las Américas, África y Asia. En cada etapa epidémica el virus se introdujo al país y pudo estar circulando entre uno a dos años previos a los picos epidémicos. El virus mostró una población efectiva estable en el tiempo, aumentando en los periodos pandémicos, con una tasa de sustitución nucleotídica (sustituciones/sitio/año) de $4,39 \times 10^{-3}$ para la región 3C y $5,80 \times 10^{-3}$ para VP1. Se obtuvieron 19 rutas de transmisión viral para la región genómica 3C y 25 rutas para VP1. Las rutas de introducción del virus a Cuba en los periodos epidémicos de los años 1986, 1997, 2003 y 2008-2009 se infirieron por las relaciones de ancestralidad de las secuencias cubanas con secuencias de países destinos de algunas rutas, avaladas por redes de transmisión viral. Se observaron cambios aminoacídicos en ambas regiones genómicas que pueden involucrarse en la evolución de las variantes genéticas. Finalmente, se obtuvieron evidencias que apoyan el uso de las heces para identificar al CV-A24v causante de conjuntivitis hemorrágica aguda. Los resultados de este estudio aportan nuevos conocimientos en la epidemiología molecular del CV-A24v que circuló en Cuba y el mundo en el periodo estudiado.

TABLA DE CONTENIDOS

	Pág.
I. INTRODUCCIÓN	
I.1 Antecedentes	2
I.2 Hipótesis de trabajo	5
I.3 Objetivos	5
I.4 Novedad científica	5
I.5 Valor teórico y práctico	6
I.6 Publicaciones científicas	7
I.7 Eventos científicos	8
II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	
II.1 Historia epidemiológica de la Conjuntivitis Hemorrágica Aguda en el mundo	10
II.1.1 EV-D70	10
II.1.2 CV-A24v	11
II.2 Clasificación taxonómica del CV-A24v	12
II.3 Estructura del virus y organización del genoma	14
II.4 Proteínas virales	16
II.4.1 Proteínas estructurales	16

II.4.2 Proteínas no estructurales	17
II.5 Propiedades físicas y químicas	19
II.6 Patogenia	19
II.7 Manifestaciones clínicas de la Conjuntivitis Hemorrágica Aguda	20
II.8 Respuesta inmune	22
II.9 Diagnóstico virológico	23
II.9.1 Muestras clínicas	23
II.9.2 Procedimientos para el diagnóstico virológico	24
II.10 Análisis filogenéticos y filodinámicos	26
II.11 Epidemiología del CV-A24v	33
II.11.1 Reservorio	33
II.11.2 Período de incubación y transmisibilidad	33
II.11.3 Prevención	34
II.11.4 Tratamiento	34
II.11.5 Distribución geográfica	36
II.12 Conjuntivitis Hemorrágica Aguda en Cuba	36
III. MATERIALES Y MÉTODOS	
III.1 Diseño general de la investigación	40
III.2 Identificación y caracterización filodinámica de las variantes genéticas del CV-A24v causantes de las epidemias cubanas de Conjuntivitis Hemorrágica Aguda durante el período 1986-2009	40
III.2.1 Muestras	40
III.2.2 Extracción del ARN viral	42
III.2.2.1 Extracción del ARN viral por el método por Trizol	42
III.2.2.2 Extracción del ARN con el estuche comercial	43

QIAamp® Viral RNA

III.2.3	Secuenciación nucleotídica de regiones genómicas parciales del CV-A24v: la proteasa 3C y la proteína estructural VP1	43
III.2.3.1	TR-RCP para la amplificación de regiones genómicas parciales 3C y VP1 del CV-A24v	43
III.2.3.2	Purificación de los productos de la RCP	44
III.2.3.3	Secuenciación nucleotídica	45
III.2.4	Análisis de las secuencias	45
III.2.4.1	Identidad de los aislamientos cubanos del CV-A24v respecto a la cepa prototipo EH24_70_Singapur 1970	45
III.2.4.2	Alineamientos de secuencias nucleotídicas para los análisis filogenéticos y filodinámicos de las regiones genómicas parciales 3C y VP1 del CV-A24v	45
III.2.4.3	Determinación de los eventos de recombinación en los alineamientos del CV-A24v y entre los alineamientos del CV-A24v con el resto de los serotipos de la especie C de los enterovirus	47
III.2.4.4	Análisis filogenéticos y filodinámicos de las regiones genómicas parciales 3C y VP1 del CV-A24v	47
III.3	Caracterización molecular de las secuencias cubanas del CV-A24v mediante la determinación de los cambios aminoacídicos respecto a la cepa prototipo EH24_70_Singapur 1970 en las regiones genómicas parciales 3C y VP1	50
III.4	Análisis molecular de las cepas del CV-A24v cubanas obtenidas a partir de muestras clínicas de heces	50
III.4.1	Muestras	50
III.4.2	Análisis moleculares	50
III.5	Consideraciones éticas de la investigación	51
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN		
IV.1	Identificación de las variantes genéticas del CV-A24v que	53

circularon durante los períodos epidémicos cubanos de Conjuntivitis Hemorrágica Aguda, 1986-2009	
IV.1.1 Secuenciación nucleotídica	53
IV.1.2 Identidad de las secuencias cubanas del CV-A24v respecto a la cepa prototipo EH24_70_Singapur 1970	54
IV.1.3 Conjuntos de alineamientos de secuencias nucleotídicas para los análisis filogenéticos y filodinámicos de las regiones genómicas parciales 3C y VP1 del genoma del CV-A24v	55
IV.1.4 Eventos de recombinación en los alineamientos del CV-A24v y entre los alineamientos del CV-A24v con el resto de los serotipos de la especie C de los enterovirus	57
IV.1.5 Inferencias filogenéticas de los periodos epidémicos cubanos de Conjuntivitis Hemorrágica Aguda, 1986-2009	57
IV.1.6 Periodicidad de las epidemias cubanas de Conjuntivitis Hemorrágica Aguda, 1986-2009	69
IV.2 Caracterización filodinámica y molecular del CV-A24v	72
IV.2.1 Caracterización filodinámica del CV-A24v en base a las regiones genómicas parciales 3C y VP1	72
IV.2.2 Cambios aminoacídicos en las regiones genómicas parciales 3C y VP1 de las secuencias cubanas respecto a la cepa prototipo EH24_70_Singapur 1970	81
IV.3 Análisis molecular las cepas del CV-A24v cubanas obtenidas a partir de heces	87
V. DISCUSIÓN GENERAL	95
VI. CONCLUSIONES	101
VII. RECOMENDACIONES	103
VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	105
ANEXOS	

I. INTRODUCCIÓN

I. INTRODUCCIÓN

I.1 Antecedentes

La Conjuntivitis Hemorrágica Aguda figura entre las enfermedades emergentes y reemergentes causadas por los enterovirus con elevado índice de morbilidad y costo económico a nivel mundial (1-3). Debe su denominación al principal signo que la caracteriza: la presencia en la conjuntiva de hemorragias que se manifiestan como pequeñas petequias hasta francos sangramientos “en sábana”.

La enfermedad se describió por primera vez en Ghana en el año 1969 donde se identificó al Enterovirus 70 (EV-D70) como su agente etiológico (4). Casi a la par, otro foco epidémico de una enfermedad con los mismos signos y síntomas se describió en Singapur en el año 1970, donde se identificó a una variante antigénica del Cocksackievirus A24 (CV-A24v) como el agente causal (5). Hasta la década de los años 90, numerosas epidemias causadas por el EV-D70 se informaron desde todos los continentes. Sin embargo, el CV-A24v se convirtió en el agente etiológico prevalente hasta nuestros días, responsable de cuatro periodos pandémicos sucesivos. El primero, el período emergente en la década de los años 70, que se caracterizó por una limitada propagación en el sudeste asiático y la India. El segundo, una etapa de expansión durante la década de los años 80, distinguido por varias epidemias en el noreste de Asia, África, algunos países europeos y en el hemisferio occidental. Un tercer periodo pandémico menos explosivo, en la década de los años 90, donde se reportó un menor número de epidemias en diferentes latitudes (6, 7) y finalmente, el cuarto periodo que se inició en el continente asiático y que presenta, hasta el momento, tres oleadas pandémicas: 2000-2004, 2008-2010 y 2014-2017 (8-11). Cuba no estuvo libre del azote de esta enfermedad. A partir del año 1981 y hasta la actualidad, acontecieron ocho importantes períodos epidémicos de conjuntivitis hemorrágica aguda, dos causados por el EV-D70 (en los años 1981-1984 y 1989-1990) y seis por el CV-A24v (en los años 1986-1987; 1992-1993, 1997, 2003-2005, 2008-2009 y el último en el año 2017) (12-14). La enfermedad es altamente

contagiosa con una tasa de ataque estimada, según los estudios epidemiológicos, entre el 70-100 % en los miembros de una familia y el 45-58 % en la población (15, 16). Se caracteriza por un corto período de incubación, un inicio explosivo de los signos y síntomas, una afectación ocular bilateral y una fase de recuperación rápida, sin secuelas oculares significativas. Los síntomas y signos clínicos incluyen dolor ocular intenso, fotofobia, visión borrosa, sensación de cuerpo extraño, lagrimeo, hiperemia conjuntival con hemorragias subconjuntivales de tamaño variable, edema y quemosis palpebrales. También se describen manifestaciones sistémicas, como síntomas respiratorios, tos, faringitis, mialgia, malestar general, cefalea, enfermedad gastrointestinal, fiebre y linfadenopatía periauricular. Los síntomas generalmente comienzan después de un período de incubación de 24 a 48 horas, persisten durante tres a cinco días y desaparecen en una a dos semanas. La mayoría de los casos son autolimitados sin secuelas, aunque en raras ocasiones (1/10 000), puede aparecer una parálisis similar a la causada por los poliovirus, asociada fundamentalmente al EV-D70, así como diferentes afectaciones de la córnea originadas por una infección bacteriana secundaria (17, 18).

Las epidemias generalmente llevan a una congestión significativa de los servicios de atención médica y parálisis de algunos servicios públicos donde confluye un gran número de personas como las escuelas, centros de trabajo y centros recreativos, entre otros. En ausencia de terapias específicas, el único modo efectivo de control consiste en las medidas de higiene para limitar la propagación de la infección, que puede transmitirse por el contacto directo con las secreciones oculares infectadas y con los elementos utilizados por los pacientes y el personal médico, así como por aerosoles (vía respiratoria) y las heces (vía fecal-oral) (19, 20).

El diagnóstico de la conjuntivitis hemorrágica aguda se basa esencialmente en las características clínicas y la identificación del agente etiológico que justifica los beneficios de la vigilancia epidemiológica, la educación de los médicos y pacientes, la definición del proceso patológico y la evaluación de las implicaciones terapéuticas. (11). El aislamiento viral en cultivo de células, la detección de antígenos víricos por inmunofluorescencia, la detección directa por microscopía electrónica y por la amplificación y secuenciación de los

ácidos nucleicos víricos son algunos de los métodos que se emplean para identificar el agente etiológico (21-23).

El análisis filogenético es otro método que se utiliza para el estudio de la epidemiología molecular del CV-A24v (6, 22). La región del genoma que codifica para la proteasa principal del virus (3C) es una de las regiones más estudiada por su conservación estructural distintiva en las cepas circulantes (24-26). Sin embargo, en las últimas décadas, el análisis de la región (completa o parcial) de la proteína estructural VP1 ha tomado auge por su correspondencia con los serotipos y genotipos (intra e inter serotipos) ya que contiene los sitios antigénicos principales de la cápside (27-29). Mediante estos estudios se describen cuatro genotipos GI-GIV en base a la región del genoma 3C que se hacen corresponder, excepto el GII, con el análisis de la región estructural VP1. Además, se han podido estimar las fechas de aparición de los genotipos o de las cepas circulantes en los diferentes periodos epidémicos, la relación genética entre las cepas y, con ello, la confirmación o no de los datos epidemiológicos encontrados, así como la evolución molecular de esta variante antigénica en el tiempo (6, 27).

Recientemente, las investigaciones epidemiológicas moleculares a través de los análisis filogenéticos y los filodinámicos marcan pautas en el abordaje de los eventos epidémicos emergentes o reemergentes de numerosos patógenos, tanto virales como bacterianos (30, 31). Estas herramientas innovadoras han perfeccionado grandemente las investigaciones científicas acerca de la estimación del origen temporal y geográfico, la historia evolutiva y los factores de riesgos ecológicos en la emergencia y la dispersión de los patógenos a través de la integración de los datos epidemiológicos y las secuencias moleculares en un solo marco estadístico (30, 32).

La reconstrucción de ambos: la historia evolutiva y los procesos espaciales a partir de las secuencias provee una comprensión elemental en la dinámica evolutiva de las epidemias que puede traducirse en el desarrollo de estrategias de intervención y prevención más efectivas y en la identificación de factores claves en la transmisión del patógeno (30, 33, 34).

En este sentido, la investigación que se presenta pretende realizar una caracterización molecular con un enfoque filogenético y filodinámico del CV-A24v causante de cinco periodos epidémicos de conjuntivitis hemorrágica aguda ocurridos en Cuba entre los años

1986 y 2009 y analizar a nivel molecular los aislamientos de estos virus obtenidos a partir de diferentes muestras clínicas, en aras de enriquecer los estudios cubanos previos que se focalizaron en la identificación del agente etiológico y una mera descripción epidemiológica de cada evento epidémico (13, 35, 36).

I.2 Hipótesis de trabajo

Las características filogenéticas, filodinámicas y estructurales de las cepas cubanas del CV-A24v evaluadas a partir de las secuencias nucleotídicas de fragmentos genéticos de la proteasa 3C y la proteína estructural VP1 permiten asociarlas con la reemergencia de variantes genéticas a nivel mundial.

I.3 Objetivos

General

Caracterizar a nivel molecular las cepas de CV-A24v causantes de los brotes epidémicos de conjuntivitis hemorrágica aguda ocurridos en Cuba entre los años 1986-2009.

Específicos

1. Identificar las variantes genéticas del CV-A24v que circularon en Cuba durante los cinco periodos epidémicos de conjuntivitis hemorrágica aguda (1986-2009).
2. Determinar las características filodinámicas y moleculares de las variantes genéticas cubanas del CV-A24v.
3. Analizar a nivel molecular las cepas de CV-A24v causante de conjuntivitis hemorrágica aguda obtenidas a partir de muestras clínicas de heces.

I.4 Novedad científica

- ✓ Constituye el primer estudio filogenético en Cuba de cepas del CV-A24v aisladas de todos los períodos epidémicos de conjuntivitis hemorrágica aguda ocurridos en el país entre los años 1986 y 2009.

- ✓ Por primera vez se incluyen secuencias cubanas en una caracterización filodinámica de las variantes genéticas del CV-A24v que circularon durante todos los períodos epidémicos de conjuntivitis hemorrágica aguda entre los años 1986 y 2009 representativos de los ocurridos en la región de las Américas, particularmente en el Caribe, y con ello se identificaron posibles rutas de diseminación del virus a nivel mundial.
- ✓ Los resultados aportan nuevas evidencias a nivel internacional para una redefinición del origen temporal del genotipo GIV del CV-A24v.
- ✓ Los resultados aportan conocimientos acerca de las características moleculares de la región genómica de la proteasa 3C del CV-A24v que pueden utilizarse en los estudios actuales desarrollo de antivirales dirigidos contra esta diana viral.
- ✓ Se evidenció estructuralmente que en las variantes genéticas del CV-A24v existe variabilidad aminoacídica, en la proteasa 3C en sitios funcionales, y en la proteína VP1 se localiza fundamentalmente en la región del cañón donde se sitúan los sitios antigénicos.
- ✓ Los resultados fortalecen la validez de las heces como muestra clínica para la identificación etiológica del CV-A24v en todas sus formas clínicas de presentación.

I.5 Valor teórico y práctico

La investigación permitió la caracterización molecular de las variantes genéticas del CV-A24v causantes de cinco periodos epidémicos de conjuntivitis hemorrágica aguda ocurridos en Cuba hasta el año 2009. De esta forma se incluyeron en las bases de genes internacionales 322 secuencias nucleotídicas del CV-A24v (149 secuencias parciales de la región genómica VP1 y 173 secuencias de la región genómica 3C), representativas además, de las que circularon en la región de las Américas durante esos periodos epidémicos. Por otro lado se brindaron nuevas evidencias que avalan la utilidad de ambas regiones genómicas, 3C y VP1, para el desarrollo de estudios de epidemiología molecular del CV-A24v.

Se identificaron las relaciones de ancestralidad de las cepas cubanas con las reportadas en la literatura, así como, posibles rutas de introducción del virus al país, lo que tributa, directamente, al sistema de Sistema Nacional de Salud y al de Control Sanitario Internacional para el desarrollo de estrategias oportunas en el enfrentamiento de nuevas epidemias.

Estos estudios posibilitaron la introducción de nuevas metodologías y algoritmos diagnósticos, como la secuenciación nucleotídica específica del CV-A24v y el uso de las heces, para el manejo de las epidemias de conjuntivitis hemorrágica aguda en el Laboratorio Nacional de Referencia de Enterovirus del IPK.

Los resultados de la presente investigación constituyen la base metodológica para el desarrollo de futuras investigaciones filogenéticas y filodinámicas de otros enterovirus y agentes virales en general.

Parte de los resultados han sido objeto de reconocimientos como son:

- ✓ Resultado Relevante del IPK en el año 2014.
- ✓ Premio Nacional de la Academia de Ciencias de Cuba en el año 2015, Biomedicina.
- ✓ Premio en el Concurso Central del premio anual de Salud en la categoría de investigación aplicada en el año 2016.
- ✓ Premio en el Concurso Nacional del premio anual de Salud en la categoría de investigación aplicada en el año 2016.

Parte de los resultados, fueron objeto de una publicación internacional y una nacional, así como aparecen recogidos en un capítulo de libro publicado por una editora científica extranjera de alto prestigio y difusión internacional, además se han presentado en cuatro eventos científicos. Algunos de los estudios realizados formaron parte de una tesis para optar por el grado de Licenciado en Microbiología en el año 2011.

I.6 Publicaciones científicas

Fonseca MC, Sarmiento L, Resik S, Pereda N, Rodríguez H, Kourí V, Martínez PA, Piñón A, Limonta D, Más P, Hung LH. Isolation of Coxsackievirus A24 variant from patients with hemorrhagic conjunctivitis in Cuba, 2008-2009. *J Clin Virol* 2012; (53)77– 81.

Fonseca MC and Sarmiento L. Hemorrhagic conjunctivitis: Epidemiological, clinical and virological findings from 45 years of study. In: Elias H Bazile, editor. *Conjunctivitis: Etiology, Diagnosis and Clinical Management*. New York: Nova Science Publishers 2014. p 73-90.

Fonseca Quintana MC, Sarmiento Pérez L, Resik Aguirre S, Martínez Montesino Y, Heng Hung L, Valdez O, Piñón Ramos A, Muné M, Gonzalez G1, Kourí V, Morier Díaz L, Mendoza Llanes D, Rodríguez H. Detección y Alerta de Enterovirus Emergentes y Reemergentes *Anales de la Academia de Ciencias de Cuba* 2015; 5(3).

I.7 Eventos científicos

Capacitación en la reunión Nacional del Directores Provinciales de los CPHE. C. Habana. Epidemia de Conjuntivitis hemorrágica, Cuba 2008. Cuba 2008.

Congreso 70 Aniversario del IPK. VII Congreso Cubano de Microbiología y Parasitología. IV Congreso Nacional de Medicina Tropical Epidemia de Conjuntivitis Hemorrágica, Cuba 2008. Cuba 2009.

Mención en la Jornada Científica BTJ del departamento de Virología e institucional (IPK). Etiología de la conjuntivitis hemorrágica en Cuba, 2008-2009, Cuba 2011.

1er Taller de Virología: Avances y Retos. Enfermedades Emergentes y Reemergentes causadas por Enterovirus en Cuba. Cuba 2013.

BioinfOMICS. An integrative analysis of evolutionary pressures over 3C and VP1 segments in Coxsackievirus A24v. Cuba, 2019.

International Symposia Advances in Immunology and Therapy of infectious diseases: from Bench to Bed, 2nd Edition. La Habana, Phylogenetic and phylodinamic of Coxsackievirus A24 variant in Cuba over a 23- years. 1986-2009. Cuba, 2019.

II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

II.1 Historia epidemiológica de la Conjuntivitis Hemorrágica Aguda en el mundo

Los primeros reportes de una conjuntivitis hemorrágica datan del año 1969 en Accra y otras ciudades de Ghana y Nigeria (4, 37). Esta nueva infección del ojo, denominada conjuntivitis hemorrágica aguda, se distinguió por hemorragias subconjuntivales, que se presentaron desde discretas petequias hasta hemorragias confluentes (12). Simultáneamente, una enfermedad con características clínicas y epidemiológicas similares a la observada en África, apareció en Java (Indonesia) y se extendió a la totalidad del Asia Suroriental entre 1969-1970 (38).

Se identificaron como los agentes etiológicos a dos nuevos serotipos de enterovirus: el enterovirus 70 (EV-D70) en la región de África y una variante antigénica del virus coxsackie A24 (CV-A24v) en el sudeste asiático (39, 40).

II.1.1 EV-D70

La conjuntivitis hemorrágica aguda causada por el EV-70 se conoció como enfermedad "Apollo", debido a la coincidencia de la aparición de la infección con la salida de los primeros hombres hacia la luna en la denominada misión "Apolo 11". Se extendió hacia el sureste y noroeste a lo largo de la costa occidental de África (Nigeria, Marruecos, Argelia, y Libia), donde alcanzó proporciones epidémicas. Simultáneamente, otro foco epidémico se describió en el sudeste asiático: Indonesia, Singapur, Camboya, Filipinas, Viet Nam, China, Japón y la India, pero no fue hasta 1971, cuando Kono y sus colaboradores identificaron al EV-D70 como uno de los agentes etiológicos responsable de los brotes (39, 41). Entre los años 1969 y 1974, el EV-D70 mostró un período emergente caracterizado por la transmisión en las zonas costeras tropicales y subtropicales del hemisferio oriental fundamentalmente, aunque también se informaron brotes pequeños en Europa (Inglaterra, Francia, Rusia y Yugoslavia) (19, 42).

No fue hasta el inicio de la década de los años 80 que se detectó la enfermedad en Las Américas y Australia. Los primeros casos en el hemisferio occidental se informaron en Brasil y posteriormente la enfermedad apareció como epidemias explosivas al norte del continente suramericano: las Islas del Caribe, América Central, los Estados Unidos (Florida, Minnesota, California, Nueva York y Ontario) y Canadá. En el mismo periodo ocurrieron otras epidemias en Nigeria, Zaire, India, Singapur y Pakistán (42, 43).

Las últimas descripciones de epidemias debido al EV-D70 corresponden a la década de los años 90 cuando se registraron algunos brotes en Israel, Arabia Saudita, India, Japón y en las islas del Caribe (19, 44)

Ya en el siglo XXI se identificó el EV-D70 en algunos casos de conjuntivitis viral entre julio del año 2013 y septiembre del año 2014 en Ankara, Turquía (45).

II.1.2 CV-A24v

La frecuente participación del CV-A24v en epidemias de conjuntivitis hemorrágica aguda y la naturaleza extremadamente contagiosa de esta infección ocular se evidenció claramente en los explosivos y extensos brotes en Singapur, Malasia y Hong Kong en el año 1970. En el año 1975 en Singapur, Hong Kong, India, Bangladesh, Sri Lanka, Brunei, y Tailandia; Malasia y Sri Lanka en el año 1978; y la India y Vellore en el año 1979. En algunos brotes epidémicos de CV-A24v circuló también el EV-D70 (46, 47).

En contraste con la diseminación rápida y amplia del EV-D70, solo se reportaron brotes del CV-A24v en el sudeste asiático o el subcontinente indio durante 15 años. Las epidemias en otros países asiáticos, incluyendo Taiwán, Corea y Japón se produjeron a partir del año 1985. De igual forma, se detectó por primera vez en África (Túnez, Congo, Angola, Ghana y Nigeria) y el hemisferio occidental en 1986, donde se informaron epidemias en las islas del Caribe, Centroamérica, Estados Unidos y América del Sur (Brasil) (48, 49).

La década de los años 90 se caracterizó por pocas notificaciones y se le denominó como periodo "silencioso" o menos explosivo, aunque se informaron brotes en Tailandia en el año 1992 y en Pakistán, Túnez y Taiwán entre los años 1993 y 1994, (50-52). Otras epidemias de conjuntivitis hemorrágica aguda se describieron desde numerosas islas caribeñas entre los años 1997 y 1998 (49, 53). En China y la India, también se documentaron epidemias en el año 1997 y de Francia existe una secuencia en el banco de genes GenBank de un paciente de

conjuntivitis hemorrágica aguda del año 1998 sin información adicional respecto algún brote ocurrido en este país (54, 55).

A partir del año 2000, se describió un período reemergente del CV-A24v con una propagación extremadamente rápida en todo el mundo desde el primer informe en Corea del Sur y en Malasia, donde continuó hasta el año 2003. Esta nueva oleada pandémica se extendió desde el sudeste asiático abarcando nuevamente países africanos (Túnez, Nepal, Congo, Marruecos, Uganda, Sudán), europeos como España, en el Medio Oriente como Pakistán y en Las Américas (Brasil, Guyana Francesa, Islas Guadalupe, Martinica y Puerto Rico) (6, 7, 49, 56). Otra dos oleadas epidémicas sobrevinieron posteriormente abarcando países como Taiwán, Japón, China, India, Brasil, Uganda, Egipto, Gambia entre los años 2006-2011 (9, 57-60). Grandes epidemias se informaron desde Mayotte, el archipiélago de Comoras, Madagascar, Mauricio en el año 2012, Tailandia en el año 2014, y en México, Panamá, Nicaragua, Granada, Belice, Guyana Francesa, Islas Turcas y Caicos, República Dominicana, Bahamas, Martinica, Guadalupe, Surinam y Brasil en el año 2017 (11, 61).

II.2 Clasificación taxonómica del CV-A24v

El coxsackievirus A24 causante de la conjuntivitis hemorrágica aguda (CV-A24v) es una variante antigénica del coxsackievirus A24 (CV-A24), aislado de casos con parálisis flácida aguda e individuos asintomáticos (23). Esta variante antigénica pertenece a la especie C del género *Enterovirus* (del griego enteron: intestino) (Tabla 1), que a su vez corresponde al orden *Picornavirales*, familia *Picornaviridae*, (pico: pequeño; rna: genoma ácido ribonucleico (ARN); viridae: virus) (23, 62).

Se plantea que los miembros dentro de una misma especie del género *Enterovirus* muestran más del 70 % de identidad aminoacídica en la poliproteína, más del 60 % de identidad aminoacídica en la región P1 y más del 70 % de identidad en las regiones no estructurales 2C, 3CD y la composición de bases nitrogenadas del genoma (G+C) no varía más de un 25 % (62). Además, utilizan una variedad limitada de receptores celulares, infectan un variedad de hospederos naturales limitada, muestran un grado significativo de compatibilidad en el procesamiento proteolítico, la replicación, encapsulación y la recombinación genética, así como una organización del genoma común (62).

Tabla 1. Clasificación actual de los serotipos enterovirales que afectan a los humanos.

Especies	Serotipos	Número de Serotipos
Enterovirus A	CV-A2-A8, CV-A10, CV-A12, CV-A14, CV-A16, EV-A71, EV-A76, EV-A89, EV-A90, EV-A91, EV-A92, EV-A114, EV-A120, EV-A121, enterovirus simios SV19, SV43, SV46, enterovirus babuino 13 (B13)	25
Enterovirus B	CV-B1-B6, CV-A9, E1-9, E11-21, E24-27, E29-33, EV-69, EV-B73-75, EV-B77-88, EV-B93, EV-B97, EV-B98, EV-B100, EV-B101, EV-B106, EV-B110, EV-B111, enterovirus simio SA5	61
Enterovirus C	PV1-3, CV-A1, CV-A11, CV-A13, CV-A17, CVA19-22, CV-A24, EV-C95, EV-C96, EV-C99, EV-C102, EV-C104, EV-C105, EV-C109, EV-C113, EV-C116, EV-C117, EV-C118	23
Enterovirus D	EV-D68, EV-D70, EV-D94, EV-D111, EV-D120	5

Leyenda: CV-A: Coxsackievirus A, CV-B: Coxsackievirus B, E: Echovirus, EV: Enterovirus, PV: Poliovirus. Fuente: *editorial Elsevier, 2012; Arch Virol, 2013, 158.*

Chu y colaboradores describen cuatro genotipos para el CV-A24v (GI-GIV) a través del análisis filogenético de la región 3C (6). El GI incluye los aislamientos obtenidos en Singapur y Hong Kong durante los años 1970 y 1971, y entre ellos, la cepa prototipo EH24_70_Singapur 1970. El GII agrupa aislamientos de Singapur, Hong Kong y Tailandia durante la mitad de la década de los años 70 (1975-1976). El GIII está compuesto por las cepas de Asia, Pakistán y Ghana de la década de los años 80 y 90. En el GIV se plantea que comenzó a circular a partir del año 2000 hasta la actualidad, y agrupa las cepas de diferentes países como Corea del Sur, China, Taiwán, Japón, India, España, Islas Guadalupe, Guyana y algunos países africanos (Congo, Guinea y Marruecos) (6, 63). Los análisis filogenéticos en base a la región VP1 identifican todos estos genotipos excepto el GII, del cual no se disponen secuencias en el banco de genes Genbank (6, 22). Estos genotipos se describieron de acuerdo a la apreciación filogenética de los autores y en correspondencia con las secuencias incluidas en los estudios sin establecerse un consenso para definirlos. De igual forma, con el transcurso de los años se designaron sublinajes, subgenotipos o subgrupos, basados fundamentalmente en la región 3C. Por ejemplo, Chu y colaboradores describieron seis subgrupos (GIII-C1-GIII-C6) en el GIII, y tres en el GIV (GIV-C1, C2, C3) (6, 51). Otros autores describieron otros dos subgrupos dentro del GIV: C4, C5 e incluso dentro del C5 los subgrupos a y b (10, 22, 63, 64).

Recientemente, Yen y colaboradores describieron cinco genotipos (GA-GE) para el CV-A24v a través del análisis filogenético de la región 3D, los que coincidieron parcialmente con algunos descritos en base a la región 3C y VP1 (22). El GA coincidió con el GI que incluyó la cepa prototipo EH24_70_Singapur 1970, el GB agrupó las secuencias de Taiwán de los años 1985-1986. El GC incluyó una secuencia de República Dominicana (1998) y EUA (1993), y se correspondió con el GIII. El GD lo conformaron secuencias de Taiwán de los años 2000-2001 y finalmente el GE incluyó secuencias a partir del año 2002 de diferentes partes del mundo, tal como el GIV (6, 22).

Es válido destacar que en diferentes países y décadas una misma variante genética del CV-A24v causó brotes o epidemias de conjuntivitis hemorrágica aguda durante dos años consecutivos fundamentalmente durante los meses del año más cálidos y lluviosos (8, 24, 51).

II.3 Estructura del virus y organización del genoma

Los viriones del género Enterovirus son partículas desnudas, esféricas, pequeñas y compactas que miden entre 30-32 nm de diámetro. Se componen de un núcleo interno de ácido ribonucleico monocatenario rodeado por una capa proteica o cápside. La simetría de la cápside es icosaédrica y está constituida por 60 subunidades o protómeros. Cada protómero, a su vez, lo componen 4 proteínas: VP1, VP2, VP3 y VP4 (Figura 1A). Las proteínas VP1, VP2 y VP3 se encuentran expuestas en la superficie del virión y la VP4 se localiza en estrecha asociación con el extremo 3' del ARN, el que se asocia además por el extremo 5', con la proteína VPg del inglés virion protein genoma (Figura 1B).

Pueden existir trazas de una quinta proteína: VP0, cuando la escisión para formar VP2 y VP4 no se completa durante el ensamblaje del virión (23). La resolución de las estructuras de los poliovirus, como modelo dentro del género, reveló que las superficies de estos virus tienen una topografía corrugada; una meseta prominente en forma de estrella (mesa) que se encuentra en el eje de simetría quintuple, rodeada por una depresión profunda (cañón) y otra protuberancia en el eje triple (Figura 1C, 1D). Se propuso que el cañón es el sitio de unión al receptor (65).

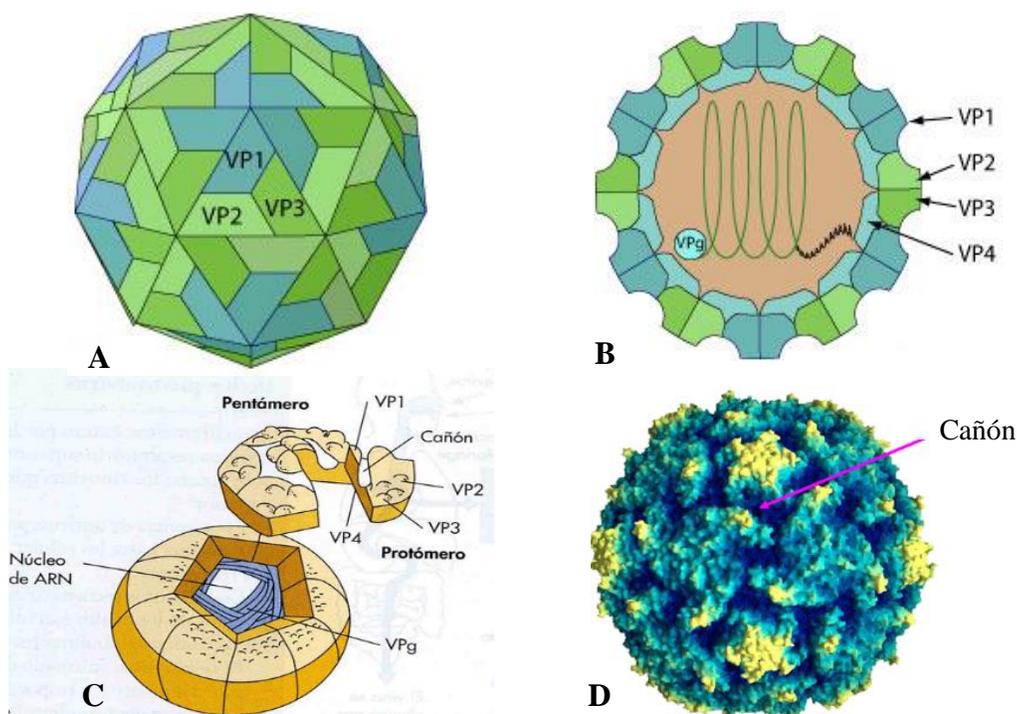


Figura 1. Estructura de los viriones del género Enterovirus. A y B: Disposición de las proteínas estructurales (VP1-VP4) en la estructura del virus. D y C: representación de las proteínas estructurales y la posición del cañón.

Fuente: ViralZone. Instituto sueco de bioinformática (<https://viralzone.expasy.org>), Epidemiología molecular de enfermedades infecciosas <https://epidemiologiamolecular.com/picornavirus>

El genoma viral de los enterovirus varía entre 7 100-7 450 nucleótidos de longitud. Se divide en tres regiones: dos regiones no codificadoras, del inglés NTR nontranslated region, situadas en los extremos 5'-NTR (610-822 nucleótidos) y 3'-NTR (37-99 nucleótidos) y en el centro, un marco de lectura abierto, del inglés Open Reading Frame, de 6,417-6,645 nucleótidos (Figura 2) (62, 65).

Ambos extremos juegan un papel regulador en la iniciación de la síntesis proteica, en la síntesis del ARN y en la interacción del ARN con los elementos del citoesqueleto y de las membranas intracelulares, así como en la estabilidad del genoma en su interacción con la cápside durante el empaquetamiento. La región 5'-NTR contiene el sitio interno de entrada al ribosoma, del inglés Internal Ribosome Entry Site, una región muy conservada en el género, que permite el inicio de la traducción viral con la inhibición de la traducción de las proteínas de la célula, así como uno o varios pseudonudos, del inglés pseudoknots. Después del extremo 3' se localiza una cola de poli A heterogénea en longitud (Figura 2) (62, 65).

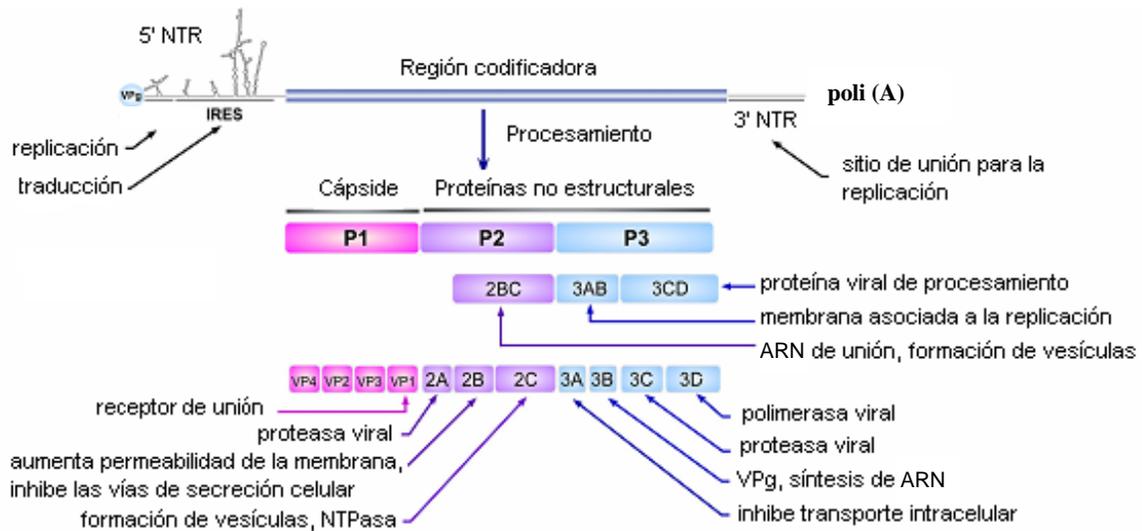


Figura 2. Genoma de los enterovirus. Fuente: *JBiomedSci* 2009,16:103-116.

El ARN del virión, de simple cadena positivo, es infeccioso y se traduce cuando entra a la célula para producir todas las proteínas requeridas para la replicación viral. La traducción del ORF produce una poliproteína que luego de diferentes procesos proteolíticos realizados por 3 proteasas virales (2A, 3C y 3CD), da lugar a tres proteínas precursoras: P1 para las proteínas estructurales y P2 y P3 para las proteínas no estructurales. La poliproteína P1 genera las cuatro proteínas estructurales VP1, VP2, VP3 y VP4. Las poliproteínas P2 y P3 contienen las siete proteínas no estructurales del virus: 2A, 2B, 2C, y 3A, 3B, 3C, 3D, respectivamente, las que están involucradas en el procesamiento de las proteínas y la replicación del genoma (Figura 2) (62, 65).

II.4 Proteínas virales

II.4.1 Proteínas estructurales

Los sitios antigénicos, los determinantes de virulencia, la termoestabilidad del virión, el rango de hospederos, el tropismo celular *in vitro*, la capacidad de persistencia a través de la alteración de las actividades celulares, la capacidad de interacción virus células y las proteínas virales de unión a los receptores celulares se localizan en la región que codifica para la cápside (66, 67).

La VP1 es la proteína de la cápside más grande, contribuye aproximadamente con un 40 % de los residuos de la superficie del virión y es la portadora de los sitios antigénicos principales

de las proteínas de la cápside (68-70). La secuencia nucleotídica de la región completa o de una porción de esta proteína (a partir de la unión VP3-VP1), se correlaciona con el serotipo viral, por lo que se ha convertido en una herramienta utilizada ampliamente para la detección e identificación de los serotipos del género Enterovirus. Se plantea que un 75 % de similitud nucleotídica y un 88 % de similitud aminoacídica entre la secuencia en estudio y la de una cepa prototipo permiten determinar el serotipo en cuestión. Además del uso taxonómico, incluso en la identificación de nuevos serotipos, la secuenciación de la proteína VP1 resulta útil en los estudios de epidemiología molecular de los brotes o epidemias de los enterovirus (71-73).

Otros sitios antigénicos también se encuentran en la proteína VP2. Las mutaciones en las proteínas VP3 y VP4 pueden afectar las características de la superficie y las propiedades biológicas virales (67, 74). Los estudios filogenéticos en base a la región de unión entre las proteínas VP4-VP2 son más adecuados que el extremo 5' NTR, pero solo se logra una correlación parcial con los serotipos, por lo que no se aconseja el uso de ninguna de estas regiones para la identificación serotípica de los enterovirus (23, 75).

II.4.2 Proteínas no estructurales

Las proteínas no estructurales están involucradas con el procesamiento de las proteínas y la replicación del genoma viral.

La proteína 2A es una proteasa necesaria para la segmentación de la poliproteína. Además, participa en la replicación viral, estimulando la síntesis de las cadenas negativas de ARN (76, 77).

La proteína 2B y su precursor 2BC se sugiere que son las responsables de la modificación de las membranas en las células infectadas. (78, 79).

La proteína 2C es altamente conservada en los enterovirus, interviene en la replicación del ARN viral actuando como una NTPasa y guiando los complejos replicativos hacia las membranas celulares. La síntesis de la misma causa la desintegración del complejo de Golgi y el retículo endoplasmático (80).

La proteína 3AB es una proteína multifuncional. El dominio hidrófobo en la porción 3A se asocia con las vesículas de membrana. Se cree que esta interacción ancla el complejo de

replicación a las vesículas inducidas por el virus. Por otro lado, se ha demostrado que funciona como un sustrato de la polimerasa 3D en la uridilatación de la proteína VPg y además, desestabiliza las estructuras secundarias del ARN y mejora la hibridación del ácido nucleico complementario en la replicación (81-83).

La proteína 3B es un péptido pequeño que se encuentra unido covalentemente al extremo 5' NTR. Esta proteína se utiliza como cebador en la síntesis de las cadenas de ARN positivas y negativas (79).

La proteasa 3C de los picornavirus muestra una estructura espacial similar y juega un papel importante en el ciclo replicativo y en la interacción del virus con el hospedero. Sus actividades de proteasa y de unión al ARN están involucradas en el procesamiento de las poliproteínas virales, en el inicio de la síntesis del ARN viral y en la maduración del virión (26, 84). Esta proteína o sus precursores, interactúan con los elementos de la replicación en cis, del inglés cis-acting replication elements, localizados en el genoma viral, siendo importante dicha interacción en la regulación de la replicación y la traducción (84, 85). Puede, además, inducir el procesamiento de algunos factores celulares que se requieren para la transcripción, la traducción y el tráfico del núcleo al citoplasma para modular la fisiología celular para la replicación viral, lo que deriva en la patogénesis viral y por ende, en una infección viral eficiente (26, 86, 87). Esta proteasa se une y fragmenta diferentes moléculas celulares para interferir con las vías de señalización antiviral y evadir la respuesta inmune del huésped, hecho que constituye un ejemplo notable de la evolución de los picornavirus y que en el caso del CV-A24v se utiliza ampliamente para el estudio de su epidemiología molecular desde las primeras etapas pandémicas (6, 7, 26, 88).

En base a su importancia en la replicación viral, la no existencia de un homólogo en los sistemas hospederos celulares y su conservación estructural, se han descubierto inhibidores irreversibles, inhibidores no covalentes que permiten además el conocimiento de sus funciones (26). Las estructuras primarias y terciarias de las regiones de unión de la 3C con los compuestos antivirales en estudio, son altamente conservadas en los enterovirus lo que implicaría una amplia actividad antiviral de estos compuestos frente a varios serotipos enterovirales (89, 90).

La proteína 3D es la ARN polimerasa dependiente de ARN responsable de la replicación viral. La secuenciación completa o de un fragmento de su extremo 5' se correlaciona con los serotipos enterovirales debido a la identidad aminoacídica conservada para cada serotipo (22, 25, 79).

II.5 Propiedades físicas y químicas

La mayoría de las especies enterovirales presentan una densidad en CsCl entre 1.30-1.34 g cm⁻³ y el coeficiente de sedimentación en gradiente de sacarosa es de 156 S. Por ser virus desnudos, las partículas infecciosas son estables a pH entre 3 y 5, resistentes a muchos detergentes y desinfectantes comunes que incluyen el jabón común, detergentes no iónicos, etanol al 70 %, isopropanol, lisol diluido, compuestos de amonio cuaternario, éter, cloroformo y otros solventes lipídicos. Pueden sobrevivir en el agua limpia, los líquidos orgánicos, las aguas residuales, las superficies y los fómites durante varios días. La infectividad de los enterovirus puede persistir a -70 °C durante varios años, a 4 °C durante varias semanas y durante días a temperatura ambiente. Sin embargo, la desecación, la luz ultravioleta, el calor (50 °C), el formaldehído al 0.3 % y el cloro residual al 0.3-0.5 ppm los inactivan fácilmente, aunque la concentración, el pH, la materia orgánica y el tiempo de contacto con estos agentes afecta el grado de inactivación de los mismos (23, 62).

II.6 Patogenia

La conjuntivitis hemorrágica aguda resulta de la inoculación directa del virus en la conjuntiva humana, que es el sitio primario de infección. No obstante, existen evidencias de que las partículas virales en esta enfermedad siguen el curso normal de la patogenia descrita para los enterovirus (35, 38). Una vez adquirido el virus, que en el caso de la conjuntivitis hemorrágica aguda ocurre principalmente por contacto, aunque no puede descartarse la vía respiratoria y fecal-oral, es capaz de colonizar la bucofaringe y el tubo digestivo específicamente las amígdalas, los ganglios linfáticos y las placas de Peyer donde tiene lugar una activa multiplicación primaria. En el primer día de la infección los enterovirus se extienden a los ganglios linfáticos regionales (cervicales profundos y mesentéricos) y se produce una viremia primaria transitoria de aproximadamente tres días, llegando a diversos órganos del sistema mononuclear fagocítico como son el hígado, el bazo y la médula ósea. Después de un período de incubación en estos órganos, las partículas virales se difunden a la

sangre y tiene lugar una viremia secundaria prolongada y pueden localizarse en los tejidos u órganos para los que tienen tropismo (meninges, sistema nervioso, miocardio, músculos estriados) produciendo un amplio número de enfermedades. Generalmente, el virus se detiene en la fase de replicación intestinal o los órganos del sistema mononuclear fagocítico resultando la infección subclínica que es la infección más común. Solo en un reducido número de casos se localiza en los tejidos y órganos susceptibles, dando lugar a cuadros clínicos cuya gravedad puede depender de varios factores, como son la edad, el estado inmunitario del huésped y la virulencia del virus circulante (65, 91). Una semana después del inicio de los síntomas, es difícil aislar el virus de la faringe, pero continúa eliminándose por las heces durante varias semanas. En las zonas en las que las condiciones sanitarias son satisfactorias, la diseminación de tipo respiratoria adquiere una mayor importancia. Los individuos afectados son más infecciosos al final del período de incubación y durante los primeros días del comienzo de los síntomas. Los virus pueden transmitirse durante todo el tiempo que son excretados (23).

Desde las primeras epidemias de conjuntivitis hemorrágica aguda causadas por el EV-D70 y el CV-A24v, se describió la vía de transmisión principal por el contacto con las secreciones oculares o fómites, y que la infección viral involucraba, además, los ganglios linfoides preauriculares en los primeros cinco días posteriores a la infección (42-44). Algunos síntomas respiratorios (nasofaringitis, rinitis) y gastrointestinales se observaron también y se obtuvieron aislamientos de ambos agentes virales a partir de exudados faríngeos y muestras de heces (38, 39, 47, 92). Específicamente, el EV-D70 se asoció con complicaciones neurológicas como la radiculomielopatía lumbar y la poliomiелitis en adultos, entre dos a cuatro semanas posteriores al cuadro agudo de la conjuntivitis. Se planteó que el virus se disemina de la conjuntiva al SNC a través de los nervios que inervan los ojos o a través de la vía sanguínea, afectando las neuronas motoras de la médula lumbar y cervical y los nervios craneales, tal como ocurre en la poliomiелitis (93, 94).

II.7 Manifestaciones clínicas de la Conjuntivitis Hemorrágica Aguda

La conjuntiva es una membrana mucosa delgada y transparente que reviste la cara interna del párpado (conjuntiva parpebral) y la esclerótica anterior (conjuntiva bulbar). La conjuntivitis no es más que la inflamación de la conjuntiva y constituye una de las afecciones oculares

más comunes. Puede ser un proceso de infección aislado o presentarse como una infección de la conjuntiva y la córnea (queratoconjuntivitis), o el párpado (blefaroconjuntivitis) (95).

En dependencia del tiempo de duración del proceso inflamatorio, se clasifica como conjuntivitis aguda, si dura de 1 a 2 semanas, y crónica, si sobrepasa este tiempo (95).

La conjuntivitis hemorrágica aguda es un padecimiento agudo, autolimitado, de inicio súbito, uni o bilateral, caracterizado principalmente por dolor ocular intenso, fotofobia, visión borrosa, sensación de cuerpo extraño, lagrimeo, hiperemia conjuntival con hemorragias subconjuntivales de tamaño variable, edema y quemosis palpebrales. El cuadro se acompaña de adenomegalias preauriculares y secreción serosa ocular que posteriormente se puede volver mucopurulenta, en caso de infección bacteriana secundaria. Generalmente, aparece precedida por un cuadro infeccioso de las vías aéreas superiores (síndrome faringoconjuntival: síntomas respiratorios, tos, faringitis), aunque pueden presentarse otras manifestaciones sistémicas como mialgia, malestar general, cefalea, enfermedad gastrointestinal. Se desarrolla dentro de las 24 horas posteriores a la exposición con el patógeno. El período de incubación se estima que es de 12 a 72 horas. Generalmente los síntomas mejoran a partir del tercer día. La recuperación se completa dentro de la semana siguiente, incluso en ausencia de cualquier tratamiento y sin presencia de secuelas (17, 94, 96).

Su etiología es viral, donde figuran el EV-D70, el CV-A24v y algunos serotipos de los adenovirus: 2, 3, 4, 7, 8, 11, 19 y 37; como los principales agentes que causan epidemias o pandemias, predominando la circulación del CV-A24v por más de cuatro décadas (19, 22, 97). Otros virus como Newcastle, Chikungunya, Zika, Dengue, así como otros microorganismos (amebas y clamidias) pueden causar hemorragias conjuntivales (98-100). Se describieron otros enterovirus en enfermedades oculares de menor trascendencia: en Suecia se reportó una epidemia de conjuntivitis viral no hemorrágica en la que se identificó al Echovirus 7 (23). Por otro lado, el Coxsackievirus B2 y el Echovirus 11 se aislaron de casos esporádicos de conjuntivitis viral, de forma similar que los herpesvirus (HSV, VZV, EBV), poxvirus (viruela y *Molluscum Contagiosum*). El sarampión y los virus de la influenza pueden causar diferentes tipos de conjuntivitis (94).

Se pueden presentar complicaciones tales como ulceraciones corneales superficiales y profundas, panofalmitis, evisceración ocular, abscesos corneales y ceguera, debido a una mala atención del paciente, o en algunos casos, al tratamiento con esteroideos y orina, lo que puede provocar el desarrollo consiguiente de una infección bacteriana (28, 94).

Por otra parte, el neurotropismo del EV-D70 puede provocar el desarrollo de la radiculomielitis o síndrome tipo Guillain-Barré en aproximadamente 1:10 000 pacientes (niños y adultos) con conjuntivitis hemorrágica aguda, mayoritariamente, en hombres entre los 20-40 años de edad. Este tipo de complicación se manifiesta con dolor en las extremidades y parálisis flácida aguda que se puede desarrollar de 5 a 30 días después del inicio de la conjuntivitis hemorrágica aguda (16, 101). En el caso del CV-A24v son pocos los estudios que describen este tipo de complicación, por ejemplo, Kosrirukvongs y colaboradores informaron un caso con complicaciones neurológicas: parálisis facial durante tres meses sin recuperación, en una epidemia de conjuntivitis hemorrágica aguda en Tailandia en el año 1992 (50). Sin embargo, otros investigadores identificaron esta variante antigénica en pacientes con PFA dentro del marco del programa para la erradicación de la poliomielitis en diferentes años y países (50, 102-106) y recientemente, un estudio realizado por Dufresne y Gromeier demostró la potencialidad de la especie C de los enterovirus, a la cual pertenece el CV-A24v, para desarrollar la poliomielitis (107).

II.8 Respuesta inmune

Se conoce que la conjuntiva, como mucosa, está protegida por el sistema inmune de mucosa que utiliza los mecanismos efectores presentes en el tejido, tanto de la respuesta innata como de la adaptativa (96, 108). Sin embargo, en el ojo, la respuesta de células T se suprime para protegerlo del posible daño que conlleva el desarrollo de la misma, lo que dificulta la defensa contra agentes infecciosos, especialmente cuando este tipo de respuesta es necesaria (109, 110). Después de la infección primaria aguda de la conjuntiva, entre 12 y 24 horas, se desencadena una respuesta inmune local basada en la secreción del Interferón fibroblástico, IgA secretora e IgG en lágrimas, y la migración de células linfocíticas hacia la zona afectada, así como anticuerpos neutralizantes (96, 111).

Por otro lado, se puede esperar que como estos serotipos que causan la conjuntivitis hemorrágica aguda desarrollan el curso normal de la patogenia de los enterovirus, se produce

inmunidad local intestinal (IgA) y anticuerpos séricos (IgM e IgG) que neutralizan el virus durante la fase virémica. Su formación tan temprana en la infección es el resultado de una activa replicación viral en el tracto intestinal y en estructuras linfáticas profundas (112).

La respuesta inmune humoral en las infecciones por enterovirus es especialmente importante para la protección y la inmunidad de por vida. En el caso de las conjuntivitis hemorrágica aguda, se ha determinado a través de la detección de los anticuerpos neutralizantes, que es transitoria, débil o indetectable. El declive de estos anticuerpos en individuos seropositivos, posterior a una epidemia, la infección subclínica y la divergencia antigénica y genética del CV-A24v se cree que está asociado con la reaparición de la enfermedad entre 5-7 años después de la infección inicial (23, 96).

II.9 Diagnóstico virológico

II.9.1 Muestras clínicas

El momento ideal para la toma de las muestras es cuando el paciente presenta los síntomas agudos sugestivos de la enfermedad. Los exudados y raspados conjuntivales han constituido las muestras clásicas de elección para el diagnóstico rápido e intento de aislamiento de los agentes causales de la conjuntivitis hemorrágica aguda. Las mismas se transportan y conservan en frío (4° C) en caso de que se pueda realizar el diagnóstico inmediato, de lo contrario se recomienda la congelación (-20° C o menos) hasta su procesamiento (19, 113).

Teniendo en cuenta la patogenia de los enterovirus causantes de la conjuntivitis hemorrágica aguda, los exudados o lavados nasales y faríngeos son otras muestras clínicas para el diagnóstico etiológico de la conjuntivitis hemorrágica aguda, tomados en los primeros días del comienzo de los síntomas. Las muestras de heces tomadas a partir del tercer día del comienzo de los síntomas, hasta incluso seis semanas después del cuadro agudo, también pueden utilizarse para el diagnóstico virológico, y se conservan de forma similar que las muestras conjuntivales (5, 35, 39, 47, 92). A partir tanto de estos exudados como las heces puede extraerse el ARN viral para el desarrollo del diagnóstico basado en técnicas moleculares, así como realizarse el aislamiento viral en cultivo de células (113).

Para los estudios serológicos se requieren muestras de sueros pareados (tomadas al inicio del cuadro clínico y en la fase de convalecencia) que se conservan a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ y se analizan simultáneamente (23).

Otras muestras ambientales como aguas de ríos o afluentes y residuales se han evaluado, por técnicas clásicas o moleculares, y permitido la detección rápida de los diferentes serotipos, variantes antigénicas o genéticas de los enterovirus en el medio ambiente (114-117).

II.9.2 Procedimientos para el diagnóstico virológico

El diagnóstico de la conjuntivitis hemorrágica aguda se basa esencialmente en las características clínicas y la identificación del agente etiológico (11).

La técnica de referencia para el diagnóstico específico de las infecciones por enterovirus es el aislamiento viral en células susceptibles (118). El CV-A24v no crece en las líneas celulares más utilizadas para el aislamiento de los enterovirus como las de RD (rhabdomiosarcoma humano) y las Vero (riñón de mono verde africano). Sin embargo, crece bien en cultivos primarios, diploides y de línea de origen humano y de mono. Entre los cultivos más usados se encuentran los diploides de fibroblastos de pulmón humano, así como las líneas celulares HEp-2 (carcinoma laríngeo), HeLa (carcinoma de cuello de útero) y MRC-5 (células embrionarias de pulmón humano). El virus se expande y afecta a la totalidad de las células, produciendo las alteraciones citopáticas típicas de los enterovirus (alcalinización del medio, redondeamiento, contracción, picnosis nuclear y desprendimiento celular con aumento de la refringencia) (19, 111, 119, 120).

Los enterovirus aislados se identifican mediante la neutralización del efecto citopático en cultivo de células, que consiste en contrarrestar el efecto citopático sobre el cultivo mediante la utilización de un antisuero específico que impide la unión del virus a su receptor celular. La técnica se simplificó con el desarrollo de mezclas de antisueros específicos de tipo, como la propuesta por Lim y Benyesh-Melnick (LBM) (121). En el caso del CV-A24v y el EV-D70 no pueden identificarse con estas mezclas de antisueros y en su lugar pueden emplearse anticuerpos monoclonales específicos o anticuerpos policlonales específicos producidos en conejo (111).

Teniendo en cuenta lo trabajoso que resultan y la demora de las técnicas clásicas del aislamiento y la identificación mediante la neutralización, se han desarrollado otras metodologías que proporcionan una ganancia en tiempo para la identificación de los serotipos enterovirales (52, 122, 123).

La inmunofluorescencia y la microscopía electrónica resultan útiles en el diagnóstico etiológico rápido de la conjuntivitis hemorrágica aguda a partir del estudio directo de las muestras de exudados y raspados conjuntivales, así como de los aislamientos virales en cultivo de células (21, 46, 124).

La RCP, con la extracción del ARN mediante diferentes metodologías como por Trizol y fenol cloroformo y estuches comerciales de forma manual o automática, resulta la técnica más prometedora en el diagnóstico del CV-A24v o el EV-D70. Algunos sistemas permiten la amplificación de fragmentos de secuencias nucleotídicas conservadas en la región 5'NTR del género enterovirus, detectando así, la totalidad de los serotipos (125-127). Otros protocolos describen la identificación específica, tanto para el CV-A24v y EV-D70, a través de la amplificación parcial o completa de las regiones estructurales como VP1, VP1-VP3 y VP2, y no estructurales como 3C y 3D. Dichos productos de RCP, conjuntamente con la secuenciación nucleotídica en sus diferentes modalidades, y posterior comparación con las secuencias de referencia, permiten la identificación del serotipo o variantes antigénicas (CV-A24v), incluso del genotipo en cuestión (25, 73, 128, 129). De igual forma que en la RCP, se han desarrollado RCP en tiempo real genéricas o específicas para el CV-A24v y EV-D70, que permiten la identificación y cuantificación mediante el monitoreo constante del ADN durante la reacción de amplificación, lo que proporciona un diagnóstico mucho más rápido (48, 114, 130). Tanto la RCP genéricas o específicas para estas entidades virales se encuentran disponibles en el Laboratorio Nacional de Referencia de los Enterovirus del IPK.

La serología a partir de sueros pares, constituye una técnica diagnóstica adicional para CV-A24v y el EV-D70. La seroconversión, un aumento cuádruple o mayor del título del segundo suero respecto al primer suero, así como valores muy elevados en ambos sueros se consideran significativos para hacer el diagnóstico de una infección reciente (23, 129).

II.10 Análisis filogenéticos y filodinámicos

La inferencia filogenética y filodinámica de algunos patógenos a partir de las secuencias moleculares son de los enfoques que en las últimas décadas ganan en aplicabilidad en la reconstrucción de la historia evolutiva y espacial de las epidemias, lo que tributa directamente al desarrollo de estrategias de intervención y prevención efectivas (32, 33, 131).

Las relaciones evolutivas ilustradas a través de una filogenia se llaman árboles filogenéticos porque se parecen a la estructura de un árbol y los términos que se refieren con las diversas partes de estos diagramas (es decir, raíz, rama y hoja) se corresponden a las partes de los árboles. Los nodos u hojas externas (terminales) representan los taxones existentes y a menudo, se denominan unidades taxonómicas operativas (OTU) del inglés operational taxonomic units, un término genérico que puede representar muchos tipos de taxones comparables (por ejemplo, una familia de organismos, individuos o cepas de virus de una sola especie o de diferentes especies). De manera similar, los nodos internos pueden denominarse unidades taxonómicas hipotéticas (HTU) del inglés hypothetical taxonomic units, para enfatizar que son los progenitores hipotéticos de las OTU. Un grupo de taxones que comparten la misma rama tiene un origen monofilético y se denomina agrupamiento, grupo o conjunto, del inglés cluster. El patrón de ramificación, es decir, el orden de los nodos, se denomina topología del árbol (132).

Para investigar la filogenia (filogenética), que no es más que la reconstrucción de las relaciones ancestrales entre los organismos, pueden utilizarse diferentes tipos de datos, como por ejemplo, las características morfológicas, los fragmentos de restricciones polimórficas, las secuencias nucleotídicas o aminoacídicas, entre otros (132, 133). Las secuencias de nucleótidos y aminoácidos constituyen en la actualidad los datos más abundantes y confiables, así como unidades estrictamente heredables y sin ambigüedad. Las diferencias entre un par de secuencias (mismo gen) de diferentes organismos refleja el tiempo de divergencia de las mismas a partir de un ancestro común (132).

Se conoce bien que una variedad de mecanismos actúan sobre el ADN, lo que provoca cambios en las secuencias en el curso del tiempo. Por consiguiente, dos secuencias derivadas de un ancestro común, que evolucionan de forma independiente, normalmente divergen. Dicha divergencia se denomina distancia genética y juega un papel importante en los análisis

de las secuencias. Se espera que con el cursar del tiempo la divergencia entre las secuencias aumente, pero se observa que existe un marcado índice de saturación (Figura 3) (132).

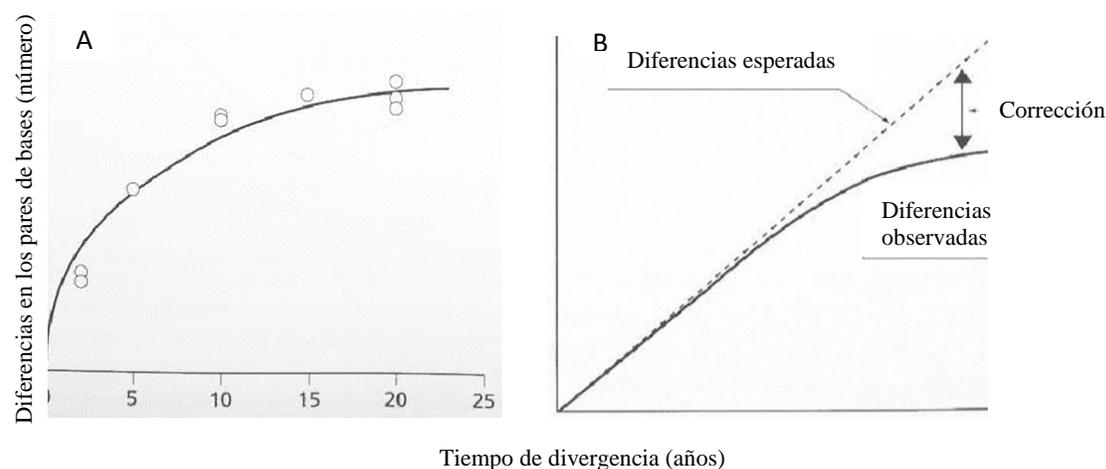


Figura 3. A: Saturación de los cambios en la evolución de las secuencias, B: Representación gráfica de la acción de los modelos evolutivos en los análisis filogenéticos. Fuente: *Journal of the American Statistical Association*, 1995,90(430), 773–795.

Precisamente los modelos de evolución tratan de corregir la diferencia entre la distancia esperada y la observada y constituyen un requisito determinante en los análisis filogenéticos. Existen varios modelos evolutivos, programas y pruebas para determinar los que se ajustan a los datos en estudio, como por ejemplo, Jukes-Cantor (JC), Modelo de Felsenstein (F81), Hasegawa-Kishino-Yano (HKY85). Algunos programas como el JModeltest y MEGA permiten una selección adecuada con el desarrollo de pruebas como la jerárquica del radio de verosimilitud (hLTRs), el cálculo del Criterio de Información Bayesiano (BIC) o del Criterio de Información de Akaike (AIC), (132, 134, 135).

Con el cursar de los años se fortalecen, tanto el conocimiento para lograr inferencias filogenéticas robustas, informativas y veraces, como las herramientas a través de los programas bioinformáticos. Desde bases de datos (secuencias, proteínas), paquetes de programas, páginas en internet, específicas para determinados microorganismos (VIH, virus de la influenza tanto humana, como aviar, Ébola, Zika), o generales (por ejemplo, Genbank) conforman un amplio universo en este sentido (30, 132, 136).

Los métodos para construir los árboles filogenéticos a partir de los datos moleculares pueden clasificarse según el tipo de datos que utilizan, en: estados de caracteres discretos o matriz

de distancia de diferencias de pares; y de acuerdo con el algoritmo de construcción del árbol: en algoritmo de agrupamiento o criterio óptimo (Tabla 2)(132, 137).

Tabla 2. Clasificación de los métodos de construcción filogenética y los métodos de análisis de los árboles.

Tipos de datos que utilizan	Algoritmo de construcción del árbol	
	Criterio óptimo	Agrupamiento
Caracteres discretos	Máxima verosimilitud* (ML) Máxima parsimonia (MP) Inferencia Bayesiana	
Matriz de distancias	Fitch–Margoliash	UPGMA** Neighbor-joining (NJ)

*ML del inglés Maximum likelihood, **UPGMA del inglés unweighted pair group method with arithmetic means.

Los métodos de caracteres discretos pueden utilizar cualquier conjunto de datos. Cuando se comparan las secuencias, un "carácter" es cada posición de la misma, que conforma el alineamiento, y los nucleótidos o aminoácidos en esa posición son los "estados". Por lo general, todas las posiciones de los caracteres se analizan de forma independiente; por lo que se supone que cada columna de alineación es una realización independiente del proceso evolutivo. Los métodos de estado de carácter conservan el estado de carácter original de los taxones y, por lo tanto, pueden utilizarse para reconstruir el estado de carácter de los nodos ancestrales (132).

En contraste, los métodos de matriz de distancia comienzan por calcular alguna medida de la diferencia de cada par de OTU para producir una matriz de distancia por pares, y luego infiere las relaciones filogenéticas de las OTU de esa matriz. Estos métodos parecen adecuados para analizar rápidamente conjuntos de datos relativamente grandes (137-139).

Los métodos de construcción de los árboles de agrupamiento emplean algoritmos de agrupamiento, del inglés clustering, para obtener un único árbol a partir de los datos. Se considera este árbol como el mejor estimado del árbol real (132).

Los métodos de criterio óptimo emplean una función objetivo que permite evaluar cómo se ajustan los diferentes árboles a los datos. Se considera al árbol de mayor puntuación como el mejor estimado del árbol real (137).

Entre los más utilizados en los análisis filogenéticos del CV-A24v se encuentran el algoritmo de agrupamiento Neighbour joining, de máxima verosimilitud, y el algoritmo de inferencia bayesiana (22, 25, 28).

El algoritmo ML considera cada carácter de las secuencias, en el cálculo de la verosimilitud de los datos respecto a cada uno de los árboles identificados. Examina diferentes topologías de árboles y evalúa el soporte relativo mediante la suma de todas las posiciones de la secuencia. Los algoritmos ML buscan el árbol que maximiza la probabilidad de observar los estados de los caracteres, dada una topología del árbol y un modelo de evolución. Para un árbol en particular, el cálculo de la probabilidad involucra sumar todos los posibles estados de nucleótidos (o aminoácidos) en los nodos ancestrales (internos). Se utilizan técnicas de optimización numérica para encontrar la combinación de la rama, longitudes y parámetros evolutivos que maximizan la probabilidad. En dependencia del algoritmo de búsqueda, se busca la probabilidad de un número de topologías de árbol con este criterio, y el árbol con la mayor probabilidad es elegido como el mejor árbol. Desafortunadamente, obtener la probabilidad de un árbol puede ser computacionalmente muy exigente (132, 140).

El algoritmo de agrupamiento NJ que se utiliza unido al método de mínima evolución, permite obtener el árbol que represente la menor evolución entre las secuencias analizadas. Es computacionalmente rápido y generalmente produce árboles aceptables. Devuelve un solo árbol como resultado (141, 142).

El algoritmo de inferencia bayesiana considera cada carácter de las secuencias en el cálculo de la probabilidad posterior de cada árbol. Depende de la especificación de una distribución de probabilidad anterior para cada parámetro en un modelo de sustitución, longitud de las ramas y topología del árbol. Buscan un conjunto de árboles o hipótesis plausibles para los datos a través de la distribución de probabilidad de los árboles. Esta distribución posterior de los árboles tiene inherentemente una estimación de confianza de cualquier relación de evolución. Las probabilidades posteriores se obtienen explorando el espacio arbóreo mediante el uso de una técnica de muestreo llamada cadena de Markov Monte Carlo (MCMC). Este método de muestreo comienza simulando un conjunto aleatorio de parámetros y propone un nuevo "estado", que es un nuevo conjunto de parámetros, utilizando operadores aleatorios. En cada paso, la relación de probabilidad y la relación previa se calculan para el

nuevo estado en relación con el estado actual. Cuando el producto combinado es mejor, se aceptan los parámetros y se propone un siguiente paso; si el resultado es peor, la probabilidad de que el estado se rechace es inversamente proporcional a cuán mal se muestrea el nuevo estado. Los resultados se presentan, generalmente, como características de resumen de las muestras, por ejemplo, la media o la mediana de los parámetros continuos, pero para los árboles, se puede presentar un árbol de consenso o un árbol máximo a posterior. Estos métodos son muy intensos desde el punto de vista computacional (132, 143, 144).

Los alineamientos de las secuencias nucleotídicas o aminoacídicas del microorganismo son un requisito esencial para los análisis filogenéticos ya que las secuencias incluidas serán la base estructural para el desarrollo de todos los análisis a realizar (132). Para una estimación confiable de la relación filogenética entre los genes, todo gen bajo investigación debe tener la misma historia. Por lo tanto, los eventos de recombinación dentro del fragmento bajo investigación afectan la inferencia filogenética. Diferentes estrategias bioinformáticas se desarrollaron para abordar este problema en dependencia de las características y objetivos que se persigan con el análisis (132).

La reconstrucción de la filogenia a partir de alineamientos de nucleótidos o de aminoácidos no es tan sencillo como podría esperarse. Aunque existen muchos métodos disponibles, ninguno de ellos garantiza que el árbol filogenético inferido sea, de hecho, el "verdadero" que podría describir la historia evolutiva en cuestión.

Algunos métodos claramente funcionan mejor que otros en los conjuntos de datos empíricos o simulados. Al juzgar la fiabilidad de los diferentes métodos, siempre se tiene que tener en cuenta que los diferentes algoritmos de inferencia de árboles se basan en hipótesis diferentes, y la búsqueda de un árbol implica ya una suposición acerca del proceso evolutivo. Los métodos estadísticos ayudan a evaluar la fiabilidad de ciertos grupos (o topologías de árboles). Sin embargo, también dependen del método de filogenia utilizado y sufren el mismo sesgo sistemático, es decir, cuando los supuestos del método no se ajustan a los datos (132).

Grenfell y colaboradores definieron la filodinámica como la fusión de la inmunodinámica, la epidemiología y la biología evolutiva. Esta disciplina permite explicar la amplia variedad de las filogenias de un patógeno, ya sea en un hospedero individual o en una población, como resultado de la variación genética del patógeno modulada por la inmunidad del hospedero, la

transmisión en cuellos de botella y la dinámica de las epidemias (31, 34). El enfoque filodinámico se ha convertido en un elemento fundamental para el desarrollo de herramientas filogenéticas comparativas capaces de incorporar los datos de vigilancia epidemiológica con las secuencias moleculares en un solo marco estadístico. Estas herramientas innovadoras mejoraron considerablemente las investigaciones científicas sobre los orígenes temporales y geográficos, la historia evolutiva y los factores de riesgo ecológicos asociados con el crecimiento y la propagación de virus como el VIH, el Zika y el Dengue y bacterias como *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina (30, 145-148). Del género *Enterovirus*, algunos serotipos como el EV-D68, EV-A71, CV-B5, CV-B1-2, CV-A4, CV-A16, E-14 entre otros, se han estudiado siguiendo este enfoque (149-152). Específicamente para el CV-A24v, la mayoría de los estudios hasta la fecha, realizaron análisis filogenéticos con algoritmos NJ, algunos pocos emplearon otros algoritmos más complejos (ML) y existe un solo estudio realizado por Yen y colaboradores del año 2016, que abarca además la filodinámica de esta variante (22, 25, 28, 153).

Los paquetes de programas como el BEAST, del inglés Bayesian Evolutionary Analysis Sampling Trees, desarrollan algoritmos que permiten la integración de modelos coalescentes (busca del ancestro común), matemáticos y de difusión espacial (32, 144, 154). Este programa implementa un enfoque filogenético comparativo, que incorpora la parametrización de la evolución del rasgo fenotípico para identificar predictores de la dinámica poblacional como la diversidad genética, la presión selectiva, el tamaño de población efectiva (N_e) y la distribución espacio-temporal, los cuales se estiman o evalúan simultáneamente durante la reconstrucción de la historia evolutiva (155, 156).

Dentro de ellos el tamaño de la población efectiva, de importancia fundamental para la epidemiología de las enfermedades infecciosas, describe el nivel de diversidad genética dentro de una población a lo largo de su historia evolutiva (30). Esto se puede definir como el tamaño de una población idealizada que se aparee al azar y que tiene los mismos cambios genéticos que la población estudiada. Durante el período de crecimiento exponencial de una epidemia, se demuestra que el cambio en la N_e se correlaciona linealmente con la prevalencia de la infección (31, 157).

Con el desarrollo de los modelos del reloj molecular para los datos muestreados en serie (158), los análisis filogenéticos ayudan a descubrir la sincronización de los eventos de transmisión y los orígenes epidemiológicos. Cuando se reconstruye dentro del marco coalescente, y al asumir una velocidad de evolución similar a la de un reloj, la historia evolutiva de un patógeno puede proporcionar información valiosa sobre el origen y el tiempo de vida de los principales cambios de la población en estudio (31). Este es otro de los parámetros que también puede determinarse en el BEAST y en otros programas y que se integra al análisis filodinámico (144, 158).

Los métodos filodinámicos pueden utilizarse, también, para inferir las tasas de movimiento de los linajes virales entre ubicaciones geográficas y reconstruir las ubicaciones geográficas de los linajes ancestrales. En el análisis, la ubicación geográfica se trata como un estado de carácter filogenético, similar en espíritu a las bases nitrogenadas en el análisis filogenético "A", "T", "G", "C", la localización geográfica se codifica como un modelo de sustitución. La misma maquinaria filogenética que se utiliza para inferir los modelos de evolución del ADN puede, por lo tanto, utilizarse para inferir las matrices de transición geográfica (32). El resultado final es una tasa, medida en términos de años o en términos de sustituciones nucleótidas por sitio, que un linaje de una región se mueve a otra región sobre el curso del árbol filogenético. En una red de transmisión geográfica, algunas regiones pueden mezclarse más fácilmente y otras regiones pueden estar más aisladas. La validez de una ruta de transmisión o dispersión geográfica se determinan por el valor del factor de Bayes (BF) que se obtiene del análisis (Tabla 3)(32).

Tabla 3. Valor del Factor de Bayes para la aceptación de la hipótesis.

Valor del Factor de Bayes	Aceptación de la hipótesis (ruta de transmisión)
1 a 3	No vale más que una simple mención
3 a 20	Positivo
20 a 150	Fuerte
> 150	Muy fuerte

Fuente: Journal of the American Statistical Association, 90(430), 773–795.

Existen limitantes en las metodologías actuales como la disponibilidad a tiempo de los datos tanto moleculares como epidemiológicos y el modelaje evolutivo cuando se usan los datos

de vigilancia epidemiológica. Es solo cuestión de tiempo que los investigadores desarrollen los modelos más realistas capaces de describir la complejidad de la transmisión de enfermedades infecciosas desde sus diversas aristas (30).

II.11 Epidemiología del CV-A24v

II.11.1 Reservorio

El reservorio fundamental es el hombre, aunque recientemente se identificó al CV-A24v en heces de primates no humanos que no desarrollan los signos característicos de una conjuntivitis hemorrágica aguda (62, 106).

II.11.2 Período de incubación y transmisibilidad

El periodo de incubación de la conjuntivitis hemorrágica aguda es muy corto, entre 12 horas a 3 días. Se describe como el modo de transmisión principal el contacto con las secreciones oculares infectadas y con los elementos utilizados por los pacientes y personal de salud (toallas, sábanas, apósitos, instrumental médico). Pocos autores dan importancia a la vía respiratoria (aerosoles de faringe, nasofaringe) y se le resta valor a la vía fecal-oral, a pesar de que se reportan aislamientos de estos agentes en exudados faríngeos, nasofaríngeos y en las heces desde las primeras epidemias (38, 39, 92, 159). Además, se conoce que los enterovirus pueden aislarse de las aguas residuales y los poliovirus de moscas, y en el caso de la conjuntivitis hemorrágica aguda otros vectores mecánicos (guasasas, cucarachas) que entren en contacto con las secreciones o materiales infectados (62, 116, 160).

Los exudados conjuntivales, faríngeos y nasofaríngeos pueden ser infectivos hasta cuatro días como promedio, desde el comienzo de los síntomas y las heces hasta seis semanas (35).

La enfermedad es muy contagiosa con una alta tasa de transmisión del 70 al 100 % en los miembros de una familia y más de un 45-58 % de la población puede afectarse durante una epidemia (15). La transmisión en centros hospitalarios también se describió (161). Este padecimiento, generalmente, alcanza dimensiones epidémicas y los centros donde confluye un número considerable de personas como las escuelas, los centros de trabajo, los centros recreativos (piscinas) y las prisiones, son determinantes en la propagación. En los países desarrollados los brotes generalmente se limitan a los hogares o a las unidades oftalmológicas (11, 42, 162).

II.11.3 Prevención

La prevención es el pilar fundamental del tratamiento de la conjuntivitis hemorrágica aguda (163). Se recomienda el aislamiento domiciliario o ingreso hospitalario del paciente mientras la enfermedad esté en el período agudo. Se debe evitar el contacto directo o indirecto con secreciones oculares infectadas y con objetos utilizados por los pacientes o el personal de asistencia médica. Se recomienda la desinfección concurrente de las superficies, accesorios, avituallamiento del paciente e instrumental médico contaminados y el lavado frecuente de las manos, como medidas higiénicas efectivas (96, 164).

En Cuba, la conjuntivitis hemorrágica aguda es una enfermedad de notificación obligatoria, por lo que la alerta temprana y la educación sanitaria a la población en los períodos epidémicos mediante el uso correcto de los medios de difusión masiva contribuyen a minimizar la transmisión viral y, con ello, el impacto socio-económico de la enfermedad. Se deben evitar las aglomeraciones e insistir en la correcta asepsia y antisepsia en los centros médicos y otros donde pueden confluír un elevado número de personas como los mencionados en el epígrafe anterior (164, 165).

II.11.4 Tratamiento

En principio no existe tratamiento específico ni vacunas para la conjuntivitis hemorrágica aguda causada por los enterovirus. Se recomienda un tratamiento de soporte para aliviar los síntomas y evitar o tratar las posibles complicaciones. Habitualmente, se aplican compresas frías y lágrimas artificiales con vasoconstrictores para disminuir la extravasación de células sanguíneas y líquido. Se recomienda el uso de antibióticos para tratar las infecciones secundarias bacterianas (166). No se recomienda el uso de los esteroides tópicos para evitar el riesgo de perforaciones en la córnea y coinfecciones bacterianas (11, 167).

Algunos fármacos tales como los compuestos Benzimidazoles (Enviradone y Enviroxime), Arildone y el interferón inhiben la replicación de los enterovirus, pero ninguno se describe como agente quimioterapéutico (168-170). Diferentes grupos de investigadores describieron la eficacia del Interferón humano (IFN) o recombinantes humanos (rIFN-alpha y rIFN-beta) en la inhibición de la infección por el CV-A24v en cultivos de células conjuntivales humanas. Sin embargo, la actividad antiviral del IFN contra el CV-A24v puede variar con los

aislamientos de esta variante, la multiplicidad de la infección, el tipo del IFN, y el tiempo de la infección respecto al inicio del tratamiento con este compuesto. Los resultados de otras investigaciones en humanos acerca del uso efectivo o no de los IFNs son controversiales (171, 172).

Diferentes dianas virales y del hospedero son objeto de estudio para el desarrollo de antivirales contra los enterovirus. Las moléculas de unión a la cápside, las proteínas virales que juegan un importante papel en la replicación como la proteasa 3C, la helicasa 2C, y la polimerasa 3D y factores del hospedero celular cruciales en la replicación viral figuran entre ellas (173). Numerosos estudios plantearon las posibilidades del Pleconaril, el BTA-798 y el V-073 como inhibidores de la unión, pero no mostraron la misma efectividad *in vitro* contra todos los serotipos. La posibilidad de originarse mutantes de escape constituyó una limitación para la aprobación de sus usos (173-175).

Por otro lado, los conocimientos de la estructura y función de la proteasa 3C de la familia *Picornaviridae*, proporcionan información para el diseño y estudio de un número amplio de inhibidores de la misma, entre los que se encuentran los análogos del rupintrivir (AG7088), algunos inhibidores no covalentes y productos naturales como (´)-tisanona y sus análogos, y los flavonoides como la fisetina y la rutina (rutósido) (26, 89, 176, 177). Recientemente se describió el primer inhibidor macrociclo de la proteasa 3C para los norovirus, coronavirus y los picornavirus (178), aunque ninguno de estos compuestos están disponibles aún en el mercado farmacéutico.

El hidrocloreuro de guanidina (GuaHCl), el HBB y el MRL-1237 son otros compuestos dirigidos al bloqueo de la proteína 2A, así como el ribavirin, gliotoxina, amilorida y el DTriP-22 contra la 3D polimerasa, sin lograrse aún su aprobación farmacéutica (179-181).

Otra estrategia en desarrollo para el control de las infecciones enterovirales lo constituyen la administración de siRNA, del inglés small interfering RNA y un nuevo conjugado del ácido siálico pentavalente. Algunos estudios *in vitro* e *in vivo* demostraron la capacidad de ellos para inhibir la infección por CV-A24v o el EV-D70, aunque no se han establecido como un tratamiento para la enfermedad (182-185).

Varias son las propuestas en estudio para dilucidar un antiviral contra los enterovirus y, si bien es cierto que parece estar más cerca una solución plausible, todavía queda mucho por investigar y posiblemente una combinación de compuestos sea la solución más acertada (180).

II.11.5 Distribución geográfica

La conjuntivitis hemorrágica aguda se caracteriza por brotes explosivos en áreas densamente pobladas, por lo general durante períodos de clima cálido y húmedo. De hecho, en los países subdesarrollados, costeros, de la región tropical y subtropical, entre los 40° de latitud norte y 15° de latitud sur, se observa la mayor incidencia de epidemias (6, 42, 88).

II.12 Conjuntivitis Hemorrágica Aguda en Cuba

La conjuntivitis hemorrágica aguda no fue descrita en Cuba hasta su inesperada introducción en agosto de 1981. Desde entonces y hasta la fecha, esta enfermedad se manifiesta en periodos epidémicos cada 5 o 6 años, generalmente con picos durante dos años consecutivos, predominando el CV-A24v como el agente etiológico. Los brotes o epidemias alcanzaron la mayor cantidad de casos informados durante los meses cálidos y se observa que el invierno, como está descrito en los enterovirus, limitó la circulación del virus (13, 14, 23).

La primera epidemia de conjuntivitis hemorrágica aguda fue causada por el EV-D70 y se produjo en el año 1981 entre los meses de septiembre y diciembre, donde se informaron 884 015 casos. Hasta 1983 se acumularon otros 545 478 casos. Se infiere que por cada caso que solicitó asistencia médica ocurrieron entre cinco y diez casos que no lo hicieron. En el año 1984 se comunicaron 312 casos dispersos por todo el país y en el año 1985 no se notificaron pacientes (14, 186).

Posteriormente, en el mes de septiembre del año 1986, se produce el segundo periodo epidémico que afectó a todas las provincias del país, esta vez provocado por el CV-A24v. Los estudios epidemiológicos plantearon que el virus se introdujo en Cuba por becarios de Ghana que arribaron a la Isla de la Juventud. La epidemia acumuló 596 445 pacientes. En el año 1987 se notificaron 10 714 casos y en el año 1988 se reportaron 69 casos aislados (14, 36, 187).

En el año 1989 se detectó un nuevo brote causado por el EV-D70, importado por becarios extranjeros del Frente Polisario, que adquirieron la enfermedad en Argel en su tránsito hacia Cuba. En esta ocasión se informaron 317 312 casos y más de 48 000 en los primeros meses del año 1990. Durante el año 1991 se reportaron 585 casos, de ellos 406 en la ciudad de La Habana, siendo los meses de agosto, septiembre y octubre los de mayor incidencia. Las investigaciones serológicas demostraron en dos casos seroconversión al EV-D70 y en un caso al CV-A24v (14, 124).

Desde principios del año 1992 se mantuvo la ocurrencia de casos esporádicos. Entre octubre y diciembre se presentó una epidemia causada por el CV-A24v limitada al occidente del país (desde Pinar del Río hasta Villa Clara). No se informaron enfermos en la región oriental. En el año 1993, se reportaron casos desde el primer trimestre, pero el pico epidémico se informó a partir de septiembre y alcanzó la cifra de 87 521 casos de todo el país; aunque la epidemia tuvo menor morbilidad que la ocurrida en los años anteriores. El CV-A24v se identificó como el agente etiológico (14, 35).

En el año 1994 se informaron 975 casos y 224 en el año 1995 y se determinó por serología la circulación del CV-A24v. Para el año 1996 se informaron solo 47 casos. Los estudios serológicos determinaron la seroconversión contra el EV-D70 en solo dos casos (14).

Una nueva epidemia causada por el CV-A24v tuvo lugar en todo el país entre los meses de junio y diciembre del año 1997. El comportamiento de la enfermedad fue ascendente, comenzando por la ciudad de La Habana hasta afectarse todos los territorios del país y acumulándose 137 136 casos (13, 14, 35).

En el año 2003 se inició un nuevo brote epidémico causado por el CV-A24v. Los primeros casos se presentaron en la ciudad de La Habana en el mes de julio, a partir de los cuales se diseminó la enfermedad hacia el resto de las provincias. En esta ocasión la epidemia fue responsable de 171 910 casos informados (13).

A finales del mes de septiembre del año 2008 se reportaron los primeros casos de conjuntivitis hemorrágica aguda en la provincia de Pinar del Río. La enfermedad se diseminó por todo el país, disminuyendo la cifra de pacientes notificados a finales del mes de diciembre y acumulándose 21 208 casos. Entre los meses de junio y diciembre del año 2009, se informó

nuevamente un marcado aumento del número de casos de conjuntivitis hemorrágica aguda, pero esta vez la epidemia comenzó en la provincia de Las Tunas, en el oriente del país. Alrededor de 50 930 casos clínicos en toda la isla se informaron por las autoridades de salud pública. Se estimó que el total de enfermos en los dos años fue mayor de los 72 138 casos, debido a que no todos los pacientes acudieron a los centros de atención médica.

En julio del año 2017 la OPS alertó e informó de la ocurrencia de brotes en trece países de la región de las Américas (11). Hasta la semana 26 de ese año las autoridades de salud cubanas informaron 1 427 casos en siete provincias y 46 municipios. En toda la isla, la provincia que notificó el mayor número de casos fue Guantánamo con 858 casos, seguida de Santiago de Cuba con 359 casos, La Habana con 154 casos, Ciego de Ávila con 35 casos y Las Tunas con 21 casos. Hasta el desarrollo de la presente investigación se desconoció la cifra total de pacientes de este último periodo epidémico donde se identificó al CV-A24v como el agente etiológico (11, 12).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

III. MATERIALES Y MÉTODOS

III.1 Diseño general de la investigación

En esta investigación se realizaron tres estudios descriptivos para:

1. Identificar las variantes genéticas del CV-A24v que circularon en Cuba durante los cinco periodos epidémicos de conjuntivitis hemorrágica aguda (1986-2009) (responde al objetivo 1).
2. Inferir la filodinámica del CV-A24v haciendo énfasis en las variantes que circularon en Cuba durante los cinco periodos epidémicos de conjuntivitis hemorrágica aguda (1986-2009) (responde al objetivo 2).
3. Analizar a nivel molecular las cepas cubanas del CV-A24v obtenidas a partir de muestras clínicas de heces (responde al objetivo 3).

III.2 Identificación y caracterización filodinámica de las variantes genéticas del CV-A24v causantes de epidemias cubanas de Conjuntivitis Hemorrágica Aguda durante el periodo 1986-2009

III.2.1 Muestras

A partir de un universo de estudio de 297 cepas del CV-A24v, se estudiaron 175 aislamientos virales conservados a -80 °C en el Laboratorio Nacional de Referencia de Enterovirus del Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kourí”, de los cinco periodos epidémicos de conjuntivitis hemorrágica aguda que ocurrieron en Cuba entre los años 1986 hasta el año 2009 (Tabla 4).

Tabla 4. Datos epidemiológicos y de laboratorio de los aislamientos estudiados.

Años	Número de Casos Informados al MINSAP	Fecha de colección de las muestras (mese(s))	Número de muestras para aislamiento viral	Número de aislamientos virales conservados	Número de cepas virales seleccionadas
1986	596 445	septiembre	63	27	27
1987	10 714	agosto-septiembre	42	8	8
1992	3 363	octubre-diciembre	ND	22	22
1993	87 807	septiembre	ND	15	15
1997	137 136	julio-septiembre	64	43	43
2003	171 910	junio-agosto, noviembre	65	39	39
2005	59	noviembre	19	5	5
2008	21 208	septiembre-diciembre	209	45	6
2009	50 930	junio-diciembre	221	93	10
Total			683	297	175

ND: no disponibles

Fuente: Laboratorio Nacional de Referencia para los enterovirus del Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kouri”.

De las 175 cepas, 139 procedieron de exudados conjuntivales, una de un exudado nasal, otra de un exudado faríngeo y 34 de heces. En cuatro pacientes se obtuvieron cepas de heces y exudados oculares; el exudado faríngeo, nasal y dos heces se obtuvieron de un mismo paciente, así como siete cepas provinieron de muestras seriadas de heces de otro paciente.

Los aislamientos hasta el año 2005 se identificaron como CV-A24v mediante la neutralización con antisueros específicos elaborados en el mismo laboratorio y RCP genéricas y específicas (35, 124, 187). Los aislamientos de los años 2008 y 2009 se identificaron mediante secuenciación nucleotídica de la región 3C como se describe a continuación en los acápites del III.2.4 al III.2.5.3; secuencias que formaron parte del presente estudio.

Para identificar las variantes genéticas del CV-A24v que circularon en el periodo de estudio se secuenciaron parcialmente dos regiones del genoma viral codificadoras de la proteína de

la cápside VP1 (estructural) y de la proteasa 3C (no estructural). Las cepas de los años 2008 y 2009 solo se secuenciaron en la región 3C, ya que no se dispuso de los cebadores de la región VP1.

La secuenciación de los todos los aislamientos hasta el año 2005 se realizó en el Instituto Sueco para el diagnóstico de las enfermedades Infecciosas (SMI) del Instituto Karolinska. Para el periodo epidémico 2008-2009 debido a la escasez de recursos, solo fue posible secuenciar un número de aislamientos menor que se seleccionó de forma tal que quedaron representadas las regiones occidental, central y oriental de Cuba, así como el principio, medio y final de las epidemias en cada año (2008 y 2009). La secuenciación se realizó en el Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kourí”. En cada centro se emplearon procedimientos diferentes en correspondencia con las metodologías y tecnologías disponibles como se describe a continuación.

III.2.2 Extracción del ARN viral

La extracción del ARN viral se realizó mediante dos metodologías: extracción por Trizol, para los aislamientos hasta el año 2005, y la extracción manual con el estuche comercial QIAamp® Viral RNA (QIAGEN GmbH, Hilden, Alemania) para las muestras de los años 2008 y 2009.

III.2.2.1 Extracción del ARN viral por el método por Trizol

Se tomaron 250 µL de los aislamientos virales conservados a -80 °C y se les añadió 750 µL de TRIZOL (Life Technologies, Gibco BRL, EUA). Esta mezcla se agitó y se incubó durante cinco minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se le adicionaron 200 µL de cloroformo (Sigma, Alemania), se agitó vigorosamente durante 15 segundos y se incubó durante 15 minutos a temperatura ambiente. A continuación, la mezcla se centrifugó a 10 000 g (Centrifuga Sigma, Alemania), durante 15 minutos, a 4 °C. La fase superior se transfirió a un nuevo tubo de 1,5 mL, se le agregaron 500 µL de isopropanol (Sigma, Alemania) y se incubó, durante 10 minutos a temperatura ambiente. Concluida la incubación, se centrifugó a 10 000 g (Centrifuga Sigma, Alemania), durante 10 minutos, a 4 °C. La fase superior se desechó y al precipitado obtenido se le adicionó 1 mL de etanol (Merck, Alemania) al 75 %, se mezcló y se centrifugó a 10 000 g (Centrifuga Sigma, Alemania) durante cinco minutos a

4 °C. Después de eliminar todo el etanol residual, el precipitado se dejó secar completamente a temperatura ambiente. El material seco se resuspendió en 50 µL de agua libre de RNAsa (Sigma, Alemania).

III.2.2.2 Extracción del ARN con el estuche comercial QIAamp® Viral RNA

El ARN viral se obtuvo mediante extracción manual a partir de una alícuota de 140 µL de los aislamientos virales seleccionados con un volumen de elución final de 50 µL. Dicho procedimiento se realizó mediante el uso de todos los materiales gastables y reactivos del estuche comercial para la extracción del ácido nucleico QIAamp Viral RNA (QIAGEN, GmbH, Hilden, Alemania) teniendo en cuenta las instrucciones del fabricante.

III.2.3 Secuenciación nucleotídica de regiones genómicas parciales del CV-A24v: la proteasa 3C y la proteína estructural VP1

III.2.3.1 TR-RCP para la amplificación de regiones genómicas parciales 3C y VP1 del CV-A24v

Primeramente se sintetizaron los cDNAs con Oligo(dT)20 con el empleo del sistema ThermoScript™ TR- RCP (Life Technologies, Gibco BRL Inc.) y siguiendo las instrucciones del fabricante.

Posteriormente se realizó la RCP, mediante el uso del estuche comercial OneStep RT-PCR (QIAGEN, EUA), siguiendo las instrucciones del fabricante. Se utilizaron los cebadores correspondientes a cada región a una concentración final de 50 pmol y 5 µL del cDNA obtenido en 50 µL de volumen final. Las condiciones de amplificación aparecen en la tabla 5. Como control negativo se empleó agua libre de RNAsa (Sigma, Alemania).

Al finalizar la reacción se mezclaron 7 µL del producto amplificado con 3 µL del tampón estabilizador de muestra 6X (EDTA 500 mM, glicerol al 10 %, azul de bromofenol al 0,01 %). Se realizó la corrida electroforética de los productos amplificados en un gel de agarosa al 2 % en tampón TBE 1X (Tris-borato 40 mM, EDTA 2 mM, pH 8,0) teñido con Bromuro de Etidio (0,5 mg/mL) (Sigma, EUA).

Tabla 5. Cebadores empleados para la amplificación de las regiones parciales del genoma del CV-A24v, VP1 y 3C y condiciones de amplificación.

Región/ posición del Genoma	Cebador	Secuencia del cebador	Condiciones de amplificación	Cita
VP3/VP1 (1977-2969)	222	5'-CICCIGGIGGIAYRWACAT-3'	15 minutos a 95 °C 40 ciclos: 94 °C, 30 segundos	(123)
	224	5'-GCIATGYTIGGIACICAYRT-3'	55 °C, 30 segundos 68 °C, 40 segundos 72 °C 10 minutos	
3C (5371-6044)	D1	5'-TACAAACTGTTTGCTGGGCA-3'	15 minutos a 95 °C 34 ciclos: 94 °C, 60 segundos	(51)
	U2	5'-TTCTTTTGATGGTCTCAT-3'	55 °C, 45 segundos 72 °C, 2 minutos 72 °C 10 minutos	

Concluida la electroforesis que se realizó durante 30 minutos a 110 v, el producto amplificado se visualizó en un transiluminador de luz ultravioleta (Spectroline® Bi-O-Vision™, Alemania). Se utilizó el marcador de peso molecular DNA ladder 100 bp (PROMEGA, EUA) para verificar las muestras positivas que deben amplificar a una banda de la longitud esperada del producto de 673 pb para la región del genoma 3C y 992 pb para la región del genoma VP1.

III.2.3.2 Purificación de los productos de la RCP

Los productos de la RCP de las muestras del periodo 1986-2005 se purificaron de forma manual con el estuche comercial E.Z.N.A™ Cycle-Pure Kit (Omega Bio-tek, Inc.). Los productos amplificados de las muestras del periodo 2008-2009 se purificaron de forma manual con el estuche comercial QIAquick® PCR purification (QIAGEN, Alemania). En ambos casos se siguieron las indicaciones del fabricante. La calidad de la purificación se evaluó mediante electroforesis en gel de agarosa al 2 % (acápite III.2.3.1). La concentración final del producto purificado se estimó mediante comparación visual con el marcador de peso molecular DNA ladder 100 bp (PROMEGA, EUA).

III.2.3.3 Secuenciación nucleotídica

Para la reacción de secuencia se utilizaron los estuches comerciales ABI BigDye® Terminator v 3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, EUA) y GenomeLab™ Dye Terminator Cycle Sequencing (Beckman Coulter, EUA), para las muestras del periodo 1986-2005 y el periodo 2008-2009 respectivamente, siguiendo las indicaciones del fabricante. Se emplearon los cebadores descritos en la tabla 5 a una concentración de 5 µM. La amplificación se realizó en un equipo de RCP (MJ Research, EUA) con las siguientes condiciones de amplificación: 40 ciclos de 96 °C por 20 segundos, 55 °C por 20 segundos y 60 °C durante 4 minutos. Al concluir la reacción de secuencia, los productos se purificaron según el estuche comercial correspondiente a cada sistema siguiendo las indicaciones del fabricante. Los productos purificados de la reacción de secuencia se separaron por electroforesis capilar en dos secuenciadores automáticos ABI PRISM 3100 Genetic Analyser, Applied Biosystems (periodo 1986-2005) y CEQ 8800 Genetic Analyzer System, Beckman Coulter (periodo 2008-2009).

III.2.4 Análisis de las secuencias

En la figura 4 se muestra el algoritmo de trabajo desarrollado para el análisis de las secuencias nucleotídicas obtenidas para ambas regiones del genoma viral.

III.2.4.1 Identidad de los aislamientos cubanos del CV-A24v respecto a la cepa prototipo EH24_70_Singapur 1970

Todas las secuencias se editaron y se determinaron los porcentajes de identidad de los aislamientos cubanos del CV-A24v de cada periodo respecto a la cepa prototipo EH24_70_Singapur 1970 para las dos regiones del genoma utilizando el programa Bioedit v7.0.5.3 (188).

III.2.4.2 Alineamientos de secuencias nucleotídicas para los análisis filogenéticos y filodinámicos de las regiones genómicas parciales 3C y VP1 del CV-A24v

Primeramente se realizó un estudio filogenético preliminar de la región genómica 3C mediante el empleo del método NJ con un análisis de re-muestreo (del inglés bootstrap) de 1 000 réplicas con el programa MEGA6 (189) (Figura 4).

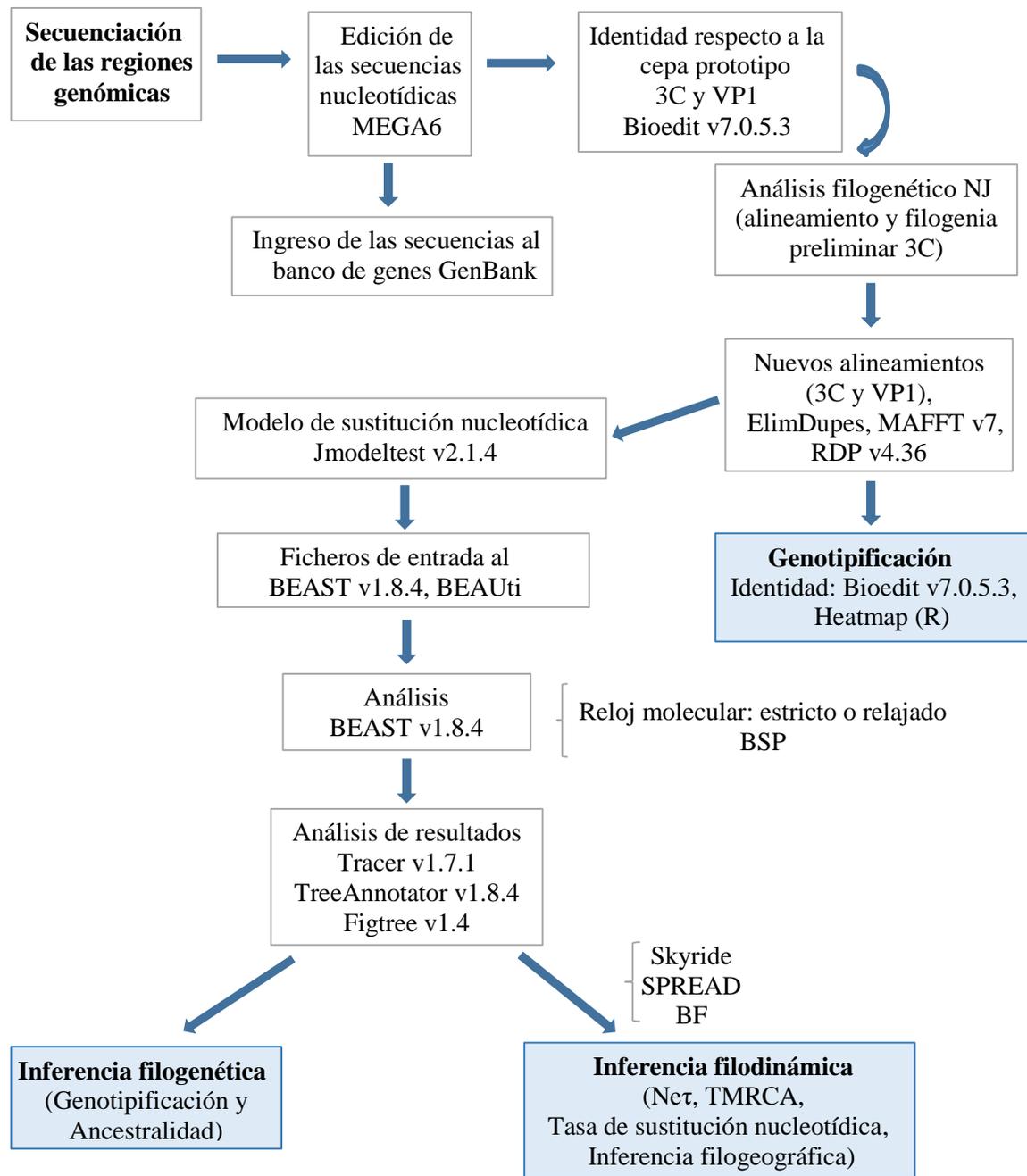


Figura 4. Algoritmo de trabajo para determinar la genotipificación y los análisis filodinámicos de las variantes cubanas del CV-A24v de los cinco periodos epidémicos estudiados, en base a las regiones genómicas 3C y VP1.

Este estudio también exploró la incorporación de grupos externos que consistieron de la secuencia EF026081 Joseph de Sudáfrica del CV-A24 y la secuencia FJ517648 Bielorrusia 2007 de Poliovirus tipo 2.

Teniendo en cuenta las inferencias filogenéticas resultantes y la disponibilidad de metodologías más robustas para realizar el análisis filogenético y filodinámico de ambas regiones del genoma viral secuenciadas se elaboraron nuevos conjuntos de alineamientos de las secuencias nucleotídicas. En cada conjunto se eliminaron las secuencias duplicadas, mediante el empleo de la herramienta ElimDupes de la base de datos de VIH de los Álamos (190). Se seleccionaron secuencias de diferentes regiones geográficas del mundo que representaron todos los periodos epidémicos y pandémicos del CV-A24v, lo más semejante posible en ambas regiones genómicas, según la disponibilidad de las secuencias en la base de genes GenBank. Cada secuencia contó con su número de acceso al banco de genes (si lo presentó), nombre o identificador, el país de procedencia y el año de la muestra clínica o el aislamiento correspondiente. Algunas secuencias de la región genómica VP1 de Filipinas fueron gentilmente donadas por los doctores Lea Necitas G Apostol del Instituto de Investigaciones del Departamento de Medicina Tropical de Salud y Oshitani de la Escuela de Postgrado de Medicina de la Universidad Tohoku.

Las secuencias se alinearon con el programa MAFFT v7 (191), empleando el marco de trabajo de herramientas de análisis bioinformático del EMBL-EBI (192).

III.2.4.3 Determinación de los eventos de recombinación en los alineamientos del CV-A24v y entre los alineamientos del CV-A24v con el resto de los serotipos de la especie C de los enterovirus

Los eventos de recombinación se analizaron en cada alineamiento, entre las secuencias de CV-A24v que los conformaron, y entre estas y las secuencias de todos los serotipos enterovirales pertenecientes a la especie C, que incluye al CV-A24v. El análisis se realizó mediante el programa de detección de la recombinación RDP v4.36, del inglés Recombination Detection Program (193).

III.2.4.4 Análisis filogenéticos y filodinámicos de las regiones genómicas parciales 3C y VP1 del CV-A24v

Para el análisis de cada región del genoma 3C y VP1, se desarrolló el mismo algoritmo por separado como se describe a continuación y se mostró en la figura 4.

Se realizó una primera genotipificación de las secuencias cubanas seleccionadas de cada periodo epidémico, en base a los porcentajes de identidad nucleotídica respecto al resto de las secuencias que conformaron los conjuntos de alineamientos (para la región 3C y VP1) definiendo los genotipos según lo descrito por Chu y colaboradores (6). Con el objetivo de visualizar dichos porcentajes de identidad nucleotídica se construyó un mapa de calor del inglés heatmap, usando el paquete estadístico R (194) a partir de la matriz de identidad calculada con el programa Bioedit v7.0.5.3 (188).

Para los análisis filogenéticos y filodinámicos se seleccionó primeramente el modelo de sustitución nucleotídica a través del programa JModeltest v2.1.4 (134).

Posteriormente, las inferencias filogenéticas así como los análisis filodinámicos se realizaron con los métodos Bayesianos mediante el programa BEAST v1.8.4 (144). Este programa ofrece un marco de trabajo integrador para los análisis filogenéticos y filodinámicos en dependencia de los objetivos que se proponga el investigador.

En una primera etapa se generó el fichero de entrada al programa BEAST v1.8.4 a través del programa BEAUti incluido en el paquete de dicho programa (144). La selección de la combinación de los modelos de reloj molecular y los modelos epidemiológicos de los árboles a priori se realizó estimando la (log) verosimilitud marginal a través del método de path sampling (PS) descrito por Baele y colaboradores. El cálculo de la verosimilitud marginal (log likelihood) por PS se llevó a cabo en una primera etapa para modelos con reloj molecular estricto o relajado, empleando una distribución exponencial no correlacionada (UCED) o una distribución logarítmica normal no correlacionada (UCLD) combinados con el modelo de coalescencia no paramétrico Bayesian Skyride Plot (BSP). Este modelo se seleccionó porque no asume a priori ningún escenario demográfico particular y las diferencias entre los tamaños de población en los intervalos coalescentes sucesivos se penalizan, con la penalidad siendo dependiente de la longitud de las cadenas de los intervalos coalescentes (time-aware) o siendo independiente del tiempo (195).

En todos los casos se llevaron a cabo dos corridas de las cadenas de Markov y Monte Carlo (MCMC) del enfoque bayesiano, con 70 millones de generaciones para la región 3C y 100 millones para la región VP1, para lograr convergencia en los resultados y obtener un tamaño efectivo de la muestra superior a 200 en los parámetros de interés (196). Cada corrida se

analizó individualmente y se combinó empleando como “burn-in” el 10 %, mediante el programa Tracer v1.7.1 (197).

Para el análisis de la distribución posterior de los árboles y la selección del árbol de mayor credibilidad, del inglés Maximum Clade Credibility (MCC), se empleó el programa TreeAnnotator v1.8.4 (198). Todos los árboles obtenidos se visualizaron a través del programa Figtree v1.4 disponible en el sitio (199).

Las tasas de sustituciones por sitio por año y el tiempo del ancestro común más reciente del inglés most recent common ancestor (TMRCA) se estimaron empleando un enfoque bayesiano de cadenas de Markov y Monte Carlo (MCMC), así como la reconstrucción de la población viral y de la historia dinámica espacio-temporal sin grupo externo, con el BSP disponible en el BEAST (144).

Para los análisis filogeográficos la inferencia se realizó definiendo dos particiones: una con la misma información con la que se generó la filogenia y la segunda en correspondencia con las localizaciones geográficas de cada secuencia incluida. Para la primera partición se usó la misma configuración que para el estudio filogenético, con el mismo modelo de reloj molecular, de sustitución nucleotídica, de coalescencia seleccionada y la configuración de los prioris. Para la partición de los países se utilizó como modelo de sustitución un modelo de difusión discreta donde los estados fueron los países usando una cadena de Markov continua tipo estándar. Para inferir la red social que indicó las rutas de propagación del virus se usó el método de selección de variables por búsqueda estocástica Bayesiana, del inglés, Bayesian Stochastic Search Variable Selection, BSSVS). Los resultados del análisis filogeográfico se visualizaron con el programa bayesiano SpreadD3, del inglés Spatial Phylogenetic Reconstruction of Evolutionary Dynamics (200). Se realizó la prueba del Factor de Bayes (FB) para obtener los datos estadísticos que explicaran adecuadamente los procesos filogeográfico y se tomaron como significativos aquellos valores mayores que tres ($BF > 3$).

A partir de las rutas de transmisión con $BF > 3$ se realizó además un estudio de redes de transmisión mediante el algoritmo Walktrap descrito por Pons y Lapaty (201).

III.3 Caracterización molecular de las secuencias cubanas del CV-A24v mediante la determinación de los cambios aminoacídicos respecto a la cepa prototipo EH24_70_Singapur 1970 en las regiones genómicas parciales 3C y VP1.

Los cambios aminoacídicos de las secuencias cubanas respecto a la cepa prototipo EH24_70_Singapur 1970 en las dos regiones del genoma estudiadas se determinaron mediante el uso del programa MEGA6 (189).

En una primera aproximación en la búsqueda de la relevancia estructural y funcional de las posiciones mutadas en la región genómica 3C, se realizó un análisis en el sitio de internet Prosite utilizando como base la estructura de la proteasa 3C del CV-A16 disponible (202).

Teniendo en cuenta la disponibilidad de la estructura cristalina del CV-A24v determinada por Zocher y colaboradores, se visualizaron esquemáticamente los cambios aminoacídicos encontrados en los 234 pb en la proteína VP1 mediante el programa DeepView 4.10 (203).

III.4 Análisis molecular de las cepas del CV-A24v cubanas obtenidas a partir de muestras clínicas de heces

El objetivo fundamental de esta tarea fue analizar a nivel molecular las cepas del CV-A24v cubanas que se obtuvieron a partir de heces de pacientes con sospecha clínica de conjuntivitis hemorrágica aguda de los periodos epidémicos 1997, 2003, 2008-2009 ya que en estos fue donde se obtuvieron las muestras de heces. De esta forma, se completaron los análisis con procedimientos de diagnósticos clásicos realizados previamente con los estudios moleculares realizados en la presente investigación.

III.4.1 Muestras

Dentro de los 175 aislamientos seleccionados para la secuenciación nucleotídica, 34 se correspondieron con aislamientos obtenidos a partir de muestras clínicas de heces. Los mismos se distribuyeron en los periodos epidémicos de la siguiente manera: 16 aislamientos del año 1997 obtenidos de siete pacientes; 16 del año 2003 logrados de 16 pacientes y dos del periodo 2008-2009, cada uno correspondiente a un paciente diferente en cada año.

III.4.2 Análisis moleculares

Los aislamientos a partir de las muestras clínicas de heces formaron parte de la muestra objeto de estudio según lo descrito en los acápite del III.2.1 al III.2.4.4. Es decir, que no hubo

distinción en cuanto al tipo de muestra de la cual procedió la cepa viral para la realización de los análisis.

Además, mediante el programa Bioedit v7.0.5.3 (188) se determinaron los porcentajes de identidad nucleotídica entre las secuencias obtenidas a partir de heces y las obtenidas a partir de los exudados, de diferentes pacientes y de un mismo paciente, en cada uno de los tres periodos epidémicos analizados.

III.5 Consideraciones éticas de la investigación

La presente investigación se desarrolló de acuerdo a las normas establecidas en la Declaración de Helsinki (Asociación Médica Mundial, 2013) (204).

El protocolo de la tesis se analizó por la Comisión Científica Especializada de Microbiología y por el Comité de Ética Institucional del IPK (CEI-IPK 06-17).

La presente investigación utilizó aislamientos virales conservados en congelación y obtenidos de muestras clínicas para diagnóstico tomadas de pacientes (niños y adultos) cubanos con cuadros clínicos de conjuntivitis hemorrágica aguda que se enviaron al laboratorio de Referencia de Enterovirus del IPK. Por lo tanto, el estudio no ofreció ningún riesgo ni daño ético para dichos individuos. En ningún momento se develó ningún dato identitario de los pacientes de los que procedían las muestras.

Se cumplieron las medidas de bioseguridad establecidas para el trabajo y la manipulación de las muestras se realizó según los niveles de riesgo establecidos por la Comisión Nacional de Seguridad Biológica en la Resolución 38/200.

Una vez culminada la investigación los resultados se informarán a todo el personal involucrado en la misma mediante actividades científicas, así como a las instancias pertinentes del Sistema de Salud y el MINSAP. Los resultados serán útiles para el manejo de las epidemias de conjuntivitis hemorrágica aguda y se notificarán al MINSAP para su utilización por el programa de Control Sanitario Internacional. Los resultados se publicarán en revistas de impacto.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

IV.1 Identificación de las variantes genéticas del CV-A24v que circularon durante los períodos epidémicos cubanos de Conjuntivitis Hemorrágica Aguda, 1986-2009.

IV.1.1 Secuenciación nucleotídica

El número de secuencias obtenidas y seleccionadas para los análisis de cada región del genoma viral (3C y VP1) se muestran en la tabla 6. Las secuencias seleccionadas resultaron de eliminar las secuencias repetidas o idénticas según la metodología descrita en el acápite III.2.4.2. Los números de acceso al banco de genes [GenBank](#) de las secuencias cubanas aparecen en el anexo 1.

Tabla 6. Número de secuencias cubanas obtenidas e incluidas en los análisis filogenéticos y filodinámicos.

Año	Número de aislamientos virales seleccionados para secuenciar	Número de secuencias obtenidas		Número de secuencias seleccionadas para los análisis	
		3C	VP1	3C	VP1
1986	27	27	27	3	8
1987	8	6	5	1	1
1992	22	22	22	9	4
1993	15	15	13	7	2
1997	43	43	38	14	9
2003	39	39	39	12	10
2005	5	5	5	1	1
2008	6	6	NR	1	NR
2009	10	10	NR	6	NR
Total	175	172	149	54	35

NR: no realizado.

El número de secuencias en la región VP1 fue menor respecto al de la región genómica 3C fundamentalmente porque para el último periodo epidémico no fue posible la secuenciación de dicha región genómica.

Numerosos autores describen la secuenciación de las regiones 3C y VP1 para los análisis filogenéticos del CV-A24v (6, 24, 63). Se demuestra así, la factibilidad del diseño de los cebadores correspondientes a cada región del genoma y la eficiencia de todos los métodos desarrollados.

IV.1.2 Identidad de las secuencias cubanas del CV-A24v respecto a la cepa prototipo EH24_70_Singapur 1970

Los miembros de un serotipo enteroviral deben presentar más de un 75 % de identidad nucleotídica y más de un 88 % de identidad aminoacídica, respecto a una cepa prototipo, fundamentalmente para la región genómica VP1 (71, 205). En los primeros estudios filogenéticos del CV-A24v, varios autores emplearon la región 3C siguiendo este criterio de identidad nucleotídica y aminoacídica (25, 88, 206, 207). Años más tarde se introdujo la identificación mediante la secuenciación parcial o completa de la proteína estructural VP1 (7, 208-210).

Las secuencias cubanas de cada periodo mostraron porcentajes de identidad nucleotídica mayores del 83 % y de identidad aminoacídica mayores del 93 % respecto a la cepa prototipo EH24_70, en las dos regiones genómicas secuenciadas (Tabla 7). Estos hallazgos evidencian la correspondencia entre la identificación de esta variante a partir de la secuenciación parcial de ambas regiones del genoma viral con las identificaciones previas realizadas en Cuba por Más, Comellas, Ávalos y colaboradores. Estos autores identificaron mediante la neutralización con antisueros específicos o RCP específicas al CV-A24v como el agente etiológico de los periodos epidémicos cubanos hasta el año 2005 (35, 36, 187).

Los porcentajes de identidad del CV-A24v respecto a la cepa prototipo EH24_70_Singapur 1970 se informaron en los diversos periodos epidémicos previos. Ishiko y colaboradores determinaron como máximo un 88 % de identidad entre las secuencias de Singapur, Tailandia, Japón, Taiwán, China y Ghana, en la región 3C, en los periodos epidémicos ocurridos entre los años 1970-1989 (88). Sin embargo, para el presente estudio, no se encontraron referencias acerca de las secuencias de las variantes del CV-A24v que circularon

en la década de los años 90, y sí de las epidemias ocurridas a partir del año 2000 (6, 211, 212).

Tabla 7. Identidad nucleotídica y aminoacídica entre las secuencias cubanas del CV-A24v y la cepa prototipo EH24_70_Singapur 1970 para la región 3C y VP1.

Periodos Epidémicos	3C EH24_70_Singapur 1970		VP1 EH24_70_Singapur 1970	
	% identidad nucleotídica	% identidad aa	% identidad nucleotídica	% identidad aa
Cuba 1986-1987	89,1-89,3	98,2-98,8	88,0-88,4	97,4
Cuba 1992-1993	88,1-89,1	97,6-98,2	85,4-87,1	96,1-98,7
Cuba 1997	85,9-86,7	95,8-97,0	85,4-86,7	96,1-97,4
Cuba 2003/2005	86,1-86,9	95,8-96,4	83,7-85,4	93,5-94,8
Cuba 2008-2009	85,7-86,1	96,4-97,0	ND	ND

ND: no determinado.

Cabrerizo y colaboradores determinaron un porcentaje de identidad nucleotídica de 86,3 a 87,8, entre las secuencias españolas y la cepa prototipo, para la región VP1, durante la epidemia de conjuntivitis hemorrágica aguda del año 2004 (211). Yeo y colaboradores informaron un 85,8 % de identidad nucleotídica y un 95,4 % aminoacídica, para la región VP1, y un 86,5 % de identidad nucleotídica y un 96,2 % aminoacídica para la región 3C, entre las cepas de Singapur y la cepa prototipo, en una epidemia de conjuntivitis hemorrágica aguda del año 2005 (212). Por otra parte, Chu y colaboradores determinaron porcentaje de identidad entre el 81,5 y 88,3 en la región VP1, y 83,2 y 89 en la región 3C, entre las secuencias de Taiwán y la cepa prototipo, en los periodos epidémicos ocurridos entre los años 1985-2007 (en VP1) y los ocurridos en el periodo 2000-2006 (en 3C) (6).

Por todo lo anterior expuesto es de notar que los porcentajes de identidad de las secuencias cubanas fueron similares a los descritos por otros autores durante cada uno de los periodos epidémicos estudiados.

IV.1.3 Conjuntos de alineamientos de secuencias nucleotídicas para los análisis filogenéticos y filodinámicos de las regiones genómicas parciales 3C y VP1 del CV-A24v

Para el análisis preliminar de la región genómica 3C mediante el método de distancia NJ, se seleccionaron 59 secuencias de 13 países, y 44 secuencias cubanas (tomadas al azar) de los cinco periodos epidémicos estudiados (Anexo 2).

Los análisis filogenéticos con y sin grupos externos (CV-A24 cepa EF026081 Joseph de Sudáfrica y Poliovirus tipo 2: FJ517648 Bielorrusia 2007) mostraron topologías semejantes, por lo que en los nuevos análisis no se incluyeron los grupos externos. Teniendo en cuenta los resultados de esta inferencia filogenética se confeccionaron nuevos conjuntos de alineamientos de secuencias nucleotídicas para los análisis de la región genómica 3C y VP1 por los métodos Bayesianos.

Una vez eliminadas las secuencias nucleotídicas idénticas de un mismo país y año o periodo epidémico, los nuevos conjuntos quedaron constituidos por 54 secuencias cubanas y 83 secuencias de 17 países para la región 3C, y 35 secuencias cubanas y 95 secuencias de 19 países para la región VP1.

El número de secuencias cubanas únicas por años epidémicos que fueron las incluidas en los nuevos conjuntos de alineamientos y para cada región del genoma en estudio se muestran en la tabla 6. Estos resultados demuestran que prácticamente durante un año epidémico circula la misma variante genética del CV-A24v apenas sin cambios nucleotídicos. Este comportamiento fue descrito por otros autores en diferentes periodos epidémicos como los ocurridos en Taiwán en los años 1985-1986, 1988-1989, 2002-2003 (24, 206, 213), en Brasil 2004, 2009 (56, 214), China 2010 (63).

Las secuencias de otros países se seleccionaron de forma tal que se correspondieran con los cinco periodos epidémicos cubanos estudiados, así como, las principales regiones geográficas donde se han documentado epidemias de conjuntivitis hemorrágica aguda: Asia, África, Europa y la región de las Américas. A diferencia de la región 3C, el número de secuencias de la región VP1 para cada periodo epidémico y de las zonas geográficas referidas, es limitado, fundamentalmente para los primeros periodos epidémicos donde esta región genómica no era comúnmente utilizada en estudios filogenéticos (211, 214). En consecuencia, no fue posible incluir las mismas cepas foráneas del CV-A24v para el análisis de las dos regiones genómicas, y en la región VP1, la mayor representatividad tanto geográfica como temporal, se logró con el análisis de 234 pb del extremo 3', tal como refieren otros investigadores (6, 9, 211, 215).

IV.1.4 Eventos de recombinación en los alineamientos del CV-A24v y entre los alineamientos del CV-A24v con el resto de los serotipos de la especie C de los enterovirus

No se detectaron eventos de recombinación entre las secuencias nucleotídicas de cada conjunto de alineamientos en la región genómica 3C y VP1. De forma similar ocurrió con el análisis de dichos alineamientos y las secuencias nucleotídicas del resto de los serotipos enterovirales que integran la especie C. Por lo tanto, los análisis desarrollados en ambas regiones genómicas con estos conjuntos de secuencias, no estuvieron sesgados por la existencia de cepas recombinantes del CV-A24v o con otro serotipo dentro de la especie C, al menos, en las secuencias seleccionadas.

Se plantea que la recombinación entre los enterovirus es frecuente y ocurre principalmente entre los miembros de una misma especie, aunque los patrones pueden diferir entre los serotipos que la integran (29, 216, 217). Los eventos recombinantes suelen ocurrir en la región codificadora de las proteínas no estructurales, pero se pueden encontrar en las proteínas de la cápside VP1 y VP2 de los poliovirus (218, 219). Smura y colaboradores observaron una barrera de recombinación estricta entre el CVA-24v y otros serotipos de la especie C en el análisis del genoma completo. En dicho estudio, las cepas del CVA-24v se agruparon en todas las regiones codificantes del genoma, lo que sugiere que no ocurrió recombinación entre las cepas del CVA-24v y los otros serotipos de la especie C de los enterovirus desde la aparición del linaje CVA-24v en el año 1970 (29). Yen y colaboradores tampoco detectaron eventos de recombinación en las regiones del genoma VP1 y 3D en un estudio realizado en el año 2016 (22).

IV.1.5 Inferencias filogenéticas de los periodos epidémicos cubanos de Conjuntivitis Hemorrágica Aguda, 1986-2009

Una vez conformados los conjuntos de alineamientos de cada región genómica, se realizó una primera genotipificación de las secuencias cubanas en base a los porcentajes de identidad entre estas y el resto de las secuencias que conformaron el alineamiento. Las figuras 5 y 6 muestran los mapas de calor, del inglés heatmap. Estos mapas son una representación gráfica de la identidad entre todas las secuencias seleccionadas, definiéndose el genotipo correspondiente según Chu y colaboradores (6).

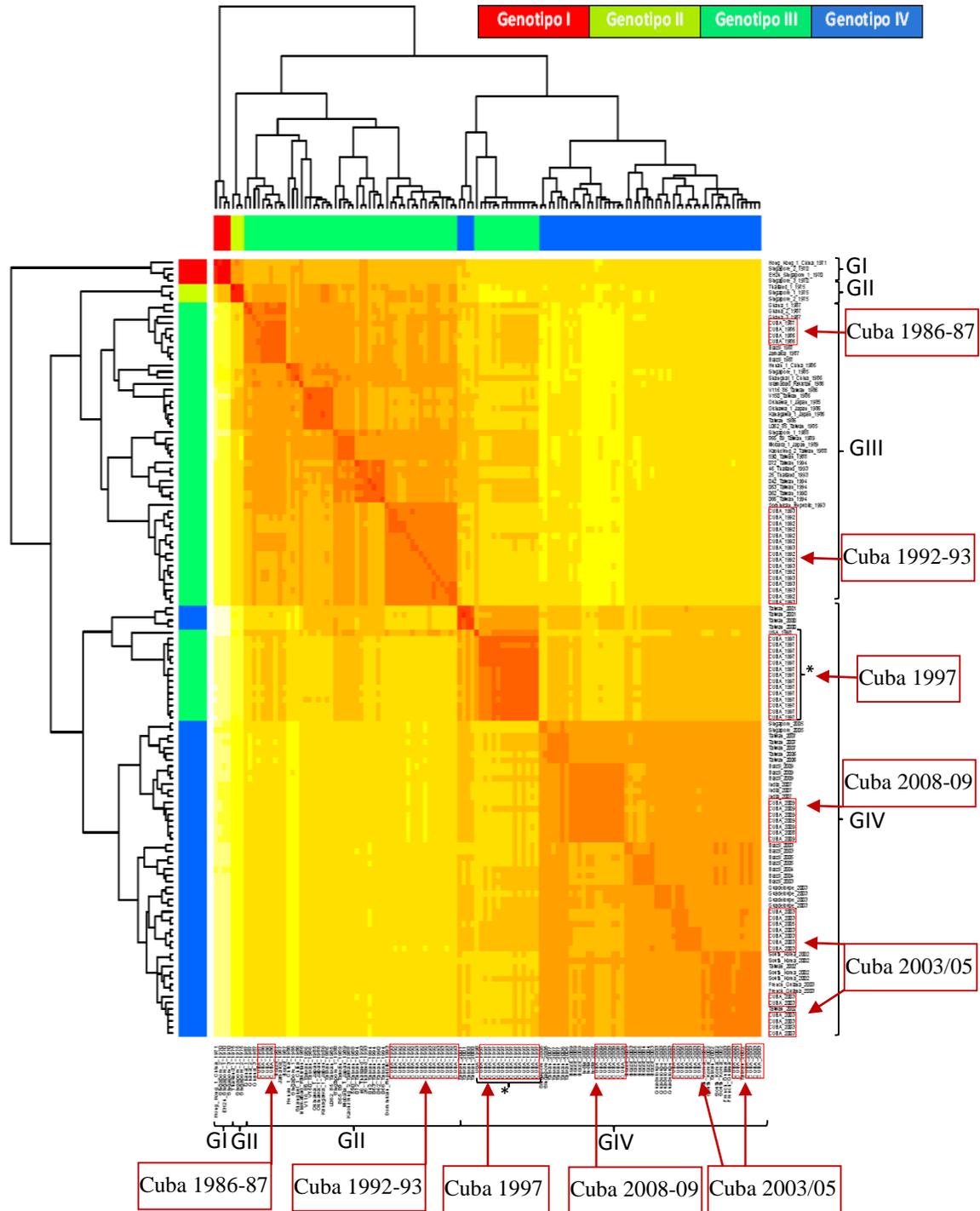


Figura 5. Mapa de calor a partir de la matriz de identidad nucleotídica de las secuencias del CV-A24v para la región genómica 3C. En la parte superior en colores y a la derecha y en la parte inferior se indican los genotipos GI-GIV según Chu y colaboradores (6). *Secuencias de Cuba (1997) y de EUA (1998). Enmarcadas en rectángulos rojos se indican las secuencias cubanas de los cinco periodos epidémicos estudiados.

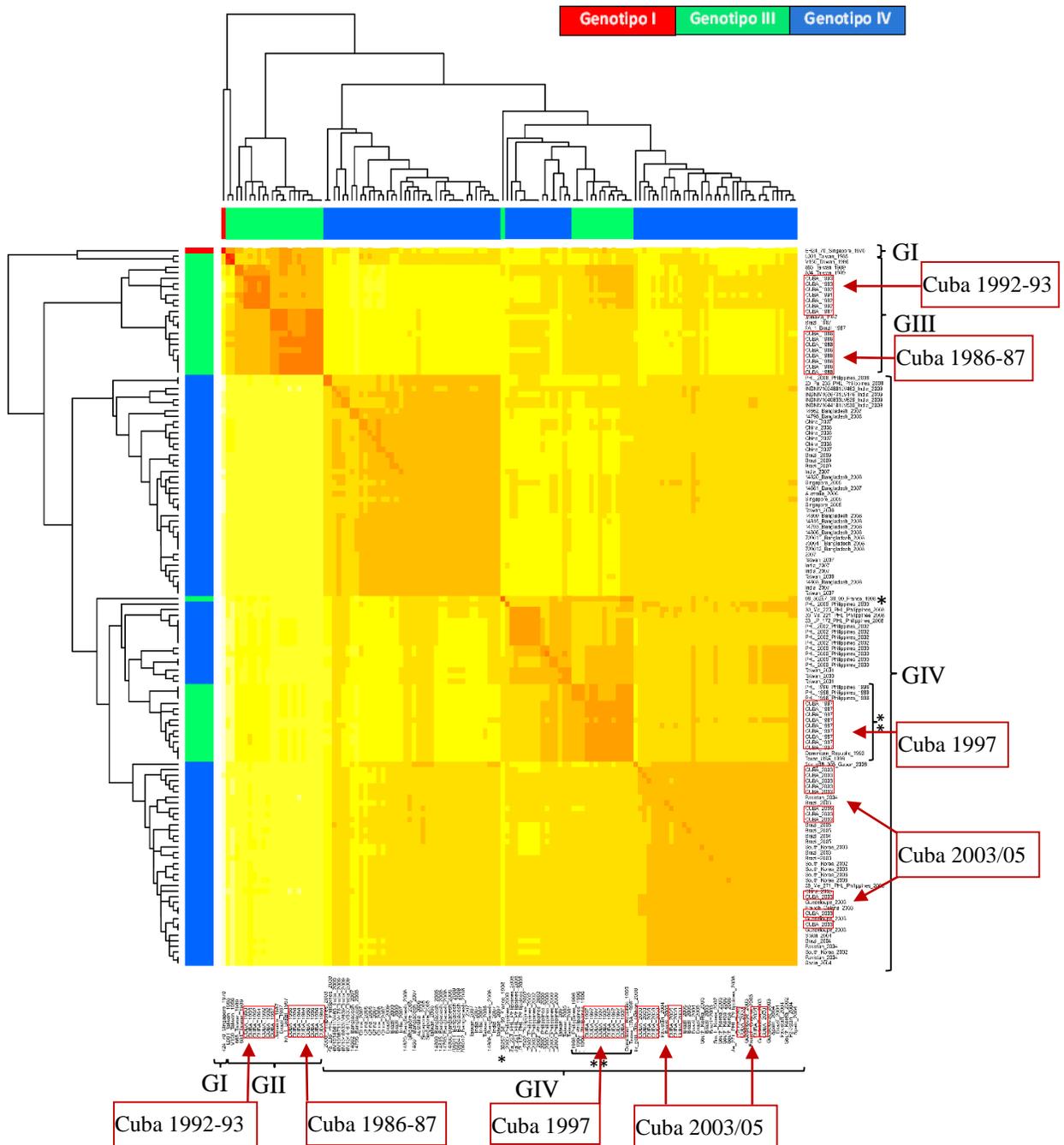


Figura 6. Mapa de calor a partir de la matriz de identidad nucleotídica de las secuencias del CV-A24v para la región genómica VP1. En la parte superior en colores, a la derecha y en la parte inferior se indican los genotipos GI, GIII y GIV según Chu y colaboradores (6).*: Secuencia de Francia (1998), **: Secuencias de Cuba (1997), secuencias de Filipinas (1996), secuencia de EUA (1998) y secuencia de República Dominicana (1993). Enmarcadas en rectángulos rojos se indican las secuencias cubanas.

Los colores desde el amarillo hasta el rojo se corresponden con el aumento de los porcentajes de identidad entre las secuencias que conforman los alineamientos. En el diagrama de ambas regiones genómicas se muestra que en cada genotipo existe un alto grado de identidad promedio dentro del genotipo (GI-GIV), la cual va disminuyendo en la medida que se compara con los diferentes agrupamientos representativos de los genotipos diferentes.

En el GIII las secuencias de inicios de la década de los años 90 mantienen altos valores de identidad, donde se incluyen el primer y el segundo periodo epidémico cubano (1986-1987 y 1992-1993). Sin embargo, las secuencias de finales de esta década, donde se incluyen las cubanas del año 1997, se agrupan con un grado de identidad media, de carácter moderado, con las secuencias tempranas (años 2002-2004) del genotipo IV. Lo mismo ocurre con la secuencia de República Dominicana del año 1993, las secuencias de Filipinas del año 1996, la secuencia de los EUA del año 1998 y la secuencia francesa del año 1998, para la región VP1. Este comportamiento sugiere que estas secuencias se corresponden más al genotipo GIV que al GIII, de forma que, posiblemente, el GIV comenzó su circulación a finales de los 90, y a partir del año 2000 alcanzó todo su potencial epidémico. Las secuencias cubanas de los últimos periodos epidémicos (2003/2005, 2008-2009) se ubicaron dentro del GIV con altos grados de identidad.

Se obtuvieron los modelos de sustitución nucleotídica TrN+I+G para la región genómica 3C y TrNef+G para la región VP1 mediante el programa JModeltest. Como el programa BEAST no dispone de ambos modelos de sustitución nucleotídica se utilizó el modelo equivalente GTR+i+g+f.

En las figuras 7 y 8 se muestran los árboles filogenéticos resultantes del análisis en el programa BEAST para las regiones 3C y VP1 respectivamente.

Periodo epidémico 1986-1987

En el análisis de la región genómica 3C (Figura 7) las secuencias cubanas de los años 1986 y 1987 se agruparon con secuencias de Jamaica y Brasil del año 1987 y este grupo compartió un ancestro común con las secuencias de Ghana del año 1987. En el análisis de la región genómica VP1 (Figura 8), las secuencias cubanas fueron homólogas igualmente con las secuencias de Brasil y Jamaica del año 1987.

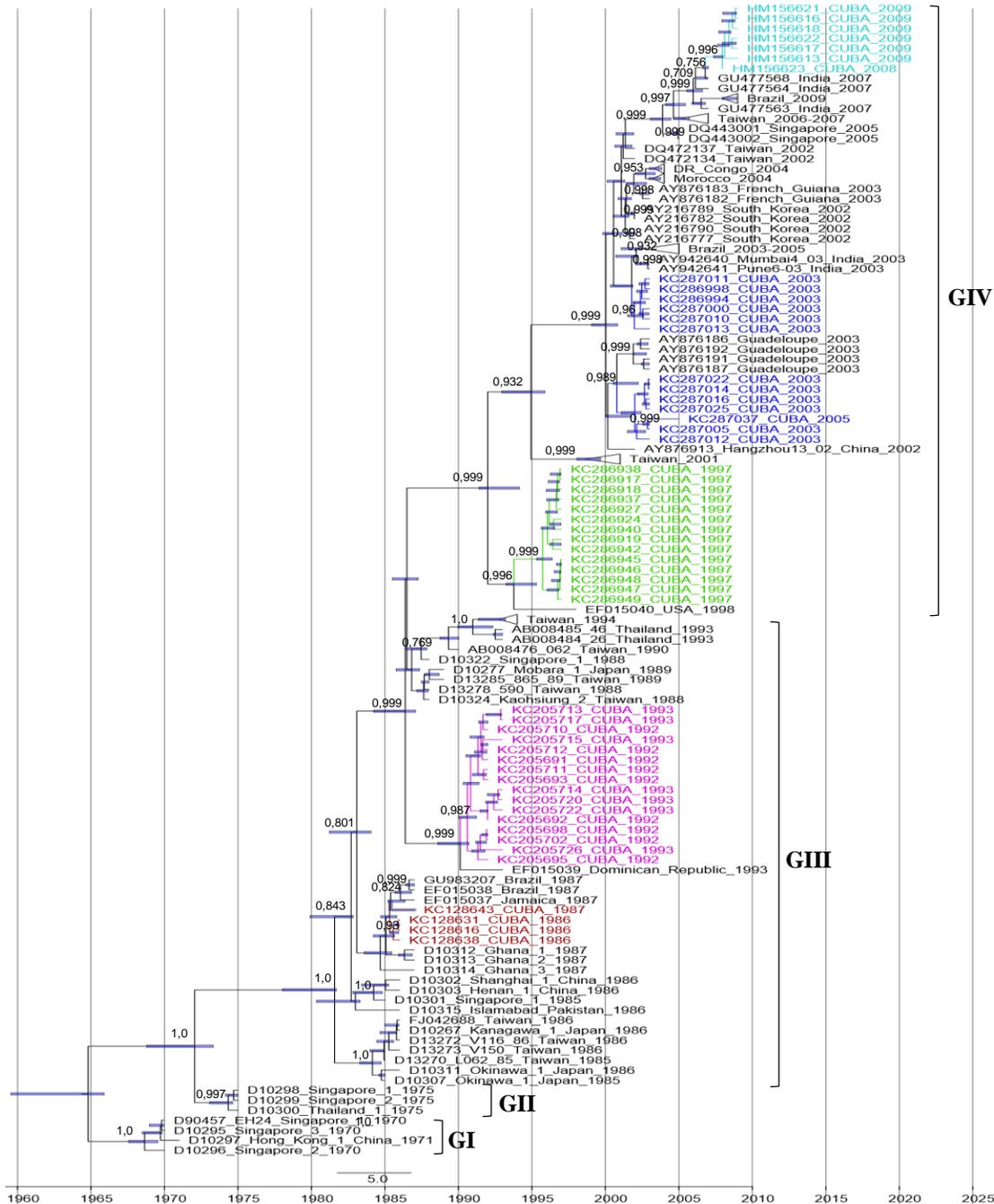


Figura 7. Análisis filogenético de la región 3C (507 pb) de 54 secuencias de las epidemias cubanas de conjuntivitis hemorrágica aguda (1986-2009) y 82 secuencias de 17 países. Las barras azules en los nodos indican el 95 % HPD de los TMRCA. Los valores numéricos en los nodos indican la probabilidad posterior de la inferencia Bayesiana mayores de 0.700 (70.0 %). La longitud de las ramas indican el tiempo de evolución y la barra de la escala indica el tiempo calendario. A la derecha se indican los genotipos para la región 3C (GI- GIV) según este estudio. Las secuencias se identificaron por su número de acceso al banco de genes GenBank, nombre, país y año de la cepa correspondiente. Resaltados en colores los periodos epidémicos cubanos estudiados.

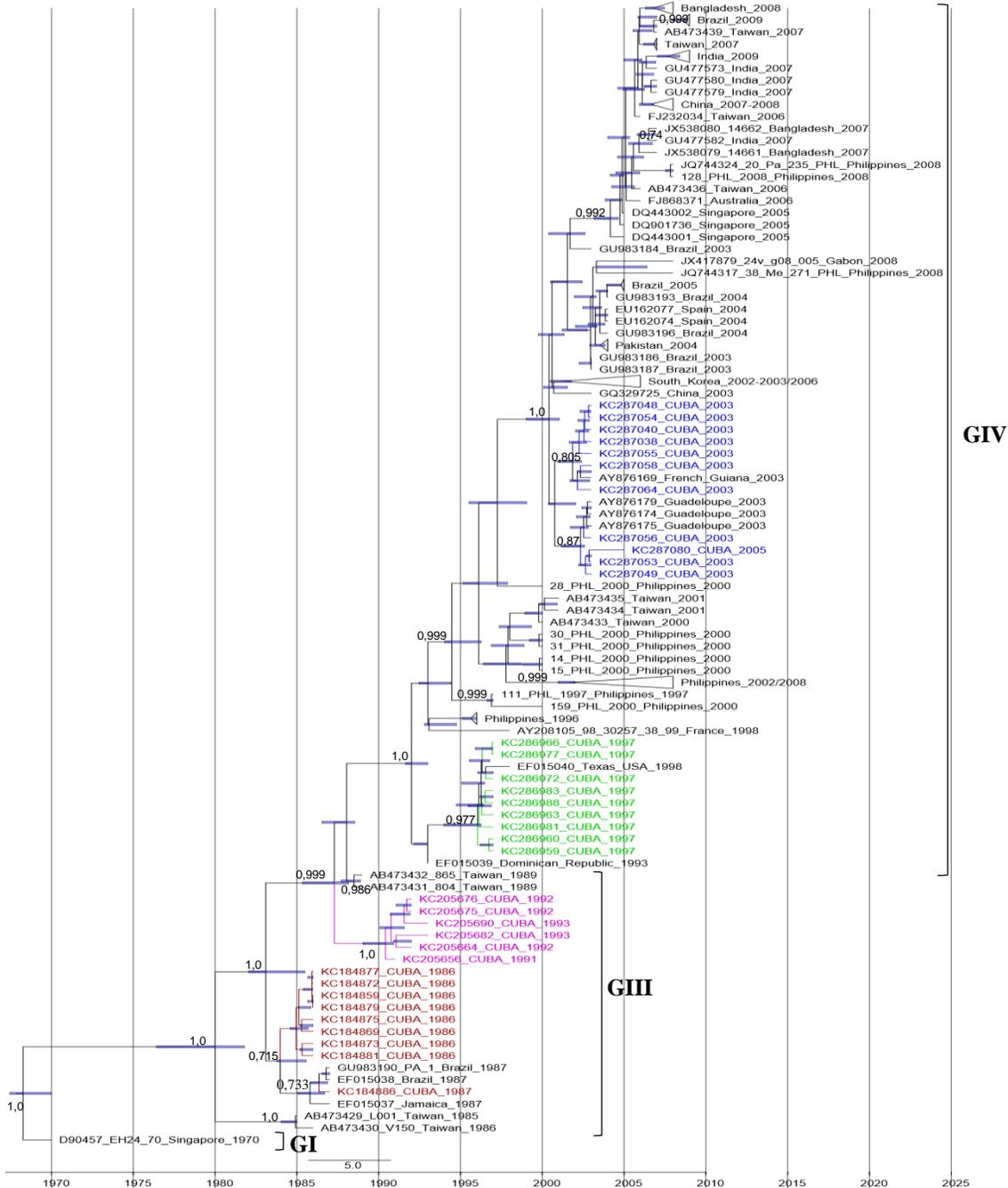


Figura 8. Análisis filogenético de la región VP1 (234 pb) de 35 secuencias de las epidemias cubanas de conjuntivitis hemorrágica aguda (1986-2009) y 96 secuencias de 19 países. Las barras azules en los nodos indican el 95 % HPD de los TMRCA. Los valores numéricos en los nodos indican la probabilidad posterior de la inferencia Bayesiana mayores de 0.700. La longitud de las ramas indican el tiempo de evolución y la barra de la escala indica el tiempo calendario. A la derecha se indican los genotipos para la región VP1 (GI, GIII, GIV) según este estudio. Las secuencias se identificaron por su número de acceso al banco de genes GenBank, nombre, país y año de la cepa correspondiente. Resaltados en colores los periodos epidémicos cubanos estudiados.

Las secuencias de Ghana no existen de ese periodo epidémico para la región genómica VP1 en el banco de genes GenBank. Las secuencias cubanas se correspondieron con el GIII en las dos regiones del genoma viral estudiadas.

Otros autores como Shukla y colaboradores encontraron relación de ancestralidad entre las secuencias de Brasil, Ghana y Jamaica. Chansaenroj y colaboradores, obtuvieron relación de ancestralidad entre las secuencias cubanas y las de Ghana, y Wu y colaboradores entre las secuencias cubanas y las de Brasil (10, 63).

Hasta 1986, el CV-A24v circuló solamente en el sudeste asiático y la India. A partir de ese año, una nueva oleada epidémica se informó desde Taiwán, Japón, América Samoa, África y las Américas (220-222).

La primera información de infección de CV-A24v en África se obtuvo desde Túnez en noviembre de 1981(223). Al sur del Sahara, el CV-A24v fue el responsable de una epidemia en Congo-Kinshasa en 1986, que se piensa se originó en Angola (48). Brandful y colaboradores informaron acerca de una epidemia de conjuntivitis hemorrágica aguda en Accra, Ghana, de mayo a noviembre de 1987, donde los estudios filogenéticos determinaron que el CVA24v se introdujo en el país o en áreas aledañas posiblemente dos años o más con antelación, es decir en la primera mitad del año 1985 (224).

En el Caribe, numerosas islas informaron epidemias en el año 1986: Trinidad, Jamaica, y St. Croix, donde se identificó por primera vez en el hemisferio occidental al CV-A24v (222). Posteriormente, en Brasil se documentó la introducción de esta variante antigénica en la ciudad de Belém y en México en 1987 (225, 226).

Los resultados obtenidos se correspondieron con las descripciones epidemiológicas de la época en Cuba, que informaron que el CV-A24v se introdujo a través de los estudiantes de Ghana que arribaron a la Isla de la Juventud en el verano de 1986. En el mes de septiembre se notificó el comienzo de la epidemia que afectó a 596 445 personas en toda la isla. En el año 1987 se comunicaron 10 714 casos y en el año 1988, 69 casos aislados (14, 36, 187).

Periodo epidémico 1992-1993

Para el análisis de ambas regiones genómicas de este periodo no se encontraron muchas secuencias de diferentes países en el banco de genes GenBank.

En la región 3C, las secuencias cubanas se agruparon en una rama independiente mostrando homología con una secuencia de la República Dominicana de 1993 (EF015039). En el análisis de la región VP1, las secuencias cubanas formaron una rama totalmente independiente. Como en el periodo epidémico anterior las secuencias cubanas se correspondieron con el GIII en las dos regiones del genoma viral estudiadas (Figuras 7 y 8).

A pesar de no disponer de un número significativo de secuencias de otros países con las que se pudiera definir otras relaciones de ancestralidad de las secuencias cubanas, si se evidencia en ambas filogenias que este periodo fue causado por una nueva variante independiente a la del periodo cubano epidémico anterior.

En los análisis filogenéticos la selección de las secuencias es la premisa fundamental para los resultados finales. Al desarrollo de la presente son pocos los autores que incluyen las secuencias cubanas en sus análisis, la mayoría incluyen la secuencia dominicana del año 1993 (EF015039) para representar este periodo epidémico, y variados son los resultados en dependencia del resto de las secuencias incluidas (25, 27).

Como consecuencia de este precepto los resultados de este estudio no coincidieron fehacientemente con lo reportado por otros autores. Por ejemplo, en los estudios realizados por Chansaenroj y Wu y colaboradores, las secuencias cubanas de este periodo en el análisis de la región 3C, mostraron un ancestro común con la secuencia dominicana del año 1993, y esta rama con secuencias del sudeste asiático que circularon entre los años 1988-1989 (10, 63). En el análisis la región VP1, Chansaenroj y colaboradores, encontraron homología entre la rama de las secuencias cubanas de los años 1992-1993 con la rama de las secuencias brasileñas y cubanas que circularon entre los años 1986-1987 (10).

La década de los 90 se consideró epidemiológicamente un periodo “silente” posiblemente por la poca documentación de las epidemias de conjuntivitis hemorrágica aguda causadas por el CV-A24v. Sin embargo, algunos investigadores como Lin y colaboradores en Asia, describieron epidemias en Taiwán, en los años 1990-1991 y en 1994 (51). Otros brotes se informaron desde Tailandia (1992), Japón (1993), India (1994) y Nigeria (1992) (50-52, 227).

En Cuba, entre octubre y diciembre de 1992 ocurrió una epidemia limitada al occidente y centro del país que afectó a 3 363 personas. En el primer trimestre del año 1993, se observó un comportamiento endémico que alcanzó las provincias orientales y en septiembre ocurrió un nuevo pico epidémico. Al finalizar este año se notificaron 87 521 pacientes y se caracterizó por una permanente circulación del CV-A24v en todo el país con una morbilidad menor a las ocurridas en los años previos (14). En el año 1994 se mantuvo el comportamiento endémico con una cola residual con 975 casos. Mediante técnicas serológicas se demostró la circulación del CV-A24v.

Periodo epidémico 1997

Para el análisis filogenético de ambas regiones del genoma viral del año 1997 o próximos a esta fecha se encontraron pocas secuencias de otros países, de forma similar que en el periodo epidémico anterior.

En el análisis de la región 3C, las secuencias cubanas se agruparon en una rama mostrando homología con la secuencia de los EUA del 1998 (EF015040 USA 1998). El análisis de la región VP1 mostró el mismo resultado, pero con la incorporación a dicha rama de la secuencia de República Dominicana del año 1993 (EF015039) (Figuras 7 y 8).

En la filogenia de las dos regiones genómicas se observó que una nueva variante independiente a la del periodo cubano epidémico anterior, causó esta epidemia y que posiblemente evolucionó de variantes que circularon en el sudeste asiático en el periodo 1988-1994. Se mostraron relaciones de ancestralidad cercanas entre las secuencias cubanas del año 1997 y las secuencias de la primera oleada epidémica del GIV. Estos resultados fortalecen los hallazgos del análisis del mapa de calor discutido anteriormente, y fortalece la decisión de clasificar las secuencias cubanas de este periodo epidémico dentro del GIV.

Chansaenroj y colaboradores, encontraron homología entre las secuencias de Cuba, EUA (EF015040) y República Dominicana (EF015039) (10) lo que coincide con nuestros resultados. De igual forma Laxmivandana, De y Yen y colaboradores, aunque no incluyeron las secuencias cubanas, también encontraron la relación de ancestralidad entre la secuencia dominicana y la norteamericana utilizadas en este estudio (22, 27, 105).

Se conoce que numerosos países como Puerto Rico, Antigua/Barbuda, Bahamas, Islas Vírgenes Británicas, St Croix, Islas Vírgenes Americanas, Trinidad y Tobago, Christopher/Nevis, Surinam y México experimentaron una fuerte oleada epidémica en 1997 y 1998 (49, 53). En China e India, también se documentaron epidemias en el año 1997 y de Francia existe solo una secuencia en el banco de genes GenBank de un paciente con conjuntivitis hemorrágica aguda del año 1998 (54, 55).

En Cuba no se determinó el origen epidemiológico de esta epidemia que comenzó en La Habana a finales del mes de mayo, y se extendió por todo el país hasta el mes de diciembre, con 137 136 pacientes informados (14). En los años 1998 y 1999, se recibieron para diagnóstico etiológico de conjuntivitis hemorrágica aguda las muestras clínicas de 138 y 102 pacientes respectivamente, y se detectaron anticuerpos neutralizantes al CV-A24v, al EV70 y a los Adenovirus. De estos años no se encontraron cepas virales conservadas que pudieran incluirse en el presente estudio.

Periodo epidémico 2003

En los análisis filogenéticos de la región genómica 3C algunas secuencias cubanas, incluyendo una del año 2005, mostraron homología con las secuencias de Guadalupe y este conjunto con una secuencia de China del año 2002. Las secuencias restantes se agruparon en otra rama que compartió un ancestro común con las secuencias de Brasil del periodo epidémico 2003-2005 y secuencias de la India del año 2003 (Figura 7). En la región genómica VP1, las secuencias cubanas se dividieron en dos grupos. Uno de ellos mostró homología con las secuencias de Guadalupe y el otro con las secuencias de Guyana Francesa del año 2003, y a su vez, ambas ramas compartieron un ancestro común (Figura 8).

Del análisis de ambas regiones, se infiere que las variantes genéticas del CV-A24v que circularon en Cuba compartieron un ancestro común con las cepas que circularon en la región de las Américas y en Asia y se incluyeron dentro del genotipo GIV.

Estos resultados fueron similares a los de Chansaenroj y colaboradores, que incluyeron secuencias cubanas de este periodo (10). Otros estudios describieron la relación de las cepas del CV-A24v causantes de epidemias en los continentes europeo (España) y africano (Túnez, Marruecos, Argelia y la República Popular del Congo) con las cepas asiáticas, incluso en ese

último continente fue notable la propagación viral en numerosos países (Filipinas, Malasia, Taiwán, Corea del Sur, China, India, Pakistán) (102, 211, 213, 228, 229). En las Américas, el CV-A24v se introdujo desde Asia por América del Sur, en Brasil específicamente, y se diseminó hacia el Caribe: Guyana Francesa, Guadalupe, las Antillas y Puerto Rico, según el análisis realizado por otros investigadores (6, 7, 49, 230).

En Cuba, los primeros casos se reportaron en La Habana, en el mes de julio del año 2003. Posteriormente, la enfermedad se diseminó hacia el resto de las provincias del país, con 171 910 casos informados hasta finales del mes de diciembre (13). Durante este periodo el país mantuvo amplias relaciones de intercambio de viajeros con países de la región de las Américas que reportaron brotes, fundamentalmente Brasil, Nicaragua, Venezuela y algunas islas del Caribe (13). En los años subsiguientes no se informaron grandes brotes en el país y en el Laboratorio Nacional de Referencia solo se recibieron muestras aisladas de 22 casos del año 2004 y 40 en el año 2005.

Periodo epidémico 2008-2009

En el análisis de la región 3C las secuencias cubanas compartieron un ancestro común con las secuencias de la India, documentadas de una epidemia ocurrida en el año 2007. También mostraron homología con esta rama, un grupo de secuencias brasileñas del año 2009 con otras secuencias de la India (2007) (Figura 7). Todas las secuencias cubanas se clasificaron dentro del GIV.

Los resultados de ancestralidad de esta etapa epidémica cubana fueron similares los descritos por Ayoub, Wu, Chansaenroj y sus colaboradores. Estos autores encontraron un ancestro común entre las secuencias cubanas y brasileñas (2008-2009), con las de la India (2007) en la región genómica 3C, y entre las secuencias brasileñas y las indias en la región genómica VP1 (10, 58, 63). Shukla y colaboradores encontraron la relación de ancestralidad de las secuencias indias con las secuencias cubanas y brasileñas (2008-2009), en la región genómica 3C, en la epidemia de conjuntivitis hemorrágica aguda del año 2010. Este conjunto de variantes genéticas, a su vez, mostró homología con secuencias que circularon en la India, China y Taiwán entre los años 2006 y 2008 (231). Tavares y colaboradores describieron una epidemia de conjuntivitis hemorrágica aguda causada por el CV-A24v en el noreste de Brasil

en el año 2009 y las secuencias se relacionaron directamente con los aislamientos asiáticos que circularon en Taiwán entre los años 2006-2007 (214).

Hasta octubre del año 2009 solo Cuba, Honduras y Venezuela habían notificado la enfermedad en el continente americano, sin la identificación del agente etiológico y el posible origen epidemiológico de los brotes (comunicación personal en el marco del proyecto Fortalecimiento de las capacidades de diagnóstico de las enfermedades infecciosas IPK-Instituto Rafael Rangel, 2008, OPS) (232).

En Cuba los primeros casos de conjuntivitis hemorrágica aguda aparecieron a finales del mes de septiembre del 2008, en la provincia de Pinar del Río. La epidemia se expandió por el territorio nacional y acumuló hasta el mes de diciembre 21 208 casos, cuando comenzó a descender el número de los mismos. En junio del 2009, un nuevo aumento de pacientes con conjuntivitis hemorrágica aguda comenzó a detectarse, esta vez en la provincia de Las Tunas. Hasta diciembre se extendió la epidemia, que abarcó de igual forma, todas las provincias del país con 50 930 casos informados.

Valoraciones generales de las inferencias filogenéticas de los periodos epidémicos cubanos estudiados

Los estudios de las inferencias filogenéticas de la presente investigación presentaron varias limitaciones: i) la metodología de secuenciación por Sanger que impide detectar todas las cuasiespecies circulantes, ii) el análisis parcial y no completo de las regiones genómicas; iii) la selección de las secuencias nucleotídicas más representativas de forma global, que es determinante en los resultados de los análisis filogenéticos; iv) las limitaciones intrínsecas de estos tipos de análisis y los programas que los realizan; y v) no contar con una información epidemiológica más amplia de los periodos epidémicos cubanos.

No obstante, se pudo concluir que todos los brotes cubanos de conjuntivitis hemorrágica aguda en los periodos estudiados, fueron causados por variantes genéticas del CV-A24v homólogas a las que circularon en la región de las Américas en cada uno de ellos. En algunos periodos epidémicos (1986-1987, 2003 y 2008-2009), se pudo evidenciar las relaciones de ancestralidad con secuencias de otros continentes (África y Asia), lo que avala el alto potencial epidémico de esta variante antigénica. Además, los análisis filogenéticos de las dos

regiones parciales del genoma 3C y VP1 del CV-A24v, resultaron informativas para la identificación y la clasificación de las variantes genéticas que circularon en cada periodo epidémico.

Por otro lado, estos análisis junto con los de identidad permitieron sugerir un nuevo origen temporal del GIV a partir de la segunda mitad de la década de los 90 y no a partir del año 2000 como describió Chu y colaboradores (6). De esta forma, se actualizó la epidemiología molecular de esta variante antigénica fundamentalmente en un periodo considerado “silente” y que a partir de estos análisis se percibe una circulación viral que alcanza dimensiones pandémicas tal cual los demás periodos descritos. En este sentido, otros autores obtuvieron resultados semejantes sin hacer distinción del hecho (9, 10, 22, 25, 28, 105).

IV.1.6 Periodicidad de las epidemias cubanas de Conjuntivitis Hemorrágica Aguda, 1986-2009

En Cuba, los periodos epidémicos de conjuntivitis hemorrágica aguda causados por el CV-A24v en el periodo de 1986 a 2009 ocurrieron cada cinco o seis años y en algunos casos durante dos años consecutivos. El aumento de los casos comenzó generalmente entre los meses de mayo y junio, con un pico hacia los meses de septiembre-octubre, disminuyendo para los meses de noviembre y diciembre (Tabla 8). Generalmente la diseminación de la epidemia ocurrió a partir de los casos aislados en población abierta o a punto de partida de brotes localizados en instituciones cerradas (13, 14).

Se conoce que el CV-A24v produce una respuesta inmune humoral débil o indetectable (93, 233, 234) y que el declive postepidémico de esta respuesta en individuos seropositivos se asocia con la recurrencia de las epidemias de conjuntivitis hemorrágica aguda (235, 236).

En concordancia con este hecho, los estudios cubanos serológicos realizados en los primeros periodos epidémicos mostraron que la inmunidad fue baja y de corta duración (14). Por ejemplo, Comellas y colaboradores encontraron un 37,9 % de seroconversión en 1986, y Ávalos y colaboradores un 40,4 % de seroconversión, con una media geométrica del título de anticuerpos neutralizantes en el primer suero de 1:2,7 y 1:45,6 en el segundo suero en la epidemia del año 1997 (35, 36).

Tabla 8. Frecuencia de las epidemias de conjuntivitis hemorrágica aguda causadas por el CV-A24v. Cuba 1986-2009.

Años Epidémicos	Tiempo entre periodos (Años)	Duración del brote (Meses)
1986		Verano (comenzó septiembre)
1987		ND
1992	6	octubre - diciembre
1993		junio - diciembre
1997	5	mayo - diciembre
2003	6	julio - diciembre
2008	5	septiembre - diciembre
2009		Junio - diciembre

ND: No disponible la información del comienzo de la epidemia en este año.

Por otro lado en diferentes países se describió que las epidemias de conjuntivitis hemorrágica aguda fueron causadas por la misma variante genotípica viral durante dos años consecutivos en varios periodos epidémicos. Por ejemplo, en Taiwán en las epidemias de los años 1985-1986, 2000-2002 y 2006-2007, en Brasil en los años 2003-2004 y en Pakistán en los años 2004-2005 se observaron porcentajes de identidad altos o completos, entre las secuencias de los aislamientos obtenidos en los dos años epidémicos contiguos (6, 56, 229). Al respecto, las cepas cubanas de años epidémicos consecutivos mostraron un comportamiento similar como se muestra en la tabla 9.

Tabla 9. Identidad nucleotídica en la región 3C y VP1 entre las secuencias cubanas en los periodos epidémicos de años consecutivos.

Periodos Epidémicos	Porcentaje de identidad entre las secuencias cubanas (%)	
	3C	VP1
1986-1987	98,7-100	96,9-100
1992-1993	98,5-100	99,2-100
2003/2005	97,7-100	97,3-100
2008-2009	99,4-100	NR

NR: No realizado, no se secuenció la región VP1 de las cepas de este periodo epidémico

En las epidemias de conjuntivitis hemorrágica aguda, la mayor cantidad de los casos ocurre principalmente en el verano, donde las altas temperaturas y las lluvias favorecen la transmisión viral y disminuyen en los meses más fríos, pero no implica que el virus

desaparece (10, 27, 64, 237). Probablemente, el virus circula a bajos niveles durante esta época del año con la ocurrencia de casos esporádicos, los que pueden escaparse o ser insignificantes al sistema de vigilancia, una vez observada la disminución de los mismos.

El estado de portadores asintomáticos en el hombre, casos de conjuntivitis hemorrágica aguda atípica o cuadros clínicos atípicos, pueden ser algunas de las condiciones que perpetúan la circulación de esta variante antigénica (CV-A24v), sin que se demuestren evidencias clínicas de conjuntivitis hemorrágica aguda en los períodos ínter epidémicos (50, 96, 238). En la década de los años 70 se describieron altos títulos de anticuerpos neutralizantes en niños sin signos clínicos de enfermedad (96, 239). Posteriormente numerosas investigaciones encontraron al CV-A24v entre los serotipos NPEV aislados de la vigilancia de polio en los casos de PFA en la India, Camerún, Filipinas y Blangadesh (102, 104-106); donde incluso algunos autores relacionaron sus aislamientos con cepas causantes de epidemias conjuntivitis hemorrágica aguda (105, 106). Recientemente, B'Krong y colaboradores identificaron también al CV-A24v en infantes con síntomas respiratorios en Taiwán (240).

Esta variante antigénica también se identificó en muestras de aguas de ríos de áreas urbanas y rurales, colectadas de abril a diciembre del año 2009, en Filipinas (241), y en muestras de aguas residuales y afluentes secundarios, colectadas en Singapur de enero a junio del año 2007, que se relacionaron con los aislamientos obtenidos en una epidemia de conjuntivitis hemorrágica aguda en el mismo país, en el año 2005 (212, 242). Pudiera agregarse a estos resultados, el hecho de encontrar al CV-A24v en primates no humanos cautivos sanos en Blangadesh, en las mismas zonas geográficas que se reportaron casos de PFA. Las secuencias de los virus humanos y las de los primates, mostraron altos porcentajes de identidad nucleotídica (97.8-100 %) (106).

Todos estos argumentos bibliográficos demuestran que otros reservorios, tanto humanos como primates no humanos, pueden intervenir en el mantenimiento y transmisión del CV-A24v en los periodos inter epidémico, durante las epidemias o en años posteriores.

IV.2 Caracterización filodinámica y molecular del CV-A24v

IV.2.1 Caracterización filodinámica del CV-A24v en base a las regiones genómicas parciales 3C y VP1

Los análisis filodinámicos se utilizan ampliamente en las investigaciones para determinar el origen geográfico y temporal, la historia evolutiva y los factores de riesgos ecológicos asociados al crecimiento y la dispersión de diferentes virus como los virus influenza, el VIH, el Zika, el Dengue y de bacterias como *Staphylococcus aureus* resistentes a la Meticilina (30, 33, 146, 243-245). En el género Enterovirus se estudiaron varios serotipos a través de este enfoque como el EV-D71, EV-D68, CV-A4, CV-B2, CV-B1, CV-A16, Echovirus 14, poliovirus tipo 1 e incluso el CV-A24v (22, 30, 152, 246-248).

En las figuras 7 y 8 se muestran las topologías de los árboles filogenéticos obtenidos de las regiones 3C y VP1 que mostraron características similares a las descritas por varios autores, incluso para otros serotipos enterovirales: i) origen monofilético del serotipo en cuestión; ii) topología poco equilibrada (similar a una escalera), iii) ramas internas largas (las ramas comprendidas entre los nodos más cercanos a la raíz) y ramas terminales cortas y poco resueltas (22, 62, 152, 246, 249).

En ambas regiones genómicas se observó, que todas las cepas tuvieron un único origen o un ancestro común a partir de las primeras secuencias obtenidas en el año 1970, donde se consideró como prototipo a la cepa EH24_70_Singapur 1970. Por otro lado, la estructura poco equilibrada o no balanceada implica que ocurren cuellos de botella en la transmisión viral bajo la continua selección, dirigida por la inmunidad de rebaño, de forma que los linajes virales prevalentes existentes se reemplazan secuencialmente por nuevos grupos emergentes. Por último, la relación de la longitud de las ramas internas y externas, indica una población viral que permanece casi constante en tamaño y la pobre resolución significa que más de una topología del árbol se ajusta al conjunto de los datos (22, 31, 247, 250).

Yen y colaboradores al realizar la caracterización filodinámica del tropismo ocular del CV-A24v, encontraron una tendencia cronológica en el dendrograma de VP1, dada por la aparición de los brotes a medida que surgen nuevos grupos dominantes. Según estos investigadores, los brotes de CV-A24v resultaron de variantes que circularon durante 1-2 años antes de reemplazarse por linajes emergentes (22).

El análisis mediante Skyride Bayesiano para ambas regiones genómicas, mostró resultados similares (Figura 9) y concordó parcialmente con trabajos previos que describen las cuatro etapas de la epidemiología global del CV-A24v: década de los años 70, de los años 80, de los años 90 y después del año 2000 (6, 22).

Dichas etapas se identificaron en el diagrama que se muestra en la figura 9. Para la región 3C se evidenció un pico antes del año 1970 ($Net=9,52$), como avalan algunos estudios que describen la posible circulación del CV-A24v antes de las primeras epidemias (22, 88) y para VP1 entre los años 1972-1973 ($Net=7,04$). A continuación, se observó un segundo pico de la Net para la región 3C (6,70) y un aumento más tenue para la región VP1 (2,95-2,99), entre los años 1984-1988. En la década de los años 90, se observaron dos picos para la región 3C: inicios ($Net=6,53$) y finales ($Net=5,24$), y para la región VP1 un ascenso, con un ligero pico entre los años 1997-1999 ($Net=5,94-6,52$). Entre los años 2002-2003, se evidenció un aumento de la Net , 6,01 y 8,1, para la región 3C y VP1 respectivamente, y en VP1 otro pico ($Net=8,46$) entre los años 2007 y 2008.

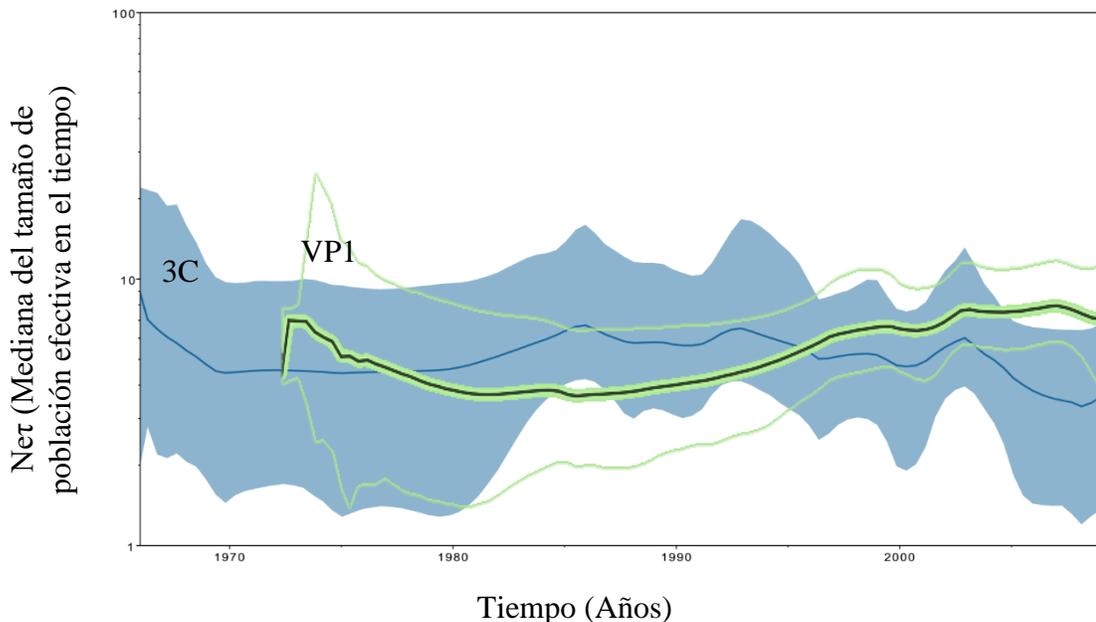


Figura 9. Gráfico del análisis Bayesiano Skyride para la región genómica 3C (en azul) y VP1 (en verde). El eje x representa la escala del tiempo (años) y el eje y es la escala logarítmica Net (donde Ne es la mediana tamaño de población efectiva y τ es el tiempo de generación). Las líneas sólidas delgadas indica los estimados de la mediana de la Ne (3C en azul y VP1 verde y negro) y el área sombreada indica el 95 % HPD (3C en azul y VP1 transparente limitada por líneas verdes).

A pesar de que se percibió un comportamiento similar en ambas regiones del genoma viral, las diferencias encontradas en los valores de la Net para 3C y VP1 se deben, posiblemente, al hecho de que evolucionan de forma independiente. La región estructural VP1 está sometida a una presión inmunológica, no así la región 3C no estructural. Por otro lado, la selección de las secuencias es uno de los factores determinantes en estos análisis y a pesar de que se trató de representar de igual forma cada periodo epidémico, en algunas etapas no fue posible, como el año 1975 y la década de los años 90, ya que no se encontraron suficientes secuencias en el banco de genes GenBank (6, 7, 22). No obstante, el análisis de las dos regiones genómicas evidenció que el virus mantiene una población efectiva estable en el tiempo, con fluctuaciones (aumentos) que se corresponden con los periodos epidémicos o pandémicos descritos en la epidemiología del CV-A24v.

Otro aspecto estudiado dentro de la filodinámica es la tasa de sustitución o tasa de evolución molecular, que no es más que la tasa a la cual los diferentes individuos acumulan diferencias genéticas entre ellos, dentro de una población en el tiempo, como resultado de un régimen selectivo que actúa sobre esa población (132). La tasa de sustitución puede variar en correspondencia con el número de secuencias, el área geográfica y el tiempo de ocurrencia de las epidemias respectivas (6). Por consiguiente, en los estudios del CV-A24v se han informado diferentes valores, por ejemplo, $1,0 \times 10^{-3}$ nt/año, 3×10^{-3} nt/año, $4,1 \times 10^{-3}$ nt/año, $6,67 \times 10^{-4}$ nt/año para la región 3C (6, 51, 212, 251) y $1,83 \times 10^{-3}$ nt/año y $2,17 \times 10^{-3}$ nt/año, $7,40 \times 10^{-3}$ sustituciones/sitio/año para la región VP1 (6, 22).

En correspondencia con esta información, se obtuvo una tasa de sustitución de $4,39 \times 10^{-3}$ sustituciones/sitio/año ($3,48 \times 10^{-3}$ - $5,36 \times 10^{-3}$, 95 % HPD) para la región 3C y $5,80 \times 10^{-3}$ sustituciones/sitio/año ($4,37 \times 10^{-3}$ - $7,32 \times 10^{-3}$, 95 % HPD) para la región VP1.

En otras investigaciones se describió que la tasa de sustitución nucleotídica del CV-A24v es ligeramente más baja que lo informado para el resto de los enterovirus y oscila entre 4,2 y $8,66 \times 10^{-3}$ para la región completa de VP1 y 4,8 y 12×10^{-3} para la región parcial de VP1 (249, 252, 253). De forma general, la tasa evolutiva para los virus ARN oscila entre los órdenes de 10^{-3} - 10^{-5} , y específicamente para los EV, es alrededor de 10^{-3} (254, 255).

En la tabla 10 se muestran los tiempos del ancestro común más cercano (TMRCA) estimado (95 % HPD) para los cuatro genotipos del CV-A24v descritos por Chu, en las dos regiones

analizadas (6). Para las dos regiones genómicas analizadas se obtuvieron valores de tiempos cercanos para cada genotipo, excepto para el GII (VP1), porque como se mencionó no existen secuencias en el banco de genes GenBank.

Tabla 10. TMRCA estimado para los cuatro genotipos del CV-A24v para las regiones genómicas 3C y VP1 definidos por Chu y colaboradores (6).

Genotipos	TMRCA estimado (95 % HPD)	
	3C	VP1
GI	1964,8 (1959,5- 1965,9)	1968,1 (1967,5-1970)
GII	1972 (1968,8-1973,3)	ND
GIII	1981,6 (1978-1981,7)	1980 (1976,4–1981,7)
GIV	1995 (1993-1995,9)	1996 (1995,1-1997,8)

ND: No disponible las secuencias de la región VP1.

Nidaira y colaboradores determinaron, para el GI el año 1966 (1962-1970), y para el GIV el año 1996 (1994-1997) en la región VP1 y para GI el año 1964 (1958-1970) y para el GIV el año 1995 (1993-1997) en la región 3C (25). Yen y colaboradores en base a la región genómica VP1 encontraron un TMRCA (95 % HPD) para el GI, GIII y GIV los años 1969 (1966-1970), 1984,8 (1984,5-1985,0) y 1999,5 (1998,0-2000,0) respectivamente (22). Por otra parte se observó que los resultados del TMRCA para el GIV apoyan los hallazgos de los análisis de identidad y filogenéticos referentes al origen de este genotipo a partir de la última oleada epidémica de la década de los años 90.

En la tabla 11 se muestra el TMRCA para las regiones 3C y VP1 en cada periodo epidémico cubano estudiado. En concordancia con otros estudios (24, 25, 88), los resultados indican que para cada periodo epidémico el CV-A24v pudo estar circulando de uno a dos años previos, a que ocurrieran los picos epidémicos. Estos resultados apoyan las observaciones epidemiológicas y del laboratorio donde en algunos de estos periodos epidémicos cubanos previos a los años epidémicos se reportaron y diagnosticaron casos con conjuntivitis hemorrágica aguda y pueden tenerse en cuenta para futuros eventos epidémicos de esta variante antigénica, lo cual tributaría en una alerta oportuna al sistema nacional de salud.

Tabla 11. TMRCA estimado para los periodos epidémicos cubanos de conjuntivitis hemorrágica aguda causados por el CV-A24v, para las regiones genómicas 3C y VP1.

Periodos epidémicos	TMRCA estimado (95 % HPD)	
	3C	VP1
1986-1987	1985,3 (1984,2-1985,6)	1984 (1983,8-1985,6)
1992-1993	1990,6 (1990-1991,2)	1990,4 (1989-1990,9)
1997	1995,7 (1995,3-1996,4)	1996 (1994-1996,2)
2003/2005*	2002 (2001,1-2002,4) 2001,9 (2001,5-2002,6)	2002,3 (2001,2-2002,5) 2002,8 (2001-2002,4)
2008-2009	2007,9 (2007,4-2008)	NR

*En este periodo se representa el TMRCA para los dos grupos en que se dividieron las secuencias cubanas en la inferencia filogenética.

NR: No realizado, no se secuenció la región VP1 de las cepas de este periodo epidémico

Es de notar que todas las estimaciones del TMRCA indican que el CV-A24v tiene un alto potencial epidémico. Los brotes epidémicos causados por el linaje emergente ocurren poco después de que el mismo aparece y se limitan, posteriormente, debido al aumento de la inmunidad colectiva.

Los métodos filodinámicos incluyen, además, la filogeografía que no es más que la inferencia de las tasas de los movimientos de los linajes virales entre zonas geográficas y la reconstrucción de la localización geográfica del linaje ancestral (32).

Se realizó un análisis filogeográfico discreto para las regiones 3C y VP1 del genoma viral (Anexos 3 y 4). Las rutas de transmisión con los factores de Bayes (BF) positivos ($BF > 3$) se muestran en la tabla 12. La visualización en el mapa del mundo se grafica en el anexo 5 para la región genómica 3C (A) y para la región genómica VP1 (B).

Para el análisis de cada región del genoma viral se incluyeron un conjunto de secuencias de diferentes países. Doce países estuvieron representados en los análisis de ambas regiones y nueve países estuvieron representados para solo una región genómica (tres en la región 3C y seis en la región VP1). De lo anterior se infiere que para la región VP1 se analizaron un mayor número de posibles rutas de transmisión como se muestra en la tabla 12. Se identificaron 19 rutas de transmisión positivas para la región genómica 3C, 25 rutas para la región genómica VP1 y siete rutas comunes para ambas regiones.

Tabla 12. Rutas de conexiones epidemiológicas del CV-A24v durante el periodo 1986-2009 con BF>3,0 en base a las regiones del genoma viral 3C y VP1.

Región 3C			Región VP1		
Rutas de transmisión			Rutas de transmisión		
Desde	Hasta	BF	Desde	Hasta	BF
Brasil	China	11,1	Australia	Singapur	5,5
Brasil	Jamaica	11,4	Australia	Taiwán	5,9
Brasil	Japón	8,7	Bangladesh	India	17,6
China	Estados Unidos	43,9	Bangladesh	Taiwán	9,8
China	Guadalupe	28,3	Brasil	China	23,0
China	Guyana Francesa	7,9	Brasil	Jamaica	4,8
China	India	32,9	Brasil	Pakistán	16,4
China	Jamaica	23,6	Brasil	Corea del Sur	3,8
China	Marruecos	4,9	Brasil	España	7,8
China	Tailandia	3,5	Brasil	Taiwán	11,9
Corea del Sur	Estados Unidos	3,4	China	Guadalupe	38,6
Corea del Sur	Taiwán	3,0	China	Guyana Francesa	49,2
Cuba	Taiwán	161,7	China	Jamaica	8,8
Estados Unidos	República Popular del Congo	3,6	China	Corea del Sur	3,0
Jamaica	Estados Unidos	6,6	China	Taiwán	14,5
República Dominicana	Singapur	29,4	Corea del Sur	Taiwán	3,2
Tailandia	Estados Unidos	5,62	Cuba	Taiwán	19,4
Taiwán	Estados Unidos	432	Francia	Filipinas	7,2
Taiwán	República Popular del Congo	23,7	Filipinas	Taiwán	39,7
			Gabón	Pakistán	3,3
			India	Taiwán	13,7
			Pakistán	España	9,7
			República Dominicana	Filipinas	4,7
			República Dominicana	Taiwán	3,1
			Singapur	Taiwán	44,1

Resaltadas con el mismo color las rutas de transmisión comunes en ambas regiones genómicas

En las dos regiones genómicas 3C y VP1, predominaron las rutas de transmisión con origen en el continente Asiático (12 rutas en 3C y 11 en VP1). Con origen en el continente asiático y destino las Américas se obtuvieron seis rutas para la región 3C. Con origen y destino en el continente asiático se lograron ocho rutas para la región VP1. Como una importante fuente

de propagación de las variantes genéticas se destacó China en Asia y Brasil en el continente americano (Tabla 12).

A pesar de que Cuba no se identificó como destino en ninguno de los trayectos de transmisión, los resultados sugieren algunas vías de introducción al país del CV-A24v teniendo en cuenta las relaciones de ancestralidad que mostraron los análisis filogenéticos:

- i) Periodo epidémico de los años 1986-1987: se identificó una ruta de transmisión desde China hasta Jamaica para las dos regiones genómicas, país este último, con el cual las secuencias cubanas mostraron homología. De lo anterior pudiera inferirse, que el virus se introdujo en el Caribe desde China, específicamente en Jamaica, a partir de donde, posiblemente, se propagó a Cuba.
- ii) Periodo epidémico del año 1997: se identificaron cuatro rutas desde China, Corea del Sur, Tailandia y Taiwán hasta los Estados Unidos como destino para la región genómica 3C. Esta secuencia estadounidense y las cubanas que circularon en el año 1997 compartieron un ancestro común. El CV-A24v pudo propagarse al Caribe desde los EUA.
- iii) Periodo epidémico del año 2003: se obtuvieron dos trayectos desde China hacia el Caribe: Guyana Francesa y Guadalupe para ambas regiones genómicas virales. Las secuencias cubanas mostraron relaciones de ancestralidad con las secuencias de ambos países caribeños, lo que permite sugerir que el virus se introdujo al país a partir de la diseminación de las variantes asiáticas en las islas caribeñas.
- iv) Periodo epidémico de los años 2008-2009: se identificó una ruta desde China a la India, en la región 3C del genoma. Las secuencias cubanas de esta etapa mostraron homología con las secuencias de la India, lo que induce a pensar que el origen de este periodo epidémico fue a partir de la propagación de las variantes chinas.

Para apoyar estos supuestos se obtuvieron posibles redes de transmisión entre los países con $BF > 3$ mostrados en la tabla 12 (Anexo 6). Como se muestra en las redes obtenidas para las dos regiones del genoma viral, existen redes dominantes entre diferentes países, que a su vez se entrelazan, mediante países comunes entre sí, lo que refuerza el hecho de la amplia capacidad de propagación de este agente viral y las posibilidades reales de su introducción a Cuba a través de dichas redes de transmisión.

Como se refirió anteriormente, los análisis epidemiológicos del primer periodo epidémico cubano del CV-A24v asociaron la introducción del virus con el arribo los estudiantes ghaneses a la Isla de la Juventud en septiembre del año 1986 (14, 36, 187). Los resultados del análisis filogeográfico, no confirmaron esta ruta de transmisión. Como se muestra en la tabla 12 no se obtuvo ninguna ruta de transmisión hacia desde Asia hasta Ghana. No obstante, otros autores reportaron filogenias que muestran las relaciones de ancestralidad de las secuencias Ghaneses con las latinoamericanas y describen la propagación de las variantes asiáticas a todos los continentes a partir del año 1985, con alrededor de dos años de antelación según los resultados del TMRCA (10, 24, 88, 214, 224, 231). Probablemente en Cuba, algunos casos escaparon al sistema de vigilancia nacional y solo fueron significativos los casos relacionados con los estudiantes foráneos en la Isla de la Juventud y la sucesiva propagación de la enfermedad. Hasta el momento en que se redactó la presente, no se encontraron otros datos epidemiológicos que fundamenten que la diseminación de la enfermedad en Cuba se originó solamente de los estudiantes africanos. Otra posible introducción pudo ser desde el Caribe. Si además de los resultados filogeográficos se tienen en cuenta los resultados del TMRCA de las secuencias cubanas de este periodo, existe la posibilidad de que el virus estuviese circulando en el país desde los años 1984-1985, antes de que arribaran los estudiantes africanos. Por otro lado, los investigadores del Centro para el Control de las Enfermedades de Atlanta, EUA, del inglés CDC, describieron la ocurrencia de importantes brotes de conjuntivitis hemorrágica aguda causados por el CV-A24v en Jamaica, Trinidad y las Islas Vírgenes a partir del mes de octubre del año 1986, sin asociar el posible origen epidemiológico de los mismos con el continente africano.

En concordancia con los resultados filogeográficos obtenidos en este trabajo, Dussart y colaboradores refirieron la posibilidad de la introducción del CV-A24v en Guyana Francesa a través del intercambio de la vasta comunidad de asiáticos, originaria de China y Laos, asentada en esta isla y la diseminación viral posterior en el Caribe, por el intercambio frecuente de esta nación con Las Antillas Francesas (7).

Yen y colaboradores estudiaron la filogeografía del CV-A24v por un periodo de tiempo similar al de este estudio. Analizaron un conjunto de 111 secuencias de la región completa de VP1, de 14 países y obtuvieron dos rutas de transmisión: de la India a China (BF: 8,92),

y de China a Taiwán (BF: 4,2). Esta última ruta se obtuvo de forma similar en nuestros resultados (22).

La literatura científica describe como positivo el factor de Bayes mayor que tres ($BF > 3$) pero algunas rutas negativas encontradas en este trabajo presentaron valores cercanos a este. Se encontraron, por ejemplo, de China a Japón: 2,89, de República Dominicana a Ghana: 2,19, de Ghana a Tailandia: 2,44, y de Ghana a los Estados Unidos: 2,45 para la región 3C. Para la región VP1, de Brasil a Cuba: 2,13, de Brasil a Gabón: 2,80, de Brasil a Filipinas: 2,44, de China a República Dominicana: 2,99, y de China a Filipinas: 2,59. Posiblemente con el desarrollo de nuevos análisis algunos de estos valores pudieran mejorar y confirmarse algunas otras rutas de transmisión.

Algunos autores comparan el comportamiento epidemiológico del CV-A24v con el de los virus de la influenza (20, 47). Para estos virus se plantea, que el hemisferio oriental, constituye una fuente de origen de variantes genéticas que posteriormente se diseminan al resto del mundo, hasta que la inmunidad colectiva limita la circulación (131).

En este sentido y extrapolando este conocimiento a la epidemiología al CV-A24v, se conoce que los genotipos GI y GII, emergieron y circularon solamente en el sudeste asiático y la India durante los años 1970-1971 y 1975-1976, respectivamente. Posteriormente, numerosos estudios describieron el origen del GIII a partir de las cepas que circularon en Taiwán y Japón entre los años 1985-1986 (6, 9, 63, 88). Como elemento adicional, los resultados de este estudio filogeográfico mostraron 19 rutas de conexiones epidemiológicas (12 en la región 3C y siete en la región VP1) cuyo origen son países Asiáticos: China, Corea del Sur, Taiwán, Tailandia, Singapur, Bangladesh y La India (Tabla 12). Todos estos hallazgos avalan la teoría de que también para el CV-24v el hemisferio oriental, constituye una fuente de origen de variantes genéticas que luego se diseminan al resto del mundo.

En el caso en particular del CV-A24v, cabría preguntarse también la posibilidad de que a partir de la primera oleada pandémica, las variantes genéticas en su recorrido por el mundo evolucionan de forma tal que cuando retornan al sudeste asiático, constituyen nuevas variantes que, en medio de poblaciones susceptibles, encuentran todas las condiciones para originar otra oleada pandémica. Los hallazgos que ratifican esta hipótesis se muestran en las filogenias obtenidas en esta investigación y que coinciden con los encontrados por otros

autores (6, 7, 22, 256). Se observa un reemplazo cronológico alternativo de secuencias latinoamericanas y europeas, con secuencias asiáticas. Además se obtuvieron nueve rutas de diseminación viral con origen en Latinoamérica y destino en el continente asiático (cuatro en la región 3C y cinco en la región VP1).

Si bien ambas hipótesis de rutas de transmisión desde Asia y hacia Asia se soportan con los resultados del presente trabajo y con la bibliografía consultada, es evidente que serán necesarias nuevas investigaciones para continuar soportándolos o refutarlos, teniendo en cuenta las limitantes encontradas: el número de secuencias de diferentes países y periodos epidémicos para ambas regiones, el análisis de regiones virales completas estructurales o no, o de los genomas virales completos, así como, añadir datos sobre los diferentes tipos de tráfico (aéreo, marítimo, terrestre), movimiento de emigrantes, entre otros.

No obstante, los hallazgos encontrados consolidan el potencial epidémico y pandémico de las variantes genéticas del CV-A24v a lo largo de su historia evolutiva, que incide, directamente, en el control de su transmisión y en el desarrollo de estrategias preventivas para los sistemas de vigilancia en las fronteras a nivel mundial. También aportan conocimientos sobre la utilidad de las regiones del genoma 3C y VP1 de esta variante antigénica del CV-A24v para la realización de análisis de epidemiología molecular y centran las bases para futuros estudios. Por último, y no menos importante, consolidan las evidencias científicas de la circulación en Cuba de variantes del CV-A24v asociadas a la reemergencia de variantes genéticas a nivel mundial.

IV.2.2 Cambios aminoacídicos en las regiones genómicas parciales 3C y VP1 de las secuencias cubanas respecto a la cepa prototipo EH24_70_Singapur 1970

Los cambios aminoacídicos de las secuencias cubanas respecto a la cepa prototipo EH24_70_Singapur 1970 en ambas regiones genómicas se muestran en las tablas 13 y 14. La mayor parte de las mutaciones observadas a nivel de aminoácidos, tanto en la región genómica 3C como en VP1, corresponden a mutaciones no sinónimas en el ARN que requieren una sola sustitución.

En la región 3C, algunos cambios aminoacídicos de las secuencias cubanas coincidieron con los informados por otros autores en varios periodos epidémicos (Tabla 13). Las posibles

implicaciones que la mayoría de estos cambios pudiesen tener sobre las propiedades estructurales o funcionales del CV-A24v aún no se han dilucidado (6, 24, 25, 63). Se encontró el cambio V8I en algunas secuencias de Ghana y Brasil del año 1987 y el cambio I15V en las secuencias de diversos países, a partir de la oleada expansiva de 1986, aunque no se determinó en las secuencias cubanas del periodo epidémico de los años 1992-1993. El cambio T68I también se describió en las secuencias de las cepas de las epidemias ocurridas entre los años 1988 y 2005 en Taiwán, Japón, China, Brasil, Guadalupe, y Singapur (6, 24, 25, 63). Otros tres cambios aminoacídicos determinados en las secuencias cubanas, se encontraron previamente: el cambio N139H presente en todas las secuencias informadas a partir del año 1975, y se plantea que está asociado a cambios en la estructura de la proteína (25) y los cambios V114I y M160I presentes en todas las variantes genéticas que comenzaron a circular a partir del periodo 2002-2003 (6, 24, 58, 63).

Tabla 13. Posiciones de la región 3C con cambios aminoacídicos en las secuencias cubanas con respecto a la cepa prototipo EH24_70_Singapur 1970.

EH24_70/ Periodos epidémicos cubanos	Posiciones de la región 3C (169 aa) / Cambios aa																	
	8	15	21	34	50	52	58	68	78	92	98	114	118	120	139	151	158	160
EH24_70	V	I	S	V	D	K	D	T	K	T	N	V	A	T	N	I	I	M
1986-1987	I	V								A					H*			
1992-1993					G/N		G	I/M		A*			T		H*			
1997		V*						I*			S*			V/A	H*	V*		L
2003/2005		V*				R			R			I			H*	V*	V	I
2008/2009		V*	G	I								I*			H*	V*		I*

*Cambio en todas las secuencias cubanas

Los cambios aminoacídicos de las secuencias cubanas visualizados en la estructura respecto al sitio catalítico como del sitio de unión al oriL de la proteasa 3C (tomando como molde la proteasa del CV-A16) se muestran en la figura 10. Es de notar, según la representación estructural, que algunos cambios aminoacídicos encontrados en las secuencias cubanas pudieran estar relacionados con el funcionamiento de ambos sitios de la proteasa, lo que pudiera favorecer o no las características funcionales de la misma en las variantes genéticas del CV-A24v que circularon en las diferentes etapas epidémicas.

que la sustitución F250Y mejora la unión del virus al receptor de ácido siálico lo que puede influir en la patogenicidad y la naturaleza pandémica del CV-A24v (261).

Tabla 14. Posiciones de la región VP1 con cambios aminoacídicos en las secuencias cubanas con respecto a la cepa prototipo EH24_70_Singapur 1970.

EH24_70/ Periodos epidémicos cubanos	Posiciones de la región VP1 (78 aa)/ Cambios aa									
	82	89	99	100	103	104	120	131	133	146
EH24_70	G	M	T	E	K	K	L	R	D	T
1986-1987		I*								A*
1992-1993		I*				R		T		A/N
1997	A	I*	A				V		G	A*
2003/2005		I*		D*	R*			S		A*

*Cambio en todas las secuencias cubanas

La mayoría de los cambios aminoacídicos encontrados en las secuencias cubanas se ubicaron en la región llamada cañón o bolsillo de la proteína VP1 (Figura 12). En esta región se produce la unión al receptor celular y se encuentran la mayoría de los sitios antigénicos (65, 70, 262). Posiblemente, los cambios aminoacídicos en las variantes virales cubanas se produjeron como cambios evolutivos para evadir la respuesta inmunológica existente contra la variante genética que le precedió.

Algunos estudios plantean la poca variación aminoacídica en esta región estructural en el CV-A24v, y pocos son los autores que investigan la evolución de esta región que permitan explicar el comportamiento epidemiológico reemergente de esta variante genética (29). De y colaboradores en sus análisis del brote de conjuntivitis hemorrágica aguda en Guangdong, China, 2010, encontraron un cambio aminoacídico en VP1, dos en VP2 y otro en VP3, donde los cuatro consistieron fundamentalmente en cambios de hidrofobicidad de los aminoácidos involucrados (27).

Los aminoácidos hidrofílicos son generalmente expuestos a la superficie de las proteínas de la cápside y forman sitios de epítomos antigénicos. Por el contrario, los hidrofóbicos residen dentro de las proteínas de la cápside. Estos autores propusieron que la sustitución de estos aminoácidos, pudo tener un efecto sobre la estructura secundaria de la proteína de la cápside

y los epítopes antigénicos, lo que resultó en una mutante de escape capaz de promover un brote conjuntivitis hemorrágica aguda en un lapso de tiempo relativamente corto (27).

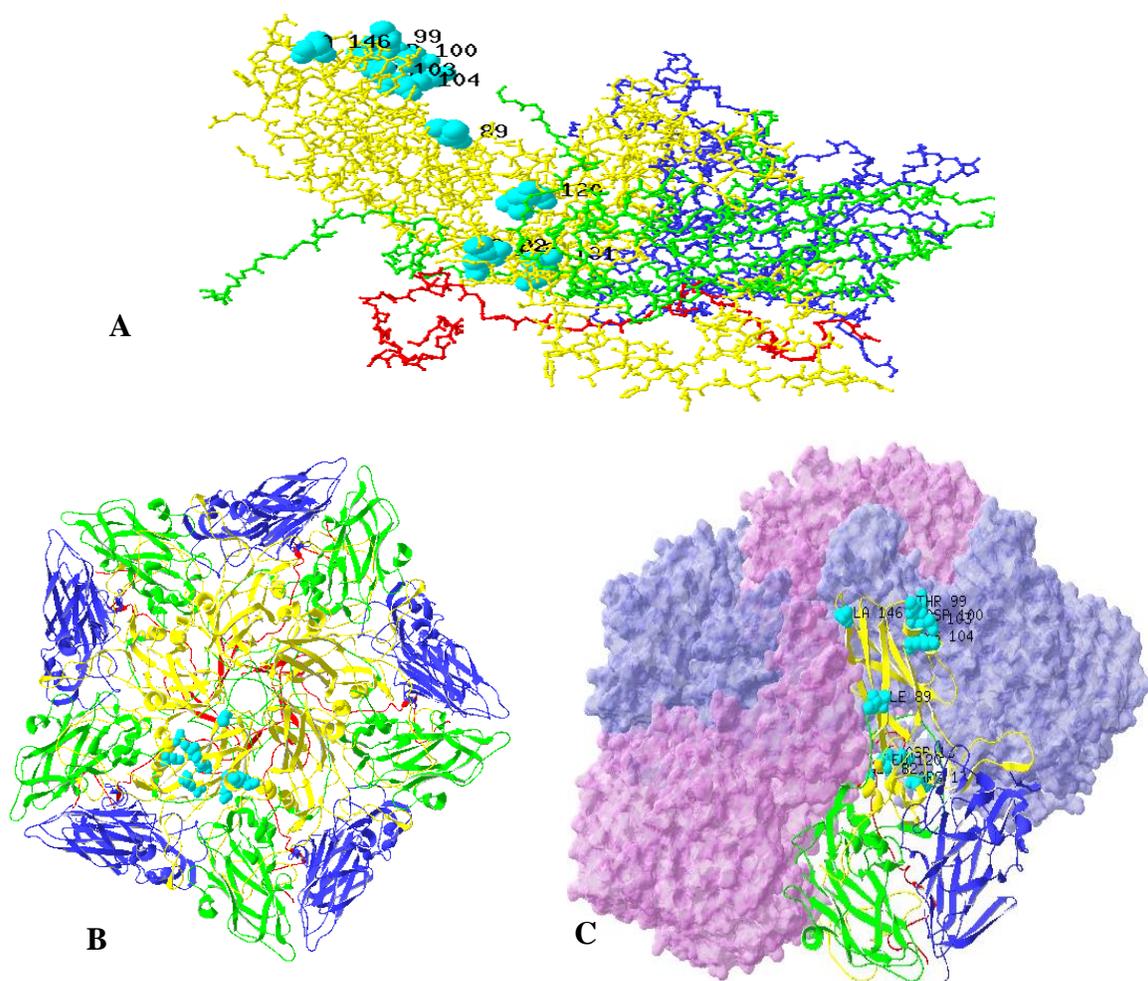


Figura 12. Cambios aminoacídicos en la región genómica VP1 de las secuencias cubanas (círculos azules aqua) representados en A: vista lateral de un protómero, VP1 (amarillo), VP2 (azul), VP3 (verde), VP4 (rojo); B: vista superior del pentámero con las estructuras terciarias de las proteínas estructurales; C: vista superior del pentámero con la estructura corrugada del virus y un protómero en su estructura terciaria.

En las investigaciones realizadas por Smura y colaboradores acerca de la evolución de la región VP1 en la especie C de los enterovirus, las cepas de CV-A24v mostraron una menor diversidad de aminoácidos en VP1 que las cepas de CV-A24. Estos autores encontraron polimorfismos de los aminoácidos en sitios diferentes en el CV-A24v al compararlo con las cepas de CV-A24 (29) y concluyeron, además, que el cambio genético intra-típico estaría dominado por mutaciones silenciosas acompañadas de polimorfismo de aminoácidos que

ocurren predominantemente en sitios inmunogénicos. Este cambio genético puede observarse como una alta tasa de mutaciones sinónimas, la selección negativa fuerte y el polimorfismo de aminoácidos o la selección positiva en sitios diferentes en regiones desordenadas estructuralmente (29). Las mutaciones sinónimas, a primera vista, se espera que sean neutrales, ya que no producen cambios aminoacídicos. Sin embargo, pueden alterar la estructura secundaria del ARN e influir en la estabilidad del ARNt (132).

IV.3 Análisis molecular las cepas del CV-A24v cubanas obtenidas a partir de heces

Desde las primeras epidemias de conjuntivitis hemorrágicas agudas causadas por el CV-A24v o el EV-D70 se demostró que ambos serotipos cursan la misma patogenia que el resto de los enterovirus que afectan a los humanos (38, 39, 47). Estas evidencias fueron poco consideradas en años posteriores, con excepción de la asociación del EV-D70 con cuadros neurológicos semejantes a los causados por los virus de la poliomielitis (38, 39, 263).

Dada la rápida y explosiva diseminación de la conjuntivitis hemorrágica aguda en las epidemias, se impuso la existencia de otras vías de transmisión además del contacto con las secreciones oculares de los enfermos y sus accesorios infectados. Varios investigadores determinaron, entonces, el uso por el CV-A24v del ácido siálico como receptor tanto en las mucosas oculares como en el tracto respiratorio superior, por lo que la vía de transmisión respiratoria no puede ser descartada (16, 20, 240, 264).

El CV-A24v se excreta también en las heces aunque esta vía de transmisión fecal no fue considerada importante en los periodos epidémicos. El uso de las heces para el diagnóstico de la conjuntivitis hemorrágica aguda se justifica por ser una muestra clínica menos invasiva para el paciente, y a la vez más inocua para el personal médico involucrado en su colecta, el cual no necesita entrenamiento específico para realizar la toma de la muestra, como en el caso de los exudados. También debido al largo periodo de excreción de los enterovirus en las heces permite disponer de una muestra clínica aun cuando el cuadro agudo de la enfermedad desapareció, y por otro lado la materia orgánica favorece la viabilidad y la conservación de las partículas virales (23, 35, 62).

En Cuba, Más y colaboradores plantearon que en el medio entérico el virus puede encontrar la oportunidad de mutar y que estos cambios acumulativos resultaran en nuevas variantes con

capacidad para promover nuevas epidemias. Esta hipótesis motivó la identificación del CV-A24v excretado en las heces en pacientes cubanos con conjuntivitis hemorrágica aguda en el año 1997 (35). En las epidemias posteriores de los años 2003 y 2008-2009, se trabajó en este sentido con un número mayor de pacientes y en este último periodo se obtuvo un mayor porcentaje de los aislamientos virales a partir de las muestras de heces en comparación con las de los exudados conjuntivales. Por todos estos hallazgos y los precedentes bibliográficos, las heces como muestra clínica tal cual los exudados conjuntivales, se incluyeron en el algoritmo de diagnóstico cubano de la conjuntivitis hemorrágica aguda a partir de ese último periodo epidémico.

En el presente trabajo buscamos evidencias, desde una perspectiva molecular, que permitieran completar los estudios clásicos desarrollados previamente en nuestro laboratorio en relación con el uso de las heces para el diagnóstico y la epidemiología molecular del CV-A24v. Hecho que a pesar de que se demostró desde las primeras epidemias, no se consideró como tal en la comunidad científica internacional que emplea los exudados como la muestra clínica distintiva.

Se secuenciaron 34 aislamientos cubanos obtenidos a partir de las heces de los periodos epidémicos de los años 1997, 2003 y 2008-2009, y de ellas, 11 se incluyeron en los análisis filogenéticos de la región 3C y tres en la región VP1 (figuras 14 y 15). Es válido aclarar que estas secuencias se seleccionaron a ciegas en correspondencia con el algoritmo desarrollado, donde se eliminaron las secuencias idénticas repetidas sin tener en cuenta el tipo de la muestra clínica de donde se obtuvo la cepa.

De la epidemia del año 1997 se secuenciaron 16 aislamientos obtenidos a partir de heces. Siete de ellos se obtuvieron de siete pacientes diferentes, siendo las heces la única muestra clínica de los mismos. De igual forma, otros siete aislamientos se obtuvieron de heces seriadas de un mismo paciente, y los dos aislamientos restantes fueron muestras seriadas obtenidas de un paciente, del cual se obtuvo, además, sus exudados conjuntival, nasal y faríngeo. Las secuencias a partir de los aislamientos de heces mostraron 99,0-100 % y 99,1-100 % de identidad nucleotídica con las secuencias obtenidas de los aislamientos de exudados para las regiones genómicas 3C y VP1 respectivamente, dentro del mismo periodo epidémico. Las siete heces seriadas mostraron 99,3-100 % y 99,8-100 % de identidad

nucleotídica entre ellas para la región genómica 3C y VP1 respectivamente. En el paciente con dos aislamientos de heces seriadas, las secuencias de los mismos fueron idénticas (100 %) respecto a las secuencias de los aislamientos a partir de los exudados de dicho paciente en ambas regiones genómicas.

En la epidemia del año 2003, de cuatro pacientes se obtuvieron muestras de heces y exudado conjuntival y en 12 se obtuvieron solo muestras de heces. Las secuencias de los aislamientos a partir de las muestras clínicas de heces y exudado de un mismo paciente fueron idénticas (100 % identidad nucleotídica) para ambas regiones del genoma. Las secuencias obtenidas de los aislamientos de heces mostraron un 97,7-100 % y 97,3-100 % de identidad nucleotídica respecto a las secuencias de los aislamientos obtenidos de los exudados conjuntivales analizados en la epidemia, para la región genómica 3C y VP1 respectivamente.

En periodo epidémico de los años 2008-2009 se incluyeron dos secuencias de muestras de heces que se obtuvieron como muestra única de dos pacientes, uno de cada año. Las secuencias correspondientes a estos dos casos mostraron un 99,4-100 % de identidad nucleotídica respecto a las secuencias obtenidas de muestras de exudados conjuntivales en la región 3C de este periodo epidémico.

De estos hallazgos se infiere, que en un mismo paciente el CV-A24v que se replica en la conjuntiva puede ser idéntico respecto al que se replica en el intestino, y dentro del mismo periodo epidémico tanto los exudados como las heces de los pacientes con conjuntivitis hemorrágica aguda permiten aislar y caracterizar a nivel molecular la variante circulante del CV-A24v.

Por otra parte, en los análisis filogenéticos de las dos regiones del genoma 3C (11 secuencias cubanas) y VP1 (tres secuencias cubanas) no se observaron diferencias en las relaciones de ancestralidad asociadas, específicamente, al tipo de muestra clínica de la cual se obtuvo la cepa viral secuenciada (Figuras 13 y 14, respectivamente).

En las investigaciones de Sadeuh-Mba, Apostol, Laxmivandana y Oberste y colaboradores, se describió el uso de las heces como la muestra a partir de la cual identificaron al CV-A24v, en casos con PFA, dentro del programa de vigilancia de la Poliomiелitis. Estos autores, a pesar de que no describen el desarrollo previo de conjuntivitis hemorrágica aguda en los

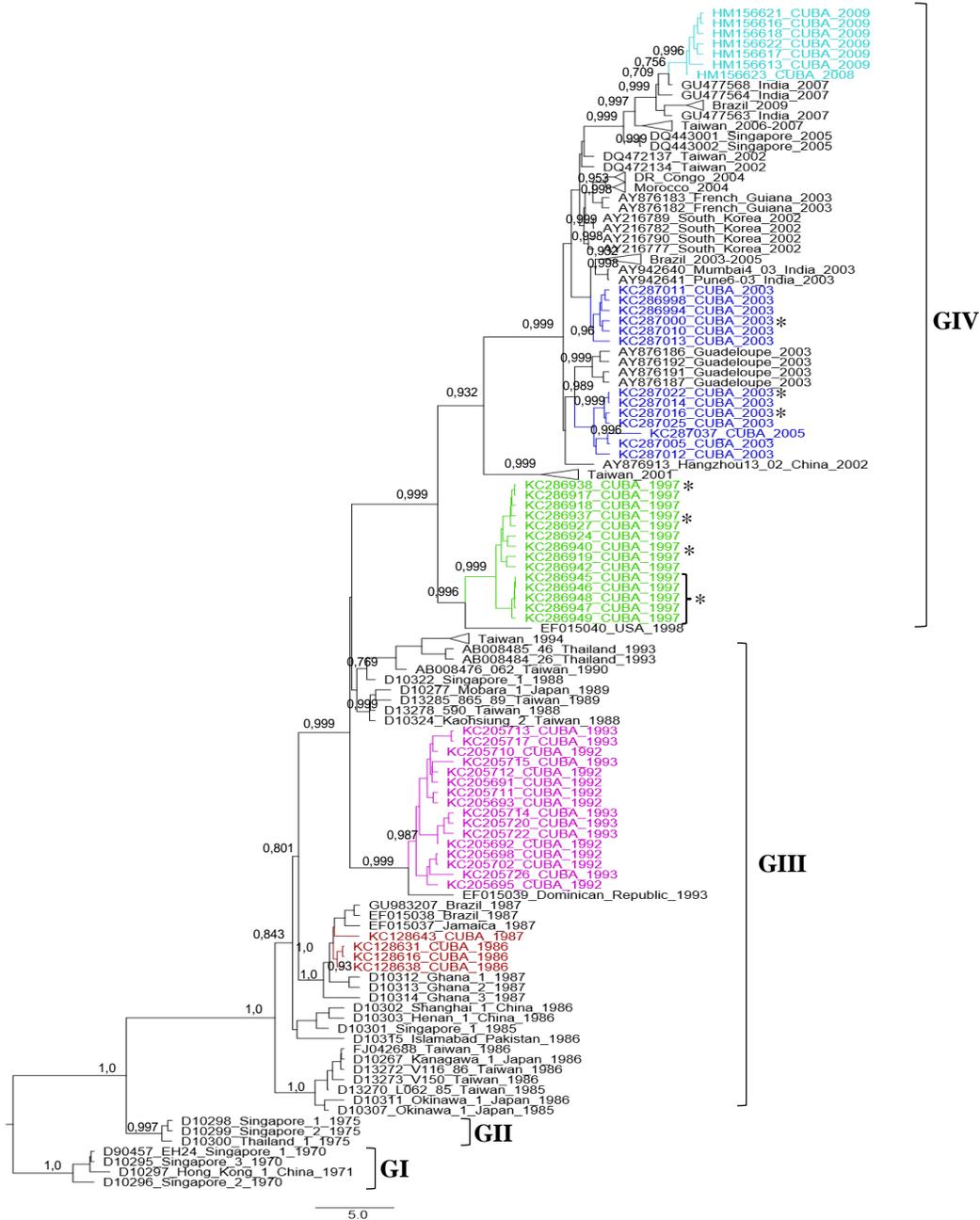


Figura 13. Relaciones filogenéticas del CV-A24v en la región 3C (507 pb). Los valores numéricos en los nodos indican la probabilidad posterior de la inferencia Bayesiana mayores que 0,70 (70 %). Resaltadas en colores las secuencias de las epidemias cubanas de conjuntivitis hemorrágica aguda. Marcadas con asteriscos (*) las secuencias obtenidas de heces, el resto de las secuencias se obtuvieron de casos de conjuntivitis hemorrágica aguda. A la derecha se indican los genotipos para la región 3C (GI-GIV) según este estudio. Resaltados en colores los periodos epidémicos cubanos estudiados.

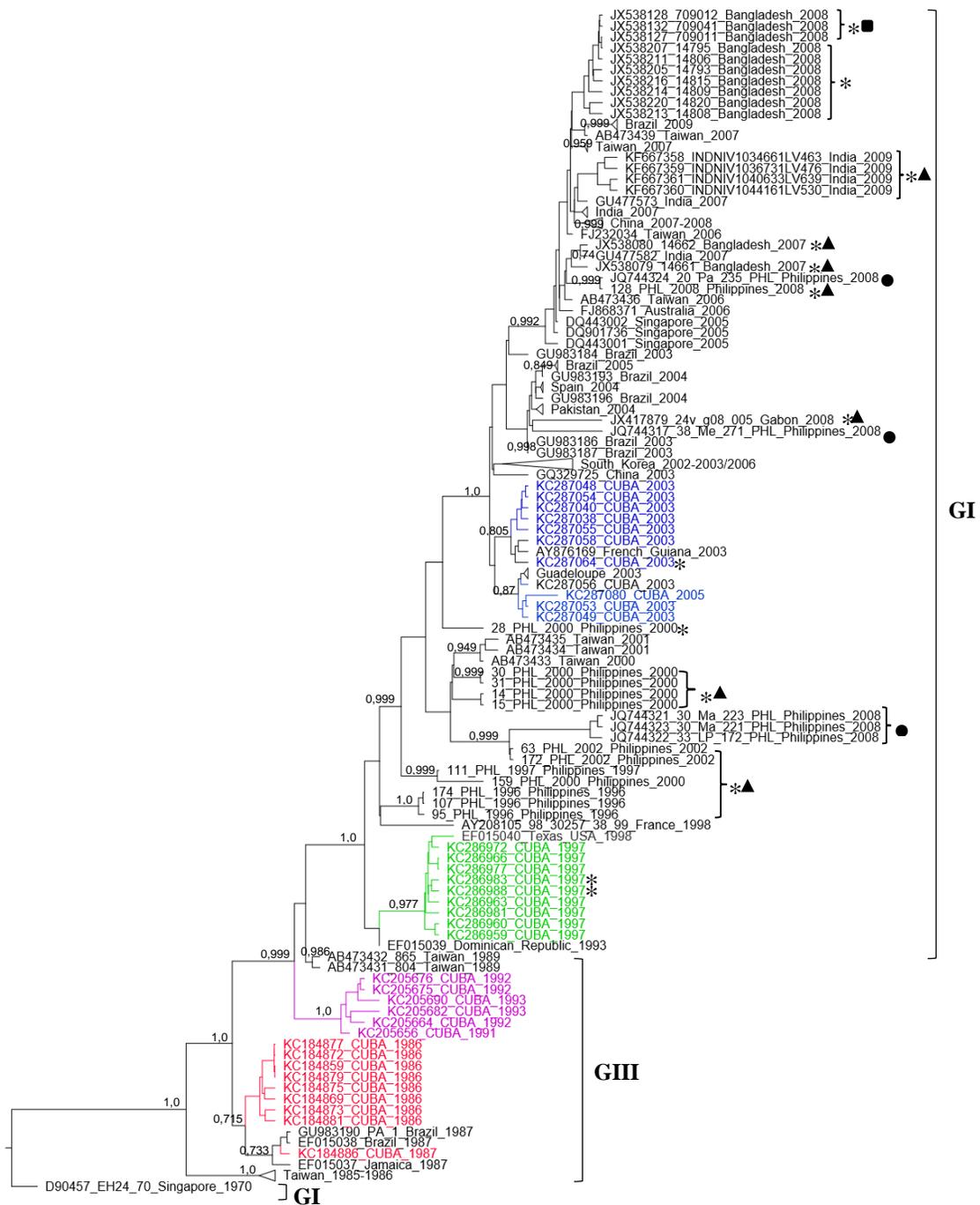


Figura 14. Relaciones filogenéticas del CV-A24v en la región VP1 (234 pb). Los valores numéricos en los nodos indican la probabilidad posterior de la inferencia Bayesiana mayores que 0,70 (70 %). Resaltadas en colores las secuencias de las epidemias cubanas de conjuntivitis hemorrágica aguda. Marcadas con: asteriscos (*) las secuencias obtenidas de heces, triángulos negros (▲) secuencias de casos de PFA, cuadrados negros (■) secuencias obtenidas de simios, (●) círculos negros secuencias obtenidas de ríos filipinos, el resto de las secuencias se obtuvieron de casos de conjuntivitis hemorrágica aguda. A la derecha se indican los genotipos para la región VP1 (GI, GIII, GIV) según este estudio. Resaltados en colores los periodos epidémicos cubanos estudiados.

pacientes, demostraron no solo la diversidad del tropismo celular del CV-A24v, sino además, el curso de su patogenia característico de los enterovirus. En los análisis filogenéticos determinaron la relación de estos aislamientos con cepas causantes de conjuntivitis hemorrágica aguda (102, 104-106).

Se conoce que los enterovirus pueden persistir por meses en un medio ambiente con condiciones favorables, dentro de las que se incluyen: pH neutral, humedad, bajas temperaturas y especialmente presencia de materia orgánica que los protegen contra la inactivación, tanto en medios acuáticos como terrestres (104, 265, 266). Durante la infección humana, las partículas virales se excretan a través de las heces por un período de tiempo que puede durar hasta 16 semanas, en concentraciones tan altas como 10^6 partículas por gramo de heces (111, 267). Apostol y colaboradores determinaron en Filipinas el predominio de la especie C de los enterovirus, y dentro de la misma el CV-A24v, en aguas de ríos de áreas urbanas y rurales colectadas de abril a diciembre del año 2009 (241). Tiong y colaboradores identificaron al CV-A24v en muestras de aguas residuales y afluentes secundarios colectadas en Singapur, en el año 2007, que se relacionaron con los aislamientos obtenidos en una epidemia de conjuntivitis hemorrágica aguda en ese país en el año 2005 (212, 242).

Aparte de las tres secuencias cubanas obtenidas de los aislamientos de las heces, algunas secuencias de los estudios antes mencionados se incluyeron en el análisis de la región VP1 (Figura 14), por ejemplo, algunas secuencias del CV-A24v obtenidas de pacientes con PFA, de muestras ambientales y de los primates no humanos (106). De esta forma, se logró compensar la poca disponibilidad de secuencias del CV-A24v en la región VP1 de ciertas décadas y realizar un estudio filogenético más integral que representara los diversos cuadros clínicos y reservorios encontrados en la literatura.

La filogenia resultante (Figura 14) mostró que todas estas secuencias se agruparon dentro de los genotipos descritos para el CV-A24v en base a la región VP1. Se evidenció, además, que tanto las secuencias de los casos con PFA (de Filipinas, India, Bangladesh) como las de los primates no humanos (Bangladesh) y las ambientales (de Filipinas), se relacionaron con secuencias obtenidas de epidemias de conjuntivitis hemorrágica aguda que se informaron muy cercanas en el tiempo y geográficamente. Por ejemplo, la mayoría de las secuencias de los casos con PFA (2000-2002) y ambientales (2008) de Filipinas se agruparon en una rama

donde algunas compartieron un ancestro común con las secuencias de la epidemia de Taiwán (2000-2001) (6, 9, 63).

La secuencia de un caso de PFA de Gabón (2008), compartió un ancestro común con una secuencia ambiental de Filipinas (2008), las secuencias de Brasil (2005), las de España y las de Paquistán (2004) de las epidemias de conjuntivitis hemorrágicas agudas ocurridas en esos países (7, 8). Por otro lado, las secuencias de Bangladesh (2008) y de la India, todas de casos con PFA, mostraron homología junto con las secuencias de epidemias de conjuntivitis de Brasil (2009), Taiwán (2006-2007), India (2007) y China (2007-2008) y con las secuencias de los simios.

Aunque nuestro objetivo primario fue ratificar, a nivel molecular, el uso de las heces como muestra clínica para el diagnóstico virológico del CV-A24v causante de conjuntivitis hemorrágica aguda, hecho descrito pero a partir de las técnicas clásicas de diagnóstico, otras informaciones previas también poco valoradas y de interés, se apoyan con el presente estudio: i) el tropismo neurológico del CV-A24v, a tener en cuenta por su alto potencial epidémico y pandémico, (50, 107); ii) el rango de hospederos de esta variante antigénica, desde los individuos asintomáticos, con PFA y primates no humanos que pueden servir de reservorios temporales; y iii) la permanencia en el medio ambiente (aguas albañales, ríos y afluentes) que sirven de vehículos para la diseminación viral, ya sea, entre, durante y años posteriores al desarrollo de las epidemias.

Indudablemente numerosas investigaciones serán necesarias para estudiar en mayores detalles el tropismo celular del CV-A24v, no solo por las células de la conjuntiva, sino también su capacidad de invadir las células del sistema nervioso central, así como la epigenética humana que pudiera determinar el curso de la infección hacia cualquiera de las manifestaciones clínicas, entre otros temas de interés para el humano.

V. DISCUSIÓN GENERAL

V. DISCUSIÓN GENERAL

La Conjuntivitis Hemorrágica Aguda, causada por el CV-A24v, se caracterizó por brotes grandes y explosivos desde su aparición en el año 1970. Estos brotes afectaron miles de personas en un amplio rango de edades y sin distinción de sexo (11). Por décadas, las oleadas pandémicas provocaron verdaderos caos en los centros médicos, educacionales, de trabajo y recreacionales, implicando altos costos económicos (1, 19).

En la epidemiología del CV-A24v se describen cuatro etapas: la primera, la emergente, en la década de los años 70 y restringida al sudeste asiático y la India; la segunda, en la década de los años 80, de expansión mundial donde prácticamente comenzó el comportamiento pandémico; la tercera etapa, en la década de los años 90, con pocos reportes pero evidente el comportamiento epidémico, al menos en la región del Caribe y en países asiáticos y la cuarta etapa, que comenzó a inicios del año 2000 y que se extiende hasta esta la actualidad, con al menos, tres picos pandémicos (6, 22).

En Cuba, la circulación del CV-A24v coincide con sus etapas pandémicas. La primera epidemia causada por este agente ocurrió en el año 1986 y posteriormente ocurrieron brotes significativos en los años 1987, 1992-1993, 1997, 2003, 2008-2009, y el último en el año 2017 (11, 13). Teniendo en cuenta este escenario y la disponibilidad de un número considerable de aislamientos virales del CV-A24v obtenidos durante los primeros cinco periodos epidémicos cubanos, nos propusimos realizar una caracterización molecular de dos regiones parciales del genoma viral del CV-A24v: la proteasa 3C y la proteína estructural VP1.

Los resultados también son de gran interés para la región de las Américas debido a la escasa información que existe en el hemisferio occidental sobre estos virus. Hasta el momento, solo investigadores brasileños y franceses estudiaron a nivel filogenético algunas epidemias de

conjuntivitis hemorrágica aguda ocurridas a partir del año 2003 en Brasil y Guyana Francesa (7, 28, 153, 214).

Primeramente, se obtuvieron las secuencias nucleotídicas del CV-A24v por el método de Sanger. Posteriormente se determinaron los porcentajes de identidad respecto a la cepa prototipo EH24_70_Singapur 1970 y con ello se corroboraron las identificaciones previas realizadas mediante otras metodologías. Luego se conformaron los conjuntos de alineamientos y se realizaron los primeros estudios filogenéticos por el método de distancia Neighbor-joining solo para a región 3C. A partir de estos resultados y métodos bioinformáticas más robustos, se realizó el análisis filogenético y filodinámico de las dos regiones genómicas. De modo que, los nuevos conjuntos de alineamientos sin secuencias repetidas ni recombinantes, incluyeron 54 secuencias cubanas y 83 secuencias de 17 países para la región genómica 3C y 35 secuencias cubanas con 95 secuencias de 18 países para la región VP1.

La caracterización filogenética de ambas regiones del genoma viral mediante el programa BEAST, determinó que cada periodo epidémico cubano resultó de una nueva introducción del virus al país y no de la circulación o emergencia endémica de las diferentes variantes genéticas. Se observó además, y en concordancia con lo descrito en la literatura (6, 88, 233), que los periodos epidémicos cubanos ocurrieron cíclicamente entre cinco a seis años, y en los años continuos (generalmente dos años), circuló la misma variante genética.

Los periodos epidémicos de los años 1986-1987, 1992-1993 fueron causados indistintamente por variantes que clasificaron dentro del genotipo GIII. Las variantes genéticas aisladas de los periodos epidémicos a partir del año 1997 se incluyeron dentro del genotipo GIV. En el periodo epidémico de los años 1986-1987 las secuencias cubanas se agruparon con secuencias de Jamaica (1987) y Brasil (1987). Este grupo mostró un ancestro común con las secuencias de Ghana del año 1987 en la región 3C, única diferencia en relación a la inferencia de la región VP1, posiblemente por la no disponibilidad de las secuencias ghaneses. En el periodo epidémico de los años 1992 y 1993 en la región genómica 3C, las secuencias cubanas mostraron homología con la única secuencia de la República Dominicana existente. En la región VP1 formaron una rama independiente. Para el periodo epidémico del año 1997 las secuencias cubanas fueron homólogas con una secuencia de los Estados Unidos en ambas

filogenias. Sin embargo, en la región genómica VP1, se unió además a esta rama, la secuencia dominicana del año 1993, resultado que se observa también en la inferencia filogenética obtenida por otros autores que incluyeron o no las secuencias cubanas (27, 63, 105). En el periodo epidémico del año 2003, las secuencias cubanas se dividieron en dos grupos, uno mostró homología con las secuencias de Guadalupe en ambas inferencias, y el otro grupo con secuencias de la India (2003) y Brasil (2003-2005) en la región del genoma 3C y con una secuencia de Guyana Francesa en la región genómica VP1. El último periodo epidémico cubano (años 2008-2009) que aparece solamente en el análisis de la región 3C, las secuencias cubanas mostraron relaciones de ancestralidad con secuencias de la India del año 2007 y un grupo de secuencias de Brasil del año 2009.

Estas relaciones de ancestralidad, con excepción del periodo epidémico 1992-1993, encontraron apoyo en el análisis filogeográfico, a pesar de que Cuba no se identificó como el destino final de ninguna ruta de transmisión viral positiva ($BF > 3$). Se identificó la ruta China-Jamaica para el periodo epidémico 1986-1987 en ambas regiones genómicas. Para el periodo epidémico del año 1997 se identificaron varios países de origen: China, Corea del Sur, Tailandia y Taiwán, todas con destino en los Estados Unidos. Para el periodo epidémico del año 2003 se identificaron dos rutas de transmisión viral: desde China hasta Guadalupe y hasta Guyana Francesa y en el periodo 2008-2009 se obtuvo una ruta desde China a la India. Dichos supuestos se fundamentaron con la inclusión de Cuba en las redes de transmisión viral obtenidas.

De forma general, con los análisis filogeográficos se argumentó además la amplia diseminación del virus en la población mundial en 19 rutas de transmisión positivas obtenidas de la región genómica 3C y 25 de la región VP1, siete rutas resultaron comunes para ambas regiones genómicas. Predominaron las rutas de transmisión con origen en el continente Asiático. En la región genómica 3C se describieron 12 rutas y 11 en la región genómica VP1. Con origen en Asia y destino en las Américas se describieron 6 rutas en la región 3C y con origen y destino en el continente asiático 8 rutas en la región genómica VP1. China se destacó como una importante fuente de propagación de las variantes genéticas en Asia y Brasil en el continente americano. Todos estos hallazgos filogeográficos fortalecen las hipótesis de que para el CV-A24v, al igual que los virus de la influenza, el continente asiático constituye una

fuelle generadora de variantes genéticas con potencialidades pandémicas (20, 47). Se propone además, la hipótesis de que una vez que emergen dichas variantes pandémicas, en su recorrido por el mundo, pueden evolucionar favorablemente de forma tal que, cuando retornan al continente asiático constituyen nuevas variantes que, en medio de poblaciones susceptibles, encuentran todas las condiciones para originar otra oleada pandémica.

El análisis filodinámico de las variantes del CV-A24v cubanas y del resto del mundo incluidas, también evidenció que el virus mantiene una población efectiva estable en el tiempo, con fluctuaciones (aumentos) correspondientes a los diferentes periodos pandémicos. Se obtuvo una tasa de sustitución nucleotídica (sustituciones/sitio/año) para la región 3C de $4,39 \times 10^{-3}$ y para la región estructural VP1 de $5,80 \times 10^{-3}$, similar a las descritas anteriormente por otros autores (6).

Las estimaciones del TMRCA de las variantes cubanas indicaron que el virus pudo estar circulando previamente entre uno y hasta dos años antes del desarrollo de los picos epidémicos. Esta evidencia científica fortalece los datos epidemiológicos y de laboratorio observados en los diferentes periodos epidémicos y de esta forma aporta conocimientos al sistema nacional de salud para un mejor manejo de nuevas epidemias de conjuntivitis hemorrágica aguda que se sucedan.

El conocimiento general aportados por los estudios filogenéticos y filodinámicos constituyen evidencias científicas que permitirán manejar de forma más precisa y anticipada el desarrollo de nuevas epidemias del CV-A24v a nivel mundial, regional y nacional basados en las premisas del Sistema de Control Sanitario Internacional.

En Cuba el programa Control Sanitario Internacional promueve la reducción al mínimo del riesgo de introducir al país agentes biológicos de las enfermedades sujetas a este control dentro de las cuales se encuentra la conjuntivitis hemorrágica aguda. Teniendo en cuenta los conocimientos acerca de la patogenia y la evolución temporal cíclica del CV-A24v se pueden establecer acciones higiénico-epidemiológicas a nivel de fronteras; reordenar el sistema de vigilancia de viajeros internacionales acorde al riesgo personal y la situación específica de las regiones geográficas y los países de procedencia, con riesgo de convertirse en reservorios o portadores de la enfermedad e implementar y sistematizar actividades investigativas que permitan la optimización del programa (268).

A partir del estudio de los cambios aminoacídicos de las cepas cubanas se encontró que la mayoría de los mismos en la proteína VP1, se localizaron en la región del cañón. En esta región se encuentran los sitios antigénicos, y por ende, dichos cambios pudieran permitir el escape a la acción neutralizante de los anticuerpos generados por variantes virales que circularon en las epidemias previas. En la región 3C, los cambios aminoacídicos se localizaron cerca del sitio catalítico de la enzima o de unión al oriL de forma que pudiera estar involucrados en la evolución de las variantes virales cubanas. Por otro lado, se observó la composición conservada de determinadas posiciones, claves en el funcionamiento de esta proteasa, lo que contribuye al diseño y búsqueda de nuevos antivirales dirigidos contra esta proteína viral del CV-A24v.

También se demostró a nivel molecular, que en efecto, la variante genética del CV-A24v circulante causante de la conjuntivitis hemorrágica aguda es capaz de replicarse en la conjuntiva y el intestino de los pacientes y excretarse en sus heces. En los diferentes análisis tanto filogenéticos como filodinámicos, las secuencias nucleotídicas de los virus obtenidos a partir de las heces se comportaron tal cual las de los exudados conjuntivales en el grupo de secuencias de un mismo periodo epidémico.

Estamos conscientes de que el estudio tuvo limitaciones. Entre ellas las más relevantes fueron: i) la metodología de secuenciación por el método de Sanger y el análisis parcial y no completo de las regiones genómicas 3C y VP1; ii) la selección más representativa de forma global de las secuencias nucleotídicas, que es determinante en los resultados de los análisis filogenéticos y filodinámicos; y iii) las limitaciones intrínsecas de estos tipos de análisis y de los programas que los realizan.

No obstante, el estudio de las regiones genómicas parciales 3C y VP1 permitieron verificar la hipótesis de que las epidemias de conjuntivitis hemorrágica aguda causadas por el CV-A24v en Cuba se asocian con la reemergencia de variantes genéticas a nivel mundial. Los resultados brindan, además, una caracterización molecular del CV-A24v que ha circulado en Cuba y en diferentes países del mundo en los periodos epidémicos y pandémicos entre los años 1986 y 2009, aportando nuevas evidencias científicas desde una perspectiva filogenética, filodinámica y evolutiva; y una descripción más real de la patogenia del CV-A24v, que podrán ser utilizados y perfeccionados por la comunidad científica mundial.

VI. CONCLUSIONES

VI. CONCLUSIONES

- Las variantes genéticas circulantes en Cuba en cada periodo guardan relación con las que circularon en otras partes del mundo correspondientes a los genotipos III y IV.
- El origen temporal del GIV del CV-A24v se remonta a los últimos años de la década de los 90 lo que constituye un nuevo hallazgo en la epidemiología de esta variante.
- En Cuba las epidemias de conjuntivitis hemorrágica aguda causadas por el CV-A24v resultaron de nuevas introducciones del virus al país, con orígenes fundamentalmente en Asia y estas variantes emergentes comenzaron a circular entre uno y dos años previos a la ocurrencia del pico epidémico.
- Las cepas cubanas de CV-A24v presentan cambios aminoacídicos en sitios funcionales de la proteasa 3C y en la región del cañón de la proteína VP1 que pueden relacionarse con la evolución molecular de las diferentes variantes genéticas.
- Las heces constituyen fuente de infección viral durante los periodos epidémicos de conjuntivitis hemorrágica aguda y una muestra clínica útil para la identificación etiológica del CV-A24v en todas las manifestaciones clínicas que produce.

VII. RECOMENDACIONES

VII. RECOMENDACIONES

- ✓ Obtener la secuencia del genoma completo de las cepas cubanas del CV-A24v para su posterior análisis filogenético y filodinámico.
- ✓ Explorar la presencia del CV-A24v en muestras de pacientes con PFA y medioambientales en Cuba para realizar estudios filogenéticos y filodinámicos.
- ✓ Desarrollar estudios que permitan dilucidar las posibles funciones de los cambios aminoacídicos de regiones genómicas 3C y VP1 de las cepas cubanas.
- ✓ Realizar estudios inmunológicos que permitan complementar los conocimientos acerca del comportamiento reemergente del CV-A24v.

ANEXOS

ANEXOS

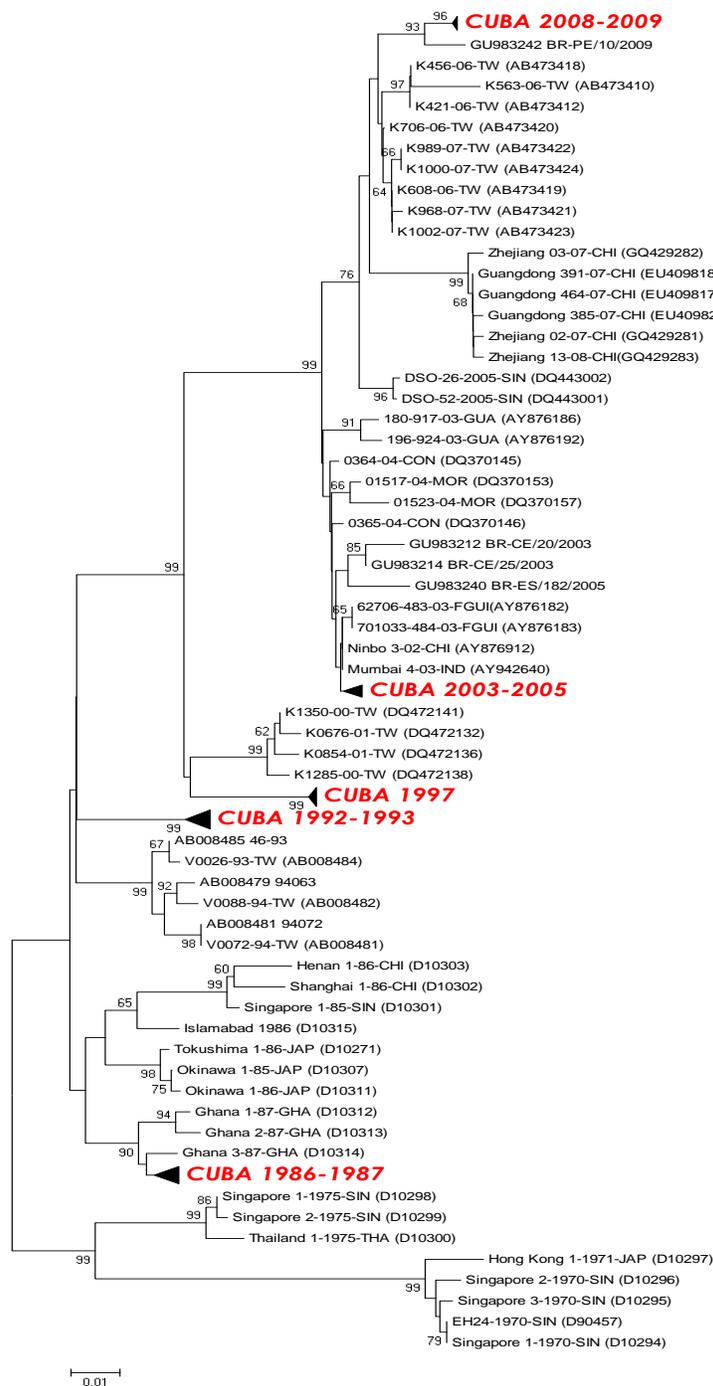
Anexo 1. Número de acceso al Genbank de las secuencias cubanas del CV-A24v de las regiones genómicas 3C y VP1.

Años	Número de acceso	
	Región 3C	Región VP1
1986	KC128616- KC128642	KC184859- KC184885
1987	KC128643- KC128648	KC184886- KC184890
1992	KC205691- KC205712	KC205656*- KC205677
1993	KC205713- KC205727	KC205678- KC205690
1997	KC286913- KC286955	KC286956 -KC286993
2003	KC286994- KC287032	KC287038 -KC287076
2005	KC287033- KC287037	KC287077- KC287081
2008	HM156623- HM156628	NR
2009	HM156613- HM156622	NR

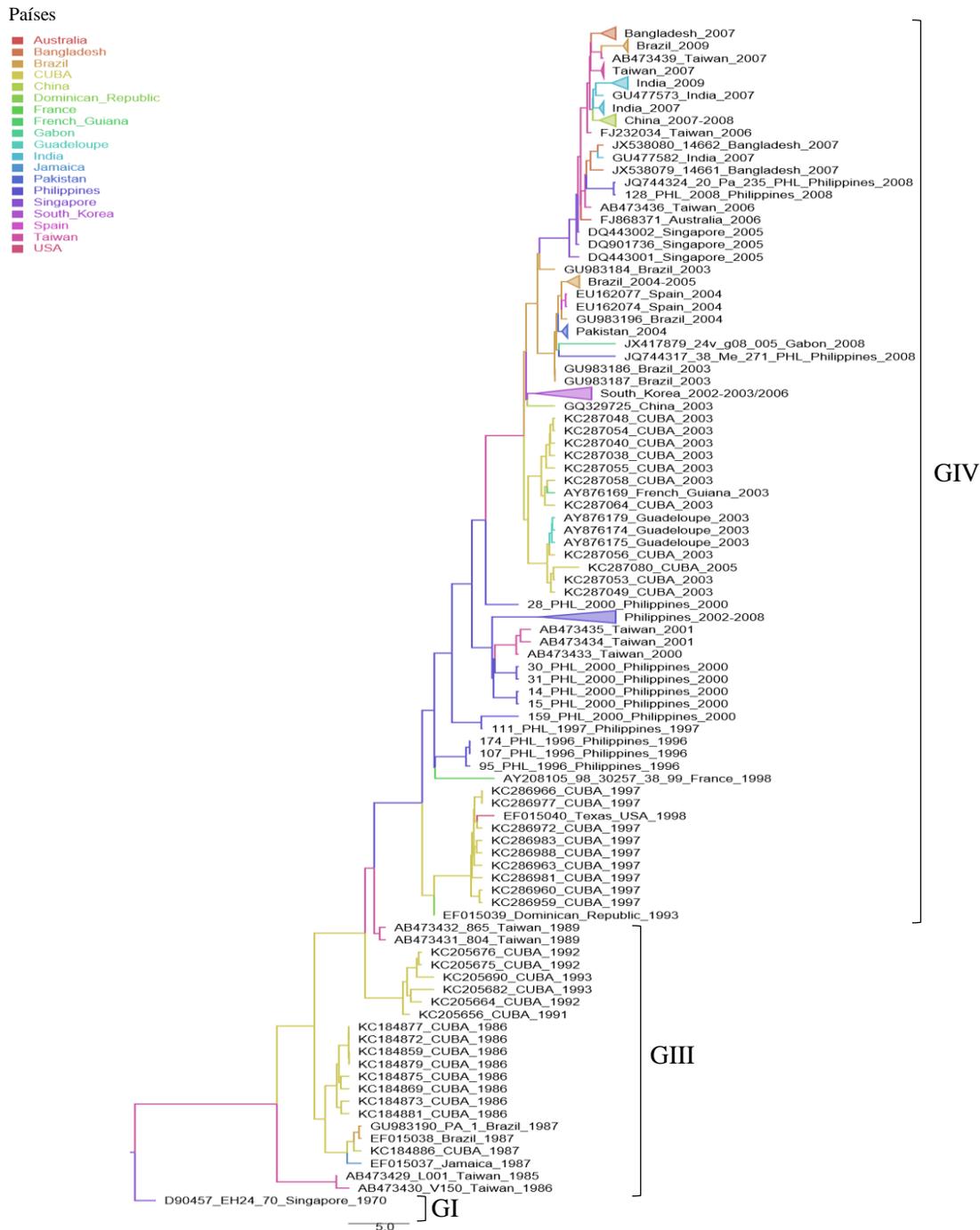
NR: No realizado, región del genoma no secuenciado.

*La secuencia KC205656 aparece con el año 1991 teniendo en cuenta la fecha del inicio de los síntomas del paciente que aparece en el material fuente, se recibió en el Laboratorio Nacional de Referencia para los enterovirus en enero del año 1992. Fuente: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/>

Anexo 2. Árbol filogenético de la región 3C (510 pb) de CA24v de todos los periodos epidémicos cubanos y cepas de otras regiones geográficas reportadas en el Banco de Genes. Las secuencias nucleotídicas fueron analizadas por el programa MEGA6. La construcción del árbol filogenético se realizó mediante el método Neighbor-Joining con 1000 réplicas del remuestreo. Los aislamientos están identificados por Nombre de la cepa-Año de aislamiento-País-Número de acceso al GenBank. Abreviaturas usadas: Br: Brasil, CHI, China; CON, Congo; CUB, Cuba; FGUI, Guyana Francesa; GHA, Ghana; GUA, Guadalupe; IND, India; JAP, Japón; KOR, Corea; MOR, Marruecos; SIN, Singapur; THA, Tailandia; TW, Taiwán.

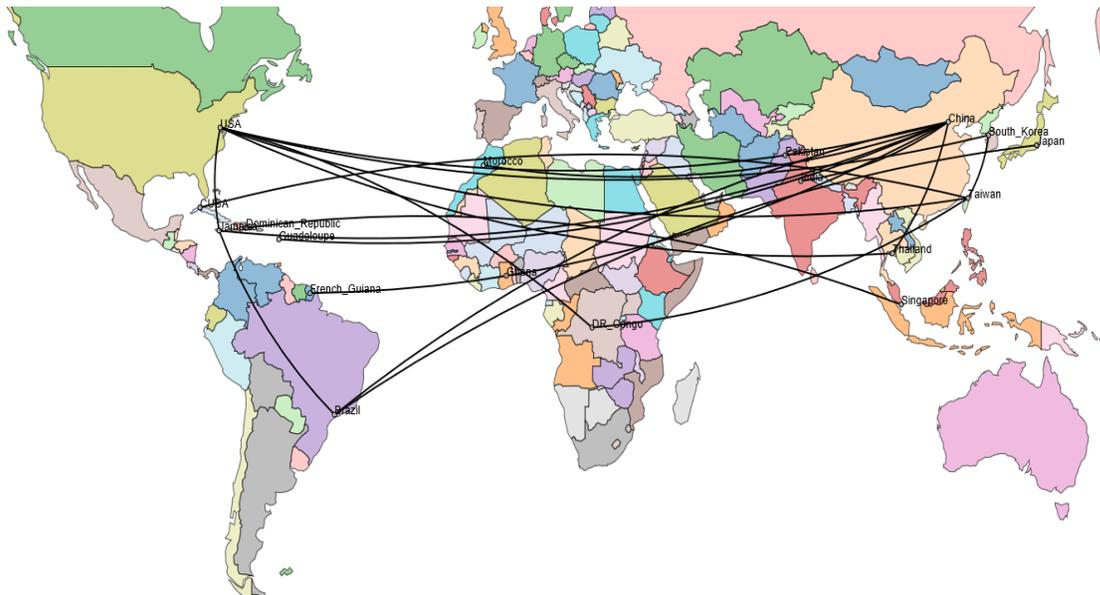


Anexo 4. Árbol de mayor credibilidad (MCC) de 35 secuencias de las epidemias cubanas de conjuntivitis hemorrágica aguda (1986-2009) y 96 secuencias de 19 países en base a la región parcial VP1 (234 pb) del CV-A24v construido por el método Bayesiano con el programa BEAST. Los colores de las ramas corresponden a la ubicación geográfica probable, la escala de colores describe los países incluidos en el análisis. A la derecha se indican los genotipos para la región VP1 (GI, GIII, GIV) según este estudio. Las secuencias se identificaron por su número de acceso al banco de genes GenBank, nombre, país y año de la cepa correspondiente.



Anexo 5. Visualización en el mapa del mundo de las rutas de transmisión con $BF > 3$ del CV-A24v en base a la región genómica 3C (A) y a la región genómica VP1 (B) mediante el programa SpreadD3

A



B



VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Finger C. Brazil faces worst outbreak of conjunctivitis in 20 years. *Lancet Infect Dis.* 2003;361:1714.
2. Medina NH, Haro-Muñoz E, Pellini AC, Machado BC, Russo DH, Timenetsky MC, et al. Acute hemorrhagic conjunctivitis epidemic in São Paulo State, Brazil, 2011. *Rev Panam Salud Publica.* 2016;39(2):137-41.
3. Azari AA and Barney NP. Conjunctivitis: A Systematic Review of Diagnosis and Treatment. *JAMA Dermatol.* 2013;310(16):1721-9.
4. Chatterjee S, Quarcoopome CO, Apenteng A. Unusual type of epidemic conjunctivitis in Ghana. *Br J Ophthalmol.* 1970;54:628-30.
5. Yin-Murphy M. The picornaviruses of acute haemorrhagic conjunctivitis: a comparative study. *Southeast Asian J Trop Med Public Health.* 1973;4(3):305-10.
6. Chu PY, Ke GM, Chang CH, Lin JC, Sun CY, Huang WL, et al. Molecular epidemiology of coxsackie A type 24 variant in Taiwan, 2000-2007. *J Clin Virol.* 2009;45(4):285-91.
7. Dussart P, Cartet, G, Huguet P, Leveque N, Hajjar C, Morvan J, et al. Outbreak of acute hemorrhagic conjunctivitis in French Guiana and West Indies caused by coxsackievirus A24 variant: phylogenetic analysis reveals Asian import. *J Med Virol.* 2005;75(4):559-65.
8. Tavares F, Campos R de M, Burlandy FM, Fontella R, de Melo MM, da Costa EV et al. Molecular characterization and phylogenetic study of coxsackievirus A24v causing outbreaks of acute hemorrhagic conjunctivitis (AHC) in Brazil. *PloS One.* 2011;6(8):e23206.
9. Shukla D, Kumar A, Srivastava S, Dhole TN. Molecular identification and phylogenetic study of coxsackievirus A24 variant isolated from an outbreak of acute hemorrhagic conjunctivitis in India in 2010. *Arch Virol.* 2012;158(3):679-684.

10. Chansaenroj J, Vongpunsawad, S, Puenpa J, Theamboonlers A, Vuthitanachot V, Chattakul P, et al. Epidemic outbreak of acute haemorrhagic conjunctivitis caused by coxsackievirus A24 in Thailand, 2014. *Epidemiol Infect.* 2015;143:3087-93.
11. PAHO. Epidemiological Update: Conjunctivitis 2017. [Available from: http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_docman&task=doc_view&Itemid=270&gid=40941&lang=en]
12. Infomed. Vigilancia en Salud Pública. La conjuntivitis hemorrágica en Cuba y en las Américas. Actualización Cuba 2017. Available from: <https://temas.sld.cu/vigilanciaensalud/>.
13. Morales PI, Gonzáles CR, Quintana JI. Conjuntivitis Hemorrágica Epidémica Aguda en Cuba: Caracterización epidemiológica. *Reporte Técnico de Vigilancia.* 2004;9(1).
14. Delgado B. Conjuntivitis Hemorrágica Epidémica en Cuba. Caracterización epidemiológica, cronología y situación actual. 1981-1997. *Reporte Técnico de Vigilancia.* 1997; 2(7).
15. Patriarca PA, Onorato IM, Sklar VE, Schonberger LB, Kaminski RM, Hatch MH, et al. Acute hemorrhagic conjunctivitis Investigation of a large-scale community outbreak in Dade y, Florida. *JAMA.* 1983;249(10):1283-9.
16. Zocher G, Mistry N, Frank M, Hahnlein-Schick I, Ekstrom J-O, et al. A Sialic Acid Binding Site in a Human Picornavirus. *PLoS Pathog.* 2014;10(10):e1004401. doi:10.1371/journal.ppat.1004401.
17. Palacios G, Oberste MS. Enteroviruses as agents of emerging infection disease. *J Neurovirool.* 2005;11(5):424-33.
18. Wadia NH, Wadia PN, Katrak SM, Misra VP. Neurological manifestations of acute haemorrhagic conjunctivitis. *Lancet.* 1981;2(8245):528-9.
19. Leveque N, Huguet P, Norder H, Chomel JJ. Enteroviruses responsible for acute hemorrhagic conjunctivitis. *Med Mal Infect.* 2010;40(4):212-8.
20. Nilsson EC, Jamshidi F, Johansson SM, Oberste MS, Arnberg N. Sialic acid is a cellular receptor for coxsackievirus A24 variant, an emerging virus with pandemic potential. *J Virol.* 2008;82(6):3061-8.
21. Kuo PC, Lin JY, Chen LC, Fang YT, Cheng YC, Wu HY, et al. Molecular and immunocytochemical identification of coxsackievirus A-24 variant from the acute haemorrhagic conjunctivitis outbreak in Taiwan in 2007. *Eye.* 2010;24(1):131-6.

22. Yen YC, Chu PH, Lu PL, Lin YC, Shi YY, Chou LC, et al. Phylodynamic Characterization of an Ocular-Tropism Coxsackievirus A24 Variant. *PloS One*. 2016;11(8).
23. Pallansch M, Oberste MS, Whitton L. Enteroviruses: Polioviruses, Coxsackieviruses, Echoviruses, and Newer Enteroviruses. In: Knipe DM, Howley PM, editors. *Fields Virology*. 6th ed. Philadelphia - New York: Lippincott Williams & Wilkins; 2013.490-529.
24. Lin KH, Wang HL, Sheu MM, Huang WL, Chen CW, Yang CS, et al. Molecular epidemiology of a variant of coxsackievirus A24 in Taiwan: two epidemics caused by phylogenetically distinct viruses from 1985 to 1989. *J Clin Microbiol*. 1993;31(5):1160-6.
25. Nidaira M, Kuba SM, Taira K, Maeshiro N, Mahoe Y, et al. Molecular evolution of VP3, VP1, 3C(pro) and 3D(pol) coding regions in coxsackievirus group A type 24 variant isolates from acute hemorrhagic conjunctivitis in 2011 Okinawa, Japan. *Microbiol Immunol*. 2014;58:227-38.
26. Sun D, Chen S, Cheng A, Wang M. Roles of the Picornaviral 3C Proteinase in the Viral Life Cycle and Host Cells. *Viruses*. 2016;8(3).
27. De W, Huanying Z, Hui L, Corina M, Xue G, Leng L, et al. Phylogenetic and molecular characterization of coxsackievirus A24 variant isolates from a 2010 acute hemorrhagic conjunctivitis outbreak in Guangdong, China. *Virol J*. 2012;9:41.
28. Sousa IP Jr, Burlandy FM, Ferreira LJ, Alves JCS, Sousa-Júnior EC, Tavares FN, et al. Re-emergence of a coxsackievirus A24 variant causing acute hemorrhagic conjunctivitis in Brazil from 2017 to 2018. *Arch Virol*. 2019;164:1181-5.
29. Smura T, Blomqvist S, Vuorinen T, Ivanova O, Samoïlovich E, Al-Hello H, et al. The Evolution of Vp1 Gene in Enterovirus C Species Sub-Group That Contains Types CVA-21, CVA-24, EV-C95, EV-C96 and EV-C99. *PloS One*. 2014;9(4).
30. Rife B, Mavian C, Chen CM, Salemi M, Min J, and Prosperi M. Phylodynamic applications in 21st century global infectious disease research. *Global Health Research and Policy*. 2017;2:(13).
31. Volz EM, Koelle K, Bedford T. Viral phylodynamics. *PLoS Comput Biol*. 2013;9(3):e1002947.
32. Lemey P, Rambaut A, Drummond AJ, Suchard MA. Bayesian phylogeography finds its roots. *PLoS Comput Biol* 2009;5(e1000520).

33. Rambaut A, Pybus OG, Nelson MI, Viboud C, Taubenberger JK, et al. The genomic and epidemiological dynamics of human influenza A virus. *Nature*. 2008;453:615-9.
34. Grenfell BT PO, Gog JR, Wood JL, Daly JM, Mumford JA, et al. Unifying the epidemiological and evolutionary dynamics of pathogens. *Science*. 2004;303(5656):327-32.
35. Redon IA, Lago PJ, Perez LR, Puentes P, Corredor MB. Outbreak of acute haemorrhagic conjunctivitis in Cuba. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1999;94(4):467-8.
36. Comellas M, Más P, Goyenechea A, Varcárcel M. Estudio de un brote de conjuntivitis hemorrágica, Cuba 1986. *Rev Cub Hig Epidemiol*. 1989;27:71-9.
37. Kono R, Sasagawa A, Ishii K, Siginra S, Ochi M, Matsumya H, et al. Pandemic of new type of conjunctivitis. *Lancet Infect Dis*. 1972; 1:1191-94.
38. Lim KH and Yin-Murphy M. An epidemic of conjunctivitis in Singapore in 1970. *Singapore Med J*. 1971;4:119-27.
39. Mirkovic RR, Kono R, Yin-Murphy M, Sohler R, Schmidt NJ, Melnick JL. Enterovirus type 70: the etiologic agent of pandemic acute haemorrhagic conjunctivitis. *Bull World Health Organ*. 1973;49(4):341-6.
40. Mirkovic RR, Schmidt NJ, Yin-Murphy M, Melnick JL. Enterovirus etiology of the 1970 Singapore epidemic of acute conjunctivitis. *Intervirology*. 1974;4:119-27.
41. Kono R. Apollo 11 disease or acute hemorrhagic conjunctivitis: a pandemic of a new enterovirus infection of the eyes. *Am J Epidemiol*. 1975;101(5):383-90.
42. Hierholzer J, Hilliard, KA, Esposito JJ. Serosurvey for acute hemorrhagic conjunctivitis virus (Enterovirus 70) antibodies in the Southeastern United States, with review of the literature and some epidemiologic implications. *Am J Epidemiol*. 1975;102(6):533-44.
43. Asbell PA, de la Pena W, Harms D, Hatch M, Kaufman HE. Acute hemorrhagic conjunctivitis in Central America: first enterovirus epidemic in the western hemisphere. *Ann Ophthalmol*. 1985;17(3):205-8, 10.
44. Herrero UL. Conjuntivitis hemorrágica aguda en Costa Rica y el origen del Enterovirus 70 en humanos. *Acta Pediátr Costarric*. 2002;16(2):63-7.
45. Akcay E CA, Hondur G, Kocak Z, Duru N, Kılıc S et al. Molecular identification of viral agents associated with acute conjunctivitis: a prospective controlled study. *Braz J Infect Dis*. 2017;21(4):391-5.

46. Satpathy G, Mohanty S, Nayak N. An epidemic of viral acute haemorrhagic conjunctivitis in Delhi in 1994. *Indian J Ophthalmol.* 1996;44(1):19-21.
47. Yin-Murphy M, Baharuddin I, Phoon MC, Chow VT. A recent epidemic of Coxsackie virus type A24 acute haemorrhagic conjunctivitis in Singapore. *Br J Ophthalmol.* 1986;70(11):869-73.
48. Leveque N, Lahlou Amine I, Tcheng R, Falcon D, Rivat N, Dussart P, et al. Rapid diagnosis of acute hemorrhagic conjunctivitis due to coxsackievirus A24 variant by real-time one-step RT-PCR. *J Virol Methods.* 2007;142(1-2):89-94.
49. Acute hemorrhagic conjunctivitis outbreak caused by Coxsackievirus A24 Puerto Rico, 2003. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 2004;53(28):632-4.
50. Kosrirukvongs P, Kanyok R, Sitritantikorn S, Wasi C. Acute hemorrhagic conjunctivitis outbreak in Thailand, 1992. *Southeast Asian J Trop Med Public Health.* 1996;27(2):244-9.
51. Lin KH, Chern CL, Chu PY, Chang CH, Wang HL, Sheu MM, et al. Genetic analysis of recent Taiwanese isolates of a variant of coxsackievirus A24. *J Med Virol.* 2001;64(3):269-74.
52. Kishore J, Isomura S. Detection & differentiation of Coxsackie A 24 variant isolated from an epidemic of acute haemorrhagic conjunctivitis in north India by RT-PCR using a novel primer pair. *Indian J Med Res.* 2002;115:176-83.
53. Acute hemorrhagic conjunctivitis St. Croix, U.S. Virgin Islands, September-October 1998. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 1998;47(42):899-901.
54. Meng R, Qiu Y, Yan L. [Study on etiology of acute hemorrhagic conjunctivitis in Qingdao during 1997]. *Zhonghua Shi yan He Lin Chuang Bing Du Xue Za Zhi = Chinese Journal of Experimental and Clinical Virology.* 1999;13(2):186-7. Chinese.
55. Madhavan HN, Malathy J, Priya K. An outbreak of acute conjunctivitis caused by Coxsackie virus A24. *Indian J Ophthalmol.* 2000;48(2):159.
56. Tavares FN, Costa EV, Oliveira SS, Nicolai CC, Baran M, da Silva EE. Acute hemorrhagic conjunctivitis and coxsackievirus A24v, Rio de Janeiro, Brazil, 2004. *Emerg Infect Dis.* 2006;12(3):495-7.

57. Notes from the field: acute hemorrhagic conjunctivitis outbreaks caused by coxsackievirus A24v Uganda and southern Sudan, 2010. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* . 2010;59(32):1024.
58. Ayoub EA, Shafik CF, Gaynor AM, Mohareb EW, Amin MA, Yassin AS, et al. A molecular investigative approach to an outbreak of acute hemorrhagic conjunctivitis in Egypt, October 2010. *Virology*. 2013;10:96.
59. Burr SE, Sillah A, Joof H, Bailey R and Holland MJ. An outbreak of acute haemorrhagic conjunctivitis associated with coxsackievirus A24 variant in The Gambia, West Africa. *BMC Res Notes*. 2017;10:692.
60. Yan D, Xiong Y, Zhang Y, Yang Q, Zhang S, Gong T, et.al. [Molecular Identification and Phylogenetic Analyses of Coxsackievirus A24v Causing an Outbreak of Acute Hemorrhagic Conjunctivitis in Jiangxi, China, in 2010]. *Bing Du Xue Bao = Chinese J Virology*. 2015;31(3):251-7. Chinese.
61. Vennema H. Conjunctivitis Americas (05): Caribbean (Bonaire). *Promed Archive*. 2017;20170704.5150640.
62. Zell R DE, Gorbalenya AE, Hovi T, King AMQ, Knowles NJ, et al. ICTV Virus Taxonomy Profile: Picornaviridae. *J Gen Virol*. 2017;98:2421-2.
63. Wu B, Qi X, Xu K, Ji H, Zhu Y, Tang F, et al. Genetic Characteristics of the Coxsackievirus A24 Variant Causing Outbreaks of Acute Hemorrhagic Conjunctivitis in Jiangsu, China, 2010. *PloS One*.2014;9(1).
64. Zhang L, Zhao N, Huang X, Jin X, Geng X, Chan TC, et al. Molecular epidemiology of acute hemorrhagic conjunctivitis caused by coxsackie A type 24 variant in China, 2004-2014. *Sci Rep*.2017;7.
65. Racaniello V. Picornaviridae: The Viruses and Their Replication. In: Knipe DM, Howley PM, editors. *Fields Virology*. 6th ed. Philadelphia - New York: Lippincott Williams & Wilkins;2013.453-489.
66. Wang Y, Zhao S, Chen Y, Wang T, Dong C, Wo X, et al. The Capsid Protein VP1 of Coxsackievirus B Induces Cell Cycle Arrest by Up-Regulating Heat Shock Protein 70. *Front Microbiol*. 2019;10:1633.
67. Fang C-Y & Liu C-C. Recent development of enterovirus A vaccine candidates for the prevention of hand, foot, and mouth disease. *Expert Re Vaccines*. 2018; 17(9):819-31.

68. Harvala H, Kalimo H, Dahllund L, Santti J, Hughes P and Hyypia T. Mapping of tissue tropism determinants in coxsackievirus genomes. *The J Gen Virol.* 2002;83:1697-706.
69. Minor PD. Antigenic structure of picornaviruses. *Curr Top Microbiol Immunol.* 1990;161:121-54.
70. Mateu MG. Antibody recognition of picornaviruses and escape from neutralization: a structural view. *Virus Res.* 1995;38:1-24.
71. Brown BA, Maher K, Flemister MR, Naraghi-Arani P, Uddin M, Oberste MS, et al. Resolving ambiguities in genetic typing of human enterovirus species C clinical isolates and identification of enterovirus 96, 99 and 102. *The J Gen Virol.* 2009;90(Pt 7):1713-23.
72. Poh CL and Tan EL. Detection of enteroviruses from clinical specimens. In: Warnes JRSaA, editor. *Diagnostic Virology Protocols.* Berlin: Springer; 2010:65-77.
73. Joffret ML, Polston PM, Razafindratsimandresy R, Bessaud M, Heraud J-M and Delpyroux F. Whole Genome Sequencing of Enteroviruses Species A to D by High-Throughput Sequencing: Application for Viral Mixtures. *Front Microbiol.* 2018;9:2339.
74. Muir P, Kammerer U, Korn K, Mulders MN, Poyry T and Weissbrich B. Molecular typing of enterovirus: Current status and future requirements. *Clin Microbiol Rev* 1998; 11:202-27
75. Maher K and Pallansch MA Oberste MS. Molecular phylogeny of all human enterovirus serotypes based on comparison of sequences at the 5' end of the region encoding VP2. *Virus Res.* 1998;58:35-43.
76. Baxter NJ, Roetzer A, Liebig HD, Sedelnikova SE, Hounslow AM and Skern T. Structure and dynamics of coxsackievirus B4 2A proteinase, an enzyme involved in the etiology of heart disease. *J Virol.* 2006;80:1451-62
77. Jurgens CK, Barton DJ, Sharma N, Morasco BJ, Ogram SA and Flanagan JB. 2Apro is a multifunctional protein that regulates the stability, translation and replication of poliovirus RNA. *Virology.* 2006;345:346-57.
78. De Jong AS, Wessels E, Dijkman HB, Galama JM, Melchers WJ, Willems PH, et al. Determinants for membrane association and permeabilization of the coxsackievirus 2B protein and the identification of the Golgi complex as the target organelle. *J Biol Chem* 2003;278:1012-21.

79. Lin JY, Chen TC, Weng KF, Chang SC, Chen LL, Shih SR. Viral and host proteins involved in picornavirus life cycle. *J Biomed Sci.* 2009;16:103.
80. Banerjee R, Weidman MK, Echeverri A, Kundu P and Dasgupta A. Regulation of poliovirus 3C protease by the 2C polypeptide. *J Virol Methods.* 2004;78:9243-56.
81. Fujita K, Krishnakumar SS, Franco D, Paul AV, London E, Wimmer E. Membrane topography of the hydrophobic anchor sequence of poliovirus 3A and 3AB proteins and the functional effect of 3A/3AB membrane association upon RNA replication. *Biochemistry.* 2007;46:5185-99.
82. Richards OC, Spagnolo JF, Lyle JM, Vleck SE, Kuchta RD, Kirkegaard K. Intramolecular and intermolecular uridylylation by poliovirus RNA-dependent RNA polymerase. *J Virol Methods.* 2006;80:7405-15.
83. DeStefano JJ, Titilope O. Poliovirus protein 3AB displays nucleic acid chaperone and helix-destabilizing activities. *J Virol Methods.* 2006;80:1662-71.
84. Franco D, Pathak HB, Cameron CE, Rombaut B, Wimmer E and Aniko VP. Stimulation of poliovirus RNA synthesis and virus maturation in a HeLa cell-free in vitro translation-RNA replication system by viral protein 3CDpro. *Virol J.* 2005;2(86).
85. Nayak A, Goodfellow IG, Woolaway KE, Birtley J, Curry S, Belsham GJ. Role of RNA structure and RNA binding activity of foot-and-mouth disease virus 3C protein in VPg uridylylation and virus replication. *J Virol.* 2006;80:9865-75.
86. Dougherty JD, Park N, Gustin KE, Lloyd RE. Interference with cellular gene expression. In: Ehrenfeld E DE, Roos RP, editors. *The picornaviruses.* Washington, DC: ASM Press; 2010;165-80.
87. Hanson PJ, Ye X, Qiu Y, Zhang HM, Hemida MG, Wang F, et al. Cleavage of DAP5 by coxsackievirus B3 2A protease facilitates viral replication and enhances apoptosis by altering translation of IRES-containing genes. *Cell Death Differ.* 2016;23:828-40.
88. Ishiko H, Takeda N, Miyamura K, Kato N, Tanimura M, Lin KH, et al. Phylogenetic analysis of a coxsackievirus A24 variant: the most recent worldwide pandemic was caused by progenies of a virus prevalent around 1981. *Virology.* 1992;187(2):748-59.
89. Binford SL. Conservation of amino acids in human rhinovirus 3C protease correlates with broad-spectrum antiviral activity of rupintrivir, a novel human rhinovirus 3C protease inhibitor. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005;49:619-26.

90. Costenaro L, Kaczmarek Z, Arnan C, et al. Structural Basis for Antiviral Inhibition of the Main Protease, 3C, from Human Enterovirus 93. *J Virol.* 2011;85(20):10764-73.
91. Abzug MJ. Presentation, diagnosis, and management of enterovirus infections in neonates. *Paediatr Drugs* 2004;6:1-10.
92. Yin-Murphy M, Lim KH, Ho YM. A coxsackievirus type A24 epidemic of acute conjunctivitis. *Southeast Asian J Trop Med Public Health.* 1976(1):1-5.
93. Kono R, Miyamura K, Tajiri E, Sasagawa A, Phuapradit P. Virological and serological studies of neurological complications of acute hemorrhagic conjunctivitis in Thailand. *J Infect Dis.* 1977;135(5):706-13.
94. Chen C, Guo C. Acute Hemorrhagic Conjunctivitis. In: Li H, editor. *Radiology of Infectious Diseases: Volume 1.* Dordrecht: Springer Netherlands; 2015. 49-52.
95. Prieto J y Gómez-Luis ML. Infecciones oculares. In: JJ G-RJaP, editor. *Microbiología Médica. Vol. II.* Madrid: Mosby1996. 379-400.
96. Langford MP, Anders EA, Burch MA. Acute hemorrhagic conjunctivitis: anti-coxsackievirus A24 variant secretory immunoglobulin A in acute and convalescent tear. *Clin Ophthalmol.* 2015;9:1665-73.
97. Li J, Lu X, Jiang B, Du Y, Yang Y, Qian H, et al. Adenovirus-associated acute conjunctivitis in Beijing, China, 2011-2013. *BMC Infect Dis.* 2018;18(1):135.
98. Beaver JT, Lelutiu N, Habib R and Skountzou I. Evolution of two major zika virus lineages: implications for pathology, immune response, and vaccine development. *Front Immunol.* 2018;9:1640.
99. Martínez-Pulgarín D, Muñoz-Urbano D, De la Cruz D. The Eye and the Chikungunya Virus. In: Rodríguez-Morales A, editor. *Current Topics in Chikungunya.* London: InTech; 2016.
100. Sheraz F, Tahir H, Saqi J, Daruwalla V. Dengue Fever Presenting Atypically with Viral Conjunctivitis and Subacute Thyroiditis. *J Coll Physicians Surg Pak.* 2016 26:S33-4.
101. Wadia NH, Katrak SM, Misra VP, Wadia PN, Miyamura K, Hashimoto K, et al. Polio-like motor paralysis associated with acute hemorrhagic conjunctivitis in an outbreak in 1981 in Bombay, India: clinical and serologic studies. *J Infect Dis.* 1983;147(4):660-8.

102. Sadeuh-Mba SA, Bessaud M, Massenet D, Joffret ML, Endegue MC, Njouom R, et al. High Frequency and Diversity of Species C Enteroviruses in Cameroon and Neighboring Countries. *J Clin Microbiol.* 2013;51(3):759-70.
103. Apostol LN, Imagawa, T, Suzuki A, Masago Y, Lupisan S, Olveda R, et al. Genetic diversity and molecular characterization of enteroviruses from sewage-polluted urban and rural rivers in the Philippines. *Virus Genes.* 2012;45(2):207-17.
104. Apostol LN, Suzuki A, Bautista A, Galang H, Paladin FJ, Fuji N, et al. Detection of non-polio enteroviruses from 17 years of virological surveillance of acute flaccid paralysis in the philippines. *J Med Virol.* 2012;84(4):624-31.
105. Laxmivandana R, Yergolkar P, Rajeshwari M, Chitambar SD. Genomic characterization of coxsackievirus type A24 strains associated with acute flaccid paralysis and rarely identified Hopkins syndrome. *Arch Virol.* 2014;159:3125-9.
106. Oberste MS, Feeroz MM, Maher K, Nix WA, Engel GA, Hasan KM, et al. Characterizing the picornavirus landscape among synanthropic nonhuman primates in bangladesh, 2007 to 2008. *J Virol.* 2013;87(1):558-71.
107. Dufresne AT, Gromeier M. A nonpolio enterovirus with respiratory tropism causes poliomyelitis in intercellular adhesion molecule 1 transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004;101(37):13636-41.
108. Akpek EK and Gottsch J. Immune defense at the ocular surface. *Eye.* 2003;17:949-56.
109. Newman H GC. Viral ocular manifestations: a broad overview. *Rev Med Virol.* 2013; 23(5):281-94.
110. Lambiase A MA, Sacchetti M, Mantelli F, Bonini S. Toll-like receptors in ocular surface diseases: overview and new findings. *ClinSci.* 2011;120(10):441-50.
111. Melnick JL. Enterovirus: Poliovirus, Coxsackievirus, Echovirus, and newer Enterovirus. In: Knipe DM, Howley PM, editors. *Fields Virology.* 6th ed. Philadelphia - New York: Lippincott Raven Publishers. USA. 1996;665-712.
112. Tracy, S., N. Chapman , K. M. Drescher , K. Kono y W. Tapprich. Evolution of virulence in picornaviruses. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2006;299:193-209.
113. Blomqvist S and Roivainen M. Isolation and Characterization of Enteroviruses from Clinical Samples. In: Martín J, editor. *Poliovirus: Methods and Protocols, Methods in*

Molecular Biology. 1387. New York © Springer Science+Business Media New York.2016. 20-28.

114. Oshiki M, Miura T, Kazama S, Segawa T, Ishii S, Hatamoto M, et al. Microfluidic pcr amplification and miseq amplicon sequencing techniques for high-throughput detection and genotyping of human pathogenic rna viruses in human feces, sewage, and oysters. *Front Microbiol.* 2018;9:830.

115. Rutjes SA, Italiaander, R, van den Berg HH, Lodder WJ, de Roda Husman AM. Isolation and detection of enterovirus RNA from large-volume water samples by. *Appl Environ Microbiol.* 2005;71(7):3734-40.

116. Brinkman NE, Fout GS, Keely SP. Retrospective surveillance of wastewater to examine seasonal dynamics of enterovirus infections. *mSphere.* 2017;2:e00099-17.

117. Chung WY, Chiang PS, Luo ST, Lin TY, Tsao KC, Lee MS. A Molecular Approach Applied to Enteroviruses Surveillance in Northern Taiwan, 2008-2012. *PLoS One.* 2016;11(12).

118. Blomqvist S and Roivainen M. Isolation and Characterization of Enteroviruses from Clinical Samples. In: Martín J, editor. *Poliovirus: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology.* 1387. New York © Springer Science+Business Media New York. 2016.19-28.

119. Schmidt NJ. Cell culture Techniques for diagnostic virology. In: NJ LEaS, editor. *Diagnostic procedures for viral, rickettsial and chlamydial infections,* . 5th ed. EUA: American Public Health Association; 1979. p. 65-139.

120. Yin-Murphy M. Viruses of acute haemorrhagic conjunctivitis. *Lancet.* 1973;1(7802):545-6.

121. Melnick JL and Wimber IL. Liophilized combination of the Enterovirus equine antisera. New LBM pools prepared from reserves of antisera stored frozen for two decades. *Bull World Health Organ.* 1984;63:543-50.

122. Oberste MS, Nix WA, Maher K, Pallansch MA. Improved molecular identification of enteroviruses by RT-PCR and amplicon sequencing. *J Clin Virol.* 2003;26:375-7.

123. Nix WA, Oberste MS, Pallansch MA. Sensitive, seminested pcr amplification of vp1 sequences for direct identification of all enterovirus serotypes from original clinical specimens. *J Clin Microbiol.* 2006;44(8):2698-704.

124. Comellas FMM, Más LP, Balmaseda HA, Rodríguez LL, Palomera PR. Virologic diagnosis of an outbreak of epidemic hemorrhagic conjunctivitis by an indirect immunofluorescence technique. Cuba.1989. Rev Cubana Med Trop. 1992;44(3):228-9.
125. Arola A SJ, Ruuskanen O, Halonen P and Hyypia T. Identification of enteroviruses in clinical specimens by competitive PCR followed by genetic typing using sequence analysis. J Clin Microbiol. 1996;34:313-8.
126. Zooll GJ MW, Komecka H, Jambroes G, van der Poel HJ, Galama JM. General primer-mediated polymerase chain reaction for detection of enteroviruses: Application for diagnostic routine and persistent infections. J Clin Microbiol 1992;30:160-5.
127. Rotbart H. Enzymatic RNA amplification of the Enterovirus. J Clin Microbiol. 1990;28:438-42.
128. Wu D, Ke CW, Mo YL, Sun LM, Li H, Chen QX, et al. Multiple outbreaks of acute hemorrhagic conjunctivitis due to a variant of coxsackievirus A24: Guangdong, China, 2007. J Med Virol. 2008;80(10):1762-8.
129. Weldon WC, Oberste MS and Pallansch MA. Standardized Methods for Detection of Poliovirus Antibodies. In: Martin J, editor. Poliovirus: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology. 1387. New York: © Springer Science+Business Media. 2016.145-176.
130. Xiao XL, Wu H, Li YJ, Li HF, He YQ, Chen G, et al. Simultaneous detection of enterovirus 70 and coxsackievirus A24 variant by multiplex real-time RT-PCR using an internal control. J Virol Methods. 2009;159(1):23-8.
131. Russell CA, Jones TC, Barr IG, Cox NJ, Garten RJ, et al. The global circulation of seasonal influenza A (H3N2) viruses. Science. 2008;320:340-6.
132. Salemi M, Vandamme A-M, Lemey P. The phylogenetic handbook: a practical approach to phylogenetic analysis and hypothesis testing: Cambridge University Press. 2009.
133. Patterson C. Molecules and Morphology in Evolution: Conflict or Compromise?. Colin Patterson (ed). Cambridge, UK: Cambridge University Press. 1987.
134. Darriba D, Taboada GL, Doallo R, Posada D. jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. Nat Meth. 2012;9(8):772.
135. Tamura K PD, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. Mol Biol Evol. 2011;28(10):2731-9.

136. Hadfield J, Megill C, Bell SM, Huddleston J, Potter B, Callender C, et al. Nextstrain: real-time tracking of pathogen evolution. *Bioinformatics*. 2018;34:4121-23.
137. Felsenstein J. Numerical methods for inferring evolutionary trees. *Quarterly Review of Biology*. 1982;57:379-404.
138. Felsenstein J. Distance methods for inferring phylogenies: a justification. *Evolution*. 1984;38:16-24.
139. Li WH. Simple method for constructing phylogenetic trees from distance matrixes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. 1981; 2(78):1085-9.
140. Felsenstein J. Evolutionary trees from DNA sequences: a maximum likelihood approach. *J Mol Evol*. 1981;17:368-76.
141. Saitou N and Nei M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol*. 1987;4(4):406-25.
142. Saitou, N and Imanishi T. Relative efficiencies of the Fitch-Margoliash, maximum parsimony, maximum-likelihood, minimum-evolution, and neighbor-joining methods of phylogenetic tree construction in obtaining the correct tree. *Mol Biol Evol*. 1989;6:514-25.
143. Bollback J. Bayesian model adequacy and choice in phylogenetics. *Mol Biol Evol*. 2002;19(7):1171-80.
144. Drummond AJ, Rambaut A & Suchard MA. Bayesian Evolutionary Analysis Sampling Trees BEAST v1.8.4, 2002-2016. [Available from: <http://beast.community/>]
145. Faye OOF, e CCM, Lamarino A, et al. Molecular Evolution of Zika Virus during Its Emergence in the 20th Century. *PLoS Negl Trop Dis*. 2014;8(36).
146. Azarian T, Maraqa, N. F., Cook, R. L., Johnson, J. A., Bailey, C., Wheeler, S., et al. Genomic Epidemiology of Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* in a Neonatal Intensive Care Unit. *PLoS One*. 2016;11(10).
147. Ko HY, Li YT, Chao DY, Chang YC, Li ZT, Wang M, et al. Inter- and intra-host sequence diversity reveal the emergence of viral variants during an overwintering epidemic caused by dengue virus serotype 2 in southern Taiwan. *PLoS Negl Trop Dis*. 2018;12(10).
148. Pérez-Losada M, Castel AD, Lewis B ,Kharfen M, Cartwright ChP, Huang B et al. . Characterization of HIV diversity, phylodynamics and drug resistance in Washington, DC. *PLoS One*. 2017;12(9).

149. Dyrdak R, Mastafa M, Hodcroft EB, Neher RA, and Albert J. Intra- and interpatient evolution of enterovirus D68 analyzed by whole-genome deep sequencing. *Virus Evol.* 2019;5(1).
150. Huang H-W, Chu P-H, Pan C-H, Wang C-F, Lin C-C, Lu P-L, et al. Evolutionary histories of coxsackievirus B5 and swine vesicular disease virus reconstructed by phylodynamic and sequence variation analyses. *Scientific Reports.* 2018;8(1):8821.
151. Van H, Anh N T, Hong N, Nhu L, Nguyet LA, Thanh TT, et al. Enterovirus A71 Phenotypes Causing Hand, Foot and Mouth Disease, Vietnam. *Emerg Infect Dis.* 2019;25(4):788-91.
152. Chu PY TY, Chen YS, Chen HL, Lu PL, Chen YH, et al. Transmission and Demographic Dynamics of Coxsackievirus B1. *PloS One.* 2015;10(6).
153. Enfissia A JM, Delauneb D, Delpeyrouxb F, Rousseta D, Bessauidb M. Coxsackievirus A24 variant associated with acute haemorrhagic conjunctivitis cases, French Guiana, 2017. *Intervirology.* 2018;60:271-5.
154. De Maio N, Wu C-H, O'Reilly KM, Wilson D. New Routes to Phylogeography: A Bayesian Structured Coalescent Approximation. *PLoS Genet.* 2015;11(8).
155. Vrancken B, Lemey P, Rambaut A, Trevor Bedford, Ben Longdon, Huldrych F Günthard, et al. Simultaneously estimating evolutionary history and repeated traits phylogenetic signal: applications to viral and host phenotypic evolution. *Methods Ecol Evol.* 2015;6(1):67-82.
156. Beard R, Magee D, Suchard MA, Lemey P, Scotch M, et al. Generalized linear models for identifying predictors of the evolutionary diffusion of viruses. *AMIA Jt Summits Transl Sci Proc* 2014:23-8.
157. Volz EM, Koelle K, Bedford T. Viral phylodynamics and the search for an 'effective number of infections'. *Philos Trans R Soc Lond Ser B Biol Sci.* 2010;365:1879-90.
158. Dos Reis M, Donoghue PCJ and Yang Z. Bayesian molecular clock dating of species divergences in the genomics era. *Nat Rev Genet.* 2015;17:1-10.
159. Pallansch MA. Acute hemorrhagic conjunctivitis. In: *Hunter's tropical medicine* Strickland GT editor. Philadelphia: WB, Saunders. 2000:226-7.
160. Melnick J, Gerba CHP and Wallis C. Viruses in water. *Bull World Health Organ.* 1978;56 (4): 499-508.

161. Hadad MP, López CAU, Fernández LIR. A report of a nosocomial outbreak of hemorrhagic conjunctivitis in health workers. *Rev Cubana Med Trop.* 1995;47(2):140-1.
162. Higgins PG, Scott RJ, Davies PM, Gamble DR. A comparative study of viruses associated with acute haemorrhagic conjunctivitis. *J Clin Pathol.* 1974;27(4):292-6.
163. Marguerite N, Brottet E, Pagès F, Jaffar-Bandjee MC, Schuffenecker I, Josset L, et al. A major outbreak of conjunctivitis caused by coxsackievirus A24, Réunion, January to April 2015. *Euro Surveill.* 2016;21(26).
164. APHA. Enteroviral hemorrhagic conjunctivitis. *Control of communicable diseases Manual 18th.* Heymann DL editor. APHA Press. 2003:140-143.
165. Castillo M. Sinopsis epidemiológica de algunas enfermedades transmisibles. Editorial Pueblo y Educación. La Habana. 1984;65-99.
166. Alemañy J, Marrero E y Villar R. Enfermedades de la conjuntiva. *Oftalmología* 1985: 74-80.
167. Morrow GL, Abbott RL. Conjunctivitis. *Am Fam Physician.* 1998;57(4):735-46.
168. Skevaki CL, Galani, IE, Pararas MV, Giannopoulou KP, Tsakris A. Treatment of viral conjunctivitis with antiviral drugs. *Drugs.* 2011; 71(3):331-47.
169. Langford MP, Ball WA, Ganley JP. Inhibition of the enteroviruses that cause acute hemorrhagic conjunctivitis (AHC) by benzimidazoles; enviroxime (LY 122772) and envirodone (LY 127123). *Antiviral Res.* 1995;27(4):355-65.
170. Diana GD, Pevear DC. Antipicornavirus drugs: current status. *Antivir Chem Chemother* 1997;8:401-8.
171. Langford MP, Kadi RM, Ganley JP, Yin-Murphy M. Inhibition of epidemic isolates of coxsackievirus type A 24 by recombinant and natural interferon alpha and interferon beta. *Intervirology.* 1988;29(6):320-7.
172. Aguilera L, López P. Uso del interferón alfa 2-recombinante en la prevención de la conjuntivitis hemorrágica aguda. *Biotecnología Aplicada.* 1990;7:197-200.
173. Thibaut HJ, De Palma AM, Neyts J. Combating enterovirus replication: State-of-the-art on antiviral research. *Biochemical Pharmacology.* 2012;83:185-92.
174. Senior K. FDA panel rejects common cold treatment. *Lancet Infect Dis.* 2002;2:264.

175. Brown RN, Cameron R, Chalmers DK, Hamilton S, Luttick A, Krippner GY, et al. 2-Ethoxybenzoxazole as a bioisosteric replacement of an ethyl benzoate group in a human rhinovirus (HRV) capsid binder. *Bioorg Med Chem Lett*. 2005;15:2051-5.
176. Young Jeong J, Sperry, J, Taylor JA, Brimble MA. Synthesis and evaluation of 9-deoxy analogues of (')-thysanone, an inhibitor of HRV 3C protease. *Eur J Med Chem*. 2014;87:220-7.
177. Lin YJ, Chang YC, Hsiao NW, Hsieh JL, Wang CY, Kung SH, et al. Fisetinand rutin as 3C protease inhibitors of enterovirus A71. *J Virol Methods*. 2012;182:93-8.
178. Mandadapu SR, Weerawarna PM, Prior AM, Uy RA, Aravapalli S, Alliston KR, et al. Macrocyclic inhibitors of 3C and 3C-like proteases of picornavirus,norovirus, and coronavirus. *Bioorg Med Chem Lett*. 2013;23:3709-12.
179. Harrison DN, Gazina EV, Purcell DF, Anderson DA, Petrou S. Amiloride derivatives inhibit coxsackievirus B3 RNA replication. *J Virol Methods*. 2008;82:1465-73.
180. Thibaut HJ, Leyssen P, Puerstinger G, Muigg A, Neyts J, De Palma AM. Towards the design of combination therapy for the treatment of enterovirus. *Antiviral Res*. 2011;90(3):213-7.
181. Van der Schaar HM, Leyssen P, Thibaut HJ, de Palma A, van der Linden L, Lanke KH, et al. A novel, broad-spectrum inhibitor of enterovirus replication that targets host. *Antimicrob Agents Chemother*. 2013;57(10):4971-81.
182. Jun EJ, Won MA, Ahn J, Ko A, Moon H, Tchah H, et al. An antiviral small-interfering RNA simultaneously effective against the most prevalent enteroviruses causing acute hemorrhagic conjunctivitis. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2011;52(1):58-63.
183. Tan EL, Marcus KF, Poh CL. Development of RNA interference (RNAi) as potential antiviral strategy against enterovirus 70. *J Med Virol*. 2008;80(6):1025-32.
184. Kumar A, Satpathy G. Inhibition of Coxsackievirus A24 in permissive Hep2 cells by small interfering RNA (siRNA). *IOSR-JPBS*. 2017;12(3):21-6.
185. Caraballo R, Zocher G, Qian W, Mistry N, Arnberg N, Stehle T, et al. Pentavalent sialic acid conjugates inhibit viruses that cause highly contagious eye infections. 2019. EUROCARB, Tuesday, July 2, 2019 <http://eurocarb2019.com/abstracts/ol6-4-4>.
186. Más PL, Goyenechea A, Jacobo M, Palomera R. Conjuntivitis hemorrágica. Estudio virológico de la epidemia de 1981. *Rev Cub Hig Epid*. 1985;23:384-90.

187. Más PL, Comellas MM, Goyenechea A, Jacobo M, Palomera R y Beltrán J. Diagnóstico etiológico de un brote de conjuntivitis hemorrágica. *Bol Epid INHEM*. 1987 8:1-2.
188. Hall T. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl Acids Symp Ser*. 1999;41:95-8.
189. Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, and Kumar S. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Mol Biol Evol*. 2013;30:2725-9.
190. ElimDupes[Available from: <https://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/ELIMDUPES/elimdupes.html>].
191. Katoh K, Standley DM. MAFFT Multiple Sequence Alignment Software Version 7: Improvements in Performance and Usability. *Mol Biol Evol*. 2013;30(4):772-80.
192. Goujon M, McWilliam H, Li W, Valentin F, Squizzato S, Paern J, & Lopez R. (2010). A new bioinformatics analysis tools framework at EMBL-EBI. *Nucleic acids research*, 38(Web Server issue), W695-W699.
193. Martin D, Murrell B, Golden M, Khoosal A, Muhire B. RDP4: Detection and analysis of recombination patterns in virus genomes. *Virus Evol*. 2015.1(1):vev003. eCollection 2015.
194. R Core Team. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. 2018.[Available from <https://www.R-project.org/>].
195. Minin VN, Bloomquist EW, Suchard MA. Smooth skyride through a rough skyline: Bayesian coalescent-based inference of population dynamics. *Mol Biol Evol*. 2008;25:1459-71.
196. Baele G, Lemey P, Bedford T, Rambaut A, Suchard MA, Alekseyenko AV. Improving the Accuracy of Demographic and Molecular Clock Model Comparison While Accommodating Phylogenetic Uncertainty. *Mol Biol Evol*. 2012;29(9):2157-67.
197. Rambaut A, Drummond AJ, Xie W, Baele G and Suchard MA. MCMC Trace Analysis Tool Version v1.7.1.2018 [Available from: <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/tracer/>].
198. Rambaut A and Drummond AJ. TreeAnnotator v1.8.3, 2002-2016, MCMC Output analysis 2016 [Available from: <http://beast.bio.ed.ac.uk/>].

199. Rambaut A. Figtree v1.4.3, Tree Figure Drawing Tool. 2016. [Available from:<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>]
200. Bielejec F, Baele G, Rambaut A, Suchard MA, Lemey P. SpreadD3: interactive visualization of spatialtemporal history and trait evolutionary processes. *Mol Biol Evol.* 2016;33(8):2167-9.
201. Pons P and Latapy M. Computing Communities in Large Networks Using Random Walks. *JGAA.* 2006;10(2):191-218.
202. Sigrist CJA, De Castro E, Cerutti L, Cucho BA, Hulo N, Bridge A, Bougueleret L, Xenarios I. New and continuing developments at PROSITE. *Nucleic Acids Res.* 2013;41(Database issue):D344-7.
203. Guex N and Peitsch MC. SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: An environment for comparative protein modeling. *Electrophoresis.* 1997;18:2714-23.
204. Grupo de investigaciones ETICES. Declaración de Helsinki Boletín de Bioética. 2013;5(4).
205. Oberste MS, Maher K, Kilpatrick DR, Pallansch MA. Molecular Evolution of the Human Enteroviruses: Correlation of Serotype with VP1 Sequence and Application to Picornavirus Classification. *J Virol.* 1999;73(3):1941-8.
206. Lin KH, Takeda N, Miyamura K, Yamazaki S, Chen CW. The nucleotide sequence of 3C proteinase region of the coxsackievirus A24 variant: comparison of the isolates in Taiwan in 1985-1988. *Virus Genes.* 1991;5(2):121-31.
207. Combelas N, Holmblat B, Joffret ML, Colbere-Garapin F, Delpeyroux F. Recombination between poliovirus and coxsackie A viruses of species C: a model of viral genetic plasticity and emergence. *Viruses.* 2011;3(8):1460-84.
208. Palacios G, Casas, I, Tenorio A, and Freire C. Molecular identification of enterovirus by analyzing a partial VP1 genomic region with different methods. *J Clin Microbiol.* 2002;40:182-92.
209. Oberste MS, Maher K, Flemister MR, Marchetti G, Kilpatrick DR, Pallansch MA. Comparison of classic and molecular approaches for the identification of untypeable enteroviruses. *J Clin Microbiol.* 2000;38(3):1170-4.

210. Oh MD, Park S, Choi Y, Kim H, Lee K, Park W, et al. Acute hemorrhagic conjunctivitis caused by coxsackievirus A24 variant, South Korea, 2002. *Emerg Infect Dis.* 2003;9(8):1010-2.
211. Cabrerizo M, Echevarria JE, Otero A, Lucas P, Trallero G. Molecular characterization of a coxsackievirus A24 variant that caused an outbreak of acute haemorrhagic conjunctivitis in Spain, 2004. *J Clin Virol.* 2008;43(3):323-7.
212. Yeo DS, Seah SG, Chew JS, Lim EA, Liaw JC, Loh JP, et al. Molecular identification of coxsackievirus A24 variant, isolated from an outbreak of acute hemorrhagic conjunctivitis in Singapore in 2005. *Arch Virol.* 2007;152(11):2005-16.
213. Park K, Lee K, Lee J, Yeo S, Lee S, Cheon DS, et al. Acute hemorrhagic conjunctivitis epidemic caused by coxsackievirus A24 variants in Korea during 2002-2003. *J Med Virol.* 2006;78(1):91-7.
214. Tavares FN, Campos Rde M, Burlandy FM, Fontella R, de Melo MMM, da Costa EV, et al. Molecular Characterization and Phylogenetic Study of Coxsackievirus A24v Causing Outbreaks of Acute Hemorrhagic Conjunctivitis (AHC) in Brazil. *PloS One.* 2011;6(8).
215. Park SW, Lee CS, Jang HC, Kim EC, Oh MD, Choe KW. Rapid identification of the coxsackievirus A24 variant by molecular serotyping in an outbreak of acute hemorrhagic conjunctivitis. *J Clin Microbiol.* 2005;43(3):1069-71.
216. Lukashev AN. Role of recombination in evolution of enteroviruses. *Rev Med Virol.* 2005;15:157-67.
217. Simmonds P, Welch J. Frequency and dynamics of recombination within different species of human enteroviruses. *J Virol.* 2006;80:483-93.
218. Blomqvist S, Bruu AL, Stenvik M, Hovi T. Characterization of a recombinant type 3/type 2 poliovirus isolated from a healthy vaccinee and containing a chimeric capsid protein vp1. *J Gen Virol.* 2003;84:573-80.
219. Martin J, Samoilovich E, Dunn G, Lackenby A, Feldman E, Heath A et al. Isolation of an intertypic poliovirus capsid recombinant from a child with vaccine-associated paralytic poliomyelitis. *J Virol.* 2002;76:10921-8.
220. Hierholzer JC, Hatch MH. Acute hemorrhagic conjunctivitis. In: Darrell RW, editor. *Viral diseases of the eye.* Philadelphia: Lea & Febiger;1985.165-96.

221. Miyamura K, Yamashita K, Takeda N, Ogino T, Utagawa E, Yamazaki S et al. The first epidemic of acute hemorrhagic conjunctivitis due to a coxsackievirus A24 variant in Okinawa, Japan, in 1985-1986. *Jpn J Med Sci Biol.* 1988;41(4):159-74.
222. Acute hemorrhagic conjunctivitis caused by coxsackievirus A24-Caribbean. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 1987;36(16):245-6, 51.
223. Nabli B, Daghfous T, Kamoun M, Romdhane K. Second epidemic of acute hemorrhagic conjunctivitis in Tunisia. In: Lippincott, editor. *Acta XXIVth Int Conf Ophtalmol.* San Francisco, Philadelphia 1982.212-5.
224. Brandful JA, Takeda N, Yoshii T, Miyamura K, Mingle JA, Addy ET, et al. A study of the evolution of coxsackievirus A24 variant in Ghana by viral RNA fingerprinting analysis. *Res Virol.* 1991;142(1):57-65.
225. Santos Ede O, Macedo, O, Gomes Mde L, Nakauth CM. Acute hemorrhagic conjunctivitis caused by a variant of coxsackievirus A24, in Belem, Para, Brazil, 1987. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 1989;31(3):183-7.
226. Acute hemorrhagic conjunctivitis--Mexico. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 1989;38(18):327-9.
227. Haicl P, Vanista J, Danes L. [Acute hemorrhagic viral conjunctivitis]. *Cesk Oftalmol.* 1992;48(5):349-53. Czech.
228. Triki H, Rezig D, Bahri O, Ben Ayed N, Ben Yahia A, Sadraoui A, et al. Molecular characterisation of a coxsackievirus A24 that caused an outbreak of acute haemorrhagic conjunctivitis, Tunisia 2003. *Clin Microbiol Infect.* 2007;13(2):176-82.
229. Khan A, Sharif S, Shaukat S, Khan S, Zaidi S. An outbreak of acute hemorrhagic conjunctivitis (AHC) caused by coxsackievirus A24 variant in Pakistan. *Virus Res.* 2008;137(1):150-2.
230. Moura FEA, Ribeiro DCS, Gurgel N, da Silva MAC, Tavares FN, Timóteo CNG, et al. Acute haemorrhagic conjunctivitis outbreak in the city of Fortaleza, northeast Brazil. *Br J Ophthalmol.* 2006;90(9):1091-3.
231. Shukla D, Kumar A, Srivastava S, Dhole TN. Molecular identification and phylogenetic study of coxsackievirus A24 variant isolated from an outbreak of acute hemorrhagic conjunctivitis in India in 2010. *Arch Virol.* 2013;158:679-84.
232. ProMED-Mail. 2009 [Available from: <http://www.promedmail.org/>]

233. Christopher S, Theogaraj S, Godbole S, John TJ. An epidemic of acute hemorrhagic conjunctivitis due to coxsackievirus A24. *J Infect Dis.* 1982;146(1):16-9.
234. Goh KT, Ooi PL, Miyamura K, Ogino T, Yamazaki S. Acute haemorrhagic conjunctivitis: seroepidemiology of coxsackievirus A24 variant and enterovirus 70 in Singapore. *J Med Virol.* 1990;31(3):245-7.
235. Yin-Murphy M. Simple tests for the diagnosis of picornavirus epidemic conjunctivitis (acute haemorrhagic conjunctivitis). *Bull World Health Organ.* 1976;54(6):675-9.
236. Aoki K, Sawada H. Long-term observation of neutralization antibody after enterovirus 70 infection. *Jpn J Ophthalmol.* 1992;36(4):465-8.
237. Ishiko H, Takeda N, Miyamura K, Tanimura M, Yamanaka T, Kasuga K, et al. Phylogenetic different strains of a variant of coxsackievirus A24 were repeatedly introduced but discontinued circulating in Japan. *Arch Virol.* 1992;126:179-93.
238. Gonzalez OE, Riera BC, Mas LP. Results of a seroepidemiologic study on epidemic hemorrhagic conjunctivitis in Havana in October 1982. Preliminary report. *Rev Cubana Med Trop.* 1987;39(2):69-86.
239. Hung TP, Kono R. Neurological complications of acute haemorrhagic conjunctivitis (a polio-like syndrome in adults). In: Vinken PJ, Bruyn GW, editor. *Handbook of Clinical Neurology.* 38. Amsterdam: North Holland 1979.595-623.
240. B'Krong N, Minh N, Qui PT, Chau T, Nghia H, Do L, et al. Enterovirus serotypes in patients with central nervous system and respiratory infections in Viet Nam 1997-2010. *Virol J.* 2018;15(1):69.
241. Apostol L, Tomifumi I, Akira S, Yoshifumi M, Socorro L, Remigio O, et al. Genetic diversity and molecular characterization of enteroviruses from sewage-polluted urban and rural rivers in the Philippines. *Virus Genes.* 2012;45:207-17.
242. Tiong Gim Aw, Gin KY. Environmental surveillance and molecular characterization of human enteric viruses in tropical urban wastewaters. *J Appl Microbiol.* 2010;109:716-30.
243. Lourenço J, Tennant W, Faria NR, Walker A, Gupta S, Recker M. Challenges in dengue research: A computational perspective. *Evol Appl.* 2017;11(4):516-33.
244. Grubaugh ND, Saraf S, Gangavarapu K, Watts A, Tan AL, Oidtman RJ, et al. International travelers and genomics uncover a 'hidden' Zika outbreak. 2018; doi: <https://doi.org/10.1101/496901>.

245. Rasmussen DA, Wilkinson E, Vandormael A, Tanser F, Pillay D, Stadler T et al. Tracking external introductions of HIV using phylodynamics reveals a major source of infections in rural KwaZulu-Natal, South Africa. *Virus Evolution*. 2018;4(2).
246. Huang H-W, Chen Y-S, Chen JY-F, Lu P-L, Lin Y-C, Chen B-C, et al. Phylodynamic reconstruction of the spatiotemporal transmission and demographic history of coxsackievirus B2. *BMC Bioinformatics*. 2015;16(1):302.
247. Chu PY, Lu PL, Tsai YL, Hsi E, Yao CY, Chen YH, et al. Spatiotemporal phylogenetic analysis and molecular characterization of coxsackievirus A4. *Infect Genet Evol*. 2011;11:1426-35.
248. Chen P, Li Y, Tao Z, Wang H, Lin X, Liu Y, et al. Evolutionary phylogeography and transmission pattern of echovirus 14: an exploration of spatiotemporal dynamics based on the 26-year acute flaccid paralysis surveillance in Shandong, China. *BMC Genomics*. 2017;18(48).
249. Chu PY, Ke G, Chen YS, Lu PL, Chen HL, Lee MS, et al. Molecular epidemiology of Coxsackievirus B3. *Infect Genet Evol*. 2010;10(6):777-84.
250. Tee K, Lam TT, Chan YF, Bible JM, Kamarulzaman A, Tong CY, et al. Evolutionary genetics of human enterovirus 71: origin, population dynamics, natural selection, and seasonal periodicity of the VP1 gene. *J Virol*. 2010;84(7):3339-50.
251. Miyamura K, Takeda N, Tanimura M, Ogino T, Yamazaki S, Chen CW, et al. Evolutionary study on the Coxsackievirus A 24 variant causing acute hemorrhagic conjunctivitis by oligonucleotide mapping analysis of RNA genome. *Arch Virol*. 1990;114(1-2):37-51.
252. McWilliam Leitch EC, Cabrerizo M, Cardosa J, Harvala H, Ivanova OE, et al. Evolutionary dynamics and temporal/geographical correlates of recombination in the human enterovirus echovirus types 9, 11, and 30. *J Virol Methods*. 2010; 84:9292-300.
253. Henquell C, Mirand A, Richter J, Schuffenecker I, Bottiger B, et al. Phylogenetic patterns of human coxsackievirus B5 arise from population dynamics between two genogroups and reveal evolutionary actors of molecular adaptation and transmission. *J Virol*. 2013; 87(22): 12249-12259.
254. Chen P, Wang, H, Tao Z, Xu A, Lin X, Zhou N, et al. Multiple transmission chains of Coxsackievirus A4 co-circulating in China and neighboring countries in recent

years:Phylogenetic and spatiotemporal analyses based on virological surveillance. *Mol Phylogenet Evol.* 2017;118:23-31.

255. Holmes E. Evolutionary history and phylogeography of human viruses. *Annu Rev Microbiol.* 2008;62:307-28.

256. Leveque N, Amine IL, Cartet G, Hammani AB, Khazraji YC, Lina B, et al. Two outbreaks of acute hemorrhagic conjunctivitis in Africa due to genotype III coxsackievirus A24 variant. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2007;26(3):199-202.

257. Prostova M, Deviatkin A, Tcelykh IO, Lukashev AN and Gmyl AP. Independent evolution of tetraloop in enterovirus oriL replicative element and its putative binding partners in virus protein 3C. *PeerJ.* 2017;5:e3896.

258. Shih S, Chen T, Wu C. Mutations at KFRDI and VGK domains of enterovirus 71 3C protease affect its RNA binding and proteolytic activities. *J Biomed Sci.* 2004;11(2):239-48.

259. Andino R, Rieckhof GE, Trono D, Baltimore D. Substitutions in the protease (3Cpro) gene of poliovirus can suppress a mutation in the 50 noncoding region. *J Virol.* 1990;64(2):607-12.

260. Patick AK. In vitro antiviral activity and single-dose pharmacokinetics in humans of a novel, orally bioavailable inhibitor of human rhinovirus 3C protease. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005;49:2267-75.

261. Baggen J, Hurdiss DL, Zocher G, Mistry N, Roberts RW, Slager JJ, et al. Role of enhanced receptor engagement in the evolution of a pandemic acute hemorrhagic conjunctivitis virus. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2018;115:397-402.

262. Rossmann MG, He Y, Kuhn RJ. Picornavirus-receptor interactions. *Trends Microbiol.* 2002;10:324-31.

263. Higgins PG. Enteroviral conjunctivitis and its neurological complications. *Arch of Virol.* 1982;73:91-101.

264. Mistry N, Inoue H, Jamshidi F, Storm RJ, Oberste MS, Arnberg N. Coxsackievirus A24 variant uses sialic acid-containing O-linked glycoconjugates as cellular receptors on human ocular cells. *J Virol.* 2011;85(21):11283-90.

265. Feachem R, Garelick H, and Slade J. Enteroviruses in the environment. *Trop Dis Bull* 1981;78:185- 230.

265. Dowdle WR and Birmingham ME. The biologic principles of poliovirus eradication. *J Infect Dis.* 1997;175(Suppl 1):S286-92.
266. Romero JR. Reverse-transcription polymerase chain reaction detection of the enteroviruses. *Arch Pathol Lab Med.* 1999;123(1161-1169).
267. MINSAP. Dirección Nacional de Epidemiología M. Actualización del Sistema de Control Sanitario Internacional 2015 [Available from: <http://files.sld.cu/vigilancia/files/2015/06/programa-csi-cuba.pdf>].