

COLABORACIÓN ESPECIAL**PAPEL DEL LABORATORIO NACIONAL DE POLIOVIRUS EN EL PROGRAMA DE ERRADICACIÓN Y VIGILANCIA DE LA POLIOMIELITIS****Gloria Trallero, María Cabrerizo, Ana Avellón y Red de Laboratorios de Vigilancia de Parálisis Flácida Aguda (*).**

Laboratorio Nacional de Poliovirus. Centro Nacional de Microbiología. Instituto de Salud Carlos III. Madrid. España.

(*) Relación de Red de Laboratorios de Vigilancia de Parálisis Flácida Aguda: Aragón (Zaragoza): Manuel Omeñaca. Andalucía (Granada): José M Navarro. Canarias (Las Palmas de Gran Canarias): Carmen Pérez; Castilla y León (Valladolid): Raúl Ortiz de Lejarazú; Cataluña (Barcelona): Nuria Rabella. Comunidad de Madrid (Madrid): Antonio Tenorio. Comunidad Valenciana (Valencia): Beatriz Acosta. Galicia (Vigo, Pontevedra) Isabel López Miragaya. País Vasco (Bilbao) Gurutze Rubio.

RESUMEN

El Laboratorio Nacional de Poliovirus (LNP) coordina la Red Española de Vigilancia de Parálisis Flácida Aguda desde 1998 y caracteriza los poliovirus (PV) y otros enterovirus detectados, utilizando métodos de cultivo celular y moleculares.

Durante 1998-2012 se estudiaron por la Red un total de 110.725 (70.046+40.679) muestras clínicas, resultando positivas para enterovirus 8.804 (8%), entre las que 241 se caracterizaron como PV. La caracterización intratípica demostró que todos los PV eran vacunales excepto las muestras correspondientes a un caso importado de poliomiélitis postvacunal y sus contactos, que fueron caracterizados como PV2 derivado de vacuna.

En el LNP se ha realizado el serotipado y la caracterización intratípica de todos los PV aislados en España de cualquier síndrome. Con ello se ha demostrado que el PV salvaje no ha circulado en nuestro país durante los 15 años que recoge este trabajo y eso condujo a la firma del Acta de la "Erradicación de la Poliomiélitis en España" por parte de la OMS en 2001 y a la "Certificación de la Erradicación Europea como libre de circulación de PV salvaje" el 21 de junio de 2002.

En la actualidad sólo 3 países presentan transmisión endémica de PV salvaje (Pakistán, Afganistán y Nigeria) y hasta que no se haya conseguido la erradicación a nivel mundial, España debe mantener la infraestructura creada en el Plan de Erradicación de la Poliomiélitis y continuar con la vigilancia e inmunización. También el Programa de Contención de los PV salvajes en los laboratorios debe seguir en activo para evitar reintroducciones accidentales.

Palabras clave: Poliovirus. Poliomiélitis. Vacuna antipolio oral. Vacuna antipolio de virus inactivados. Parálisis flácida aguda. Erradicación de la enfermedad.

Correspondencia

Gloria Trallero
Laboratorio Nacional de Poliovirus y Unidad de Enterovirus
Área de Virología
Centro Nacional de Microbiología
Instituto de Salud Carlos III
Crta Majadahonda-Pozuelo Km.2
Majadahonda 28220
gtralle@isciii.es

ABSTRACT**Role of the National Poliovirus Laboratory for the Program of Eradication and Poliomyelitis Surveillance**

The Spanish acute flaccid paralysis surveillance network is coordinated by the National Poliovirus Laboratory (NPL), which, since 1998, carries out polioviruses (PV) and other enteroviruses detected characterization by cell culture and molecular techniques.

A total of 110,725 (70,046+40,679) samples were studied between 1998-2012 and enteroviruses were detected in 8% of these. Among these enteroviruses 241 PV were characterized as PV Sabin-like, except samples belong to an imported poliomyelitis case, all of which were characterised as vaccine derived PV type 2.

The NPL has carried out the serotyping and the intratypic differentiation of all the isolated PV in Spain of any syndrome. It is shown that wild PV has not circulated in our country during the 15 years studied and that has led to the signing of the Act of the "eradication of poliomyelitis in Spain" by WHO in 2001, and the "certification of the eradication of wild PV free for European countries on 21 June 2002.

Currently only 3 countries have endemic transmission of wild PV (Pakistan, Afghanistan and Nigeria). Until a complete worldwide eradication, was achieved, Spain will actively continue to participate in the maintenance of the poliomyelitis eradication infrastructure by monitoring and vaccination as well as the wild PV containment plan to avoid the spread of wild PV.

Key words: Poliovirus. Poliomyelitis. Disease eradication. Poliovirus vaccine, oral. Poliovirus vaccine, inactivated. Health planning. Public health surveillance.

INTRODUCCIÓN

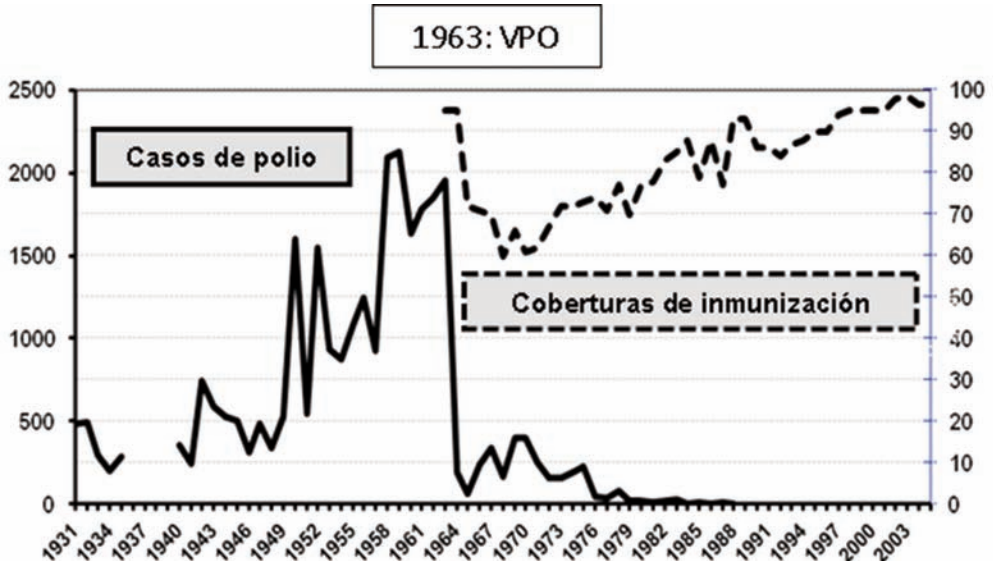
La poliomielitis es una infección causada por los Poliovirus (PV) serotipos 1, 2 o 3 [familia *Picornaviridae*, genero enterovirus humanos (EV)] que puede afectar de forma grave al sistema nervioso central, con la destrucción de las neuronas motoras de la médula espinal causando una parálisis flácida aguda (PFA). Los tres serotipos pueden provocar parálisis, pero el PV1 lo hace con mayor frecuencia (la mayoría de las epidemias que se han producido en todo el mundo se deben a él) seguido del PV3, aunque en menor medida. El tipo 2 está considerado actualmente como erradicado a nivel mundial. Además de los casos por PV salvajes, la vacuna oral atenuada trivalente (VPO) puede producir poliomielitis aunque de forma muy ocasional. Los casos relacionados con la vacuna generalmente son producidos por los tipos 2 o 3^{1,2}.

Existen 2 tipos de vacuna, la vacuna inactivada (VPI) desarrollada en 1954 por Jonas Salk y Julius S Youngner, y la atenuada VPO desarrollada por Albert Sabin

en 1957, que consiguió la atenuación de los 3 PV por pases sucesivos en cultivos de riñón de mono y segregación de las cepas atenuadas.

En España, el iniciador de los estudios sobre la epidemiología de la poliomielitis con base de laboratorio virológico fue Florencio Pérez Gallardo³. Entre 1962 y 1965 realizó los estudios epidemiológicos, virológicos, e inmunológicos de la enfermedad en España⁴ con un grupo de colaboradores. Asimismo, Pérez Gallardo fue el promotor de las campañas de vacunación en nuestro país, con un estudio piloto en 2 provincias que comenzó en mayo de 1963⁵. En aquel momento se escogió la VPO de Sabin frente a la VPI por su bajo coste, por su facilidad de administración y por producir inmunidad de grupo. Estas campañas dieron como resultado una caída espectacular de la incidencia de la polio en nuestro país, pasando de 2.000 casos anuales en 1962 a 30 casos en 1976, como se puede observar en la figura 1. Fue en 1976, cuando ya

Figura 1
Situación en España, antes y después de la introducción de la vacuna antipoliomielítica oral atenuada (VPO)



existía el Centro Nacional de Microbiología, Virología e Inmunología Sanitarias, hoy Centro Nacional de Microbiología del Instituto de Salud Carlos III, cuando Ascensión Bernal realizó los estudios sobre epidemiología molecular del virus de la polio en España, con la evolución de la poliomiélitis desde 1976 a 1984⁶. Parte de estos estudios se reflejan en la figura 2.

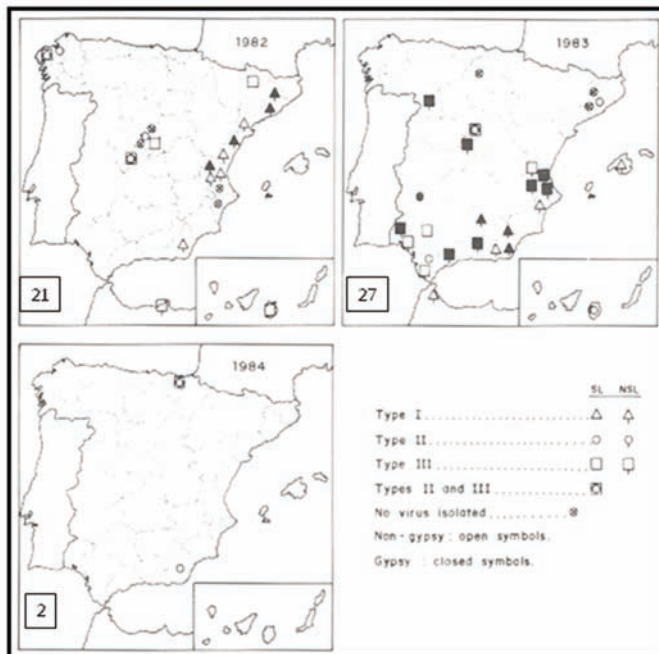
En mayo de 1988, durante la reunión anual de la Organización Mundial de la Salud (OMS) en Ginebra, se diseñó un plan para conseguir la erradicación de la poliomiélitis en el mundo. Sus actuaciones fueron las siguientes: a) Implantación de un sistema de vigilancia eficaz de la PFA en menores de 15 años, para demostrar la interrupción de la circulación de PV salvaje; b) Alcance y mantenimiento alto de coberturas de vacunación; c) Organización de un sistema de vigilancia ambiental de

EV; d) Realización de estudios seroepidemiológicos que valorasen el estado inmunitario de la población frente al virus de la poliomiélitis y, por último, e) La búsqueda y control de PV salvajes almacenados en los laboratorios. En 1990, durante la Tercera Reunión del Grupo Consultivo de Erradicación de la Poliomiélitis se fijaron los Criterios para declarar a un país libre de poliomiélitis indígena⁷⁻⁹.

En la actualidad, sólo 3 países presentan transmisión endémica de PV salvaje (Paquistán, Afganistán y Nigeria), donde la enfermedad afecta a los niños principalmente durante el primer año de vida¹⁰.

La vigilancia de la poliomiélitis en España se realiza desde comienzos del siglo XX, los últimos casos autóctonos se declararon en el brote de Andalucía en 1987-1988, en una población marginal no vacu-

Figura 2
Caracterización intratípica y distribución por serotipo de casos de poliomiélitis año, 1982,1983 y 1984



nada y en 1989 se declaró el último caso de poliomielitis importado producido por un virus polio salvaje. Pero fue en 1997 cuando en España el Ministerio de Sanidad y Consumo elaboró el “Plan de actuaciones necesarias para la consecución del certificado de erradicación de la poliomielitis”¹¹, con los siguientes objetivos: a) Alcanzar y mantener altas coberturas de inmunización, b) Implantar y mantener sistemas eficaces de vigilancia de las infecciones por PV y otros EV, c) Reducir al mínimo el riesgo de transmisión de virus polio de importación y d) Tomar medidas especiales en el caso de detectarse un PV de importación. Finalmente, en 1998 se implementó el Primer Plan de Erradicación de la Poliomielitis en España (PEP). Para llevarlo a cabo dicho plan se estableció un grupo de trabajo del PEP y se creó un flujo de trabajo y comunicación (figura 3). Para ello se designó al laboratorio de EV del Centro Nacional de Microbiología del Instituto de Salud Car-

los III como Laboratorio Nacional de Poliovirus (LNP) en España ante la Organización Mundial de la Salud (OMS).

Desde aquel momento hasta nuestros días, el LNP es el responsable de la vigilancia de PFA en menores de 15 años y de otros EV, con el objeto de confirmar la ausencia de PV salvaje en nuestro país

Este trabajo presenta un resumen de los datos del LNP durante los 15 años de la existencia del PEP.

MATERIALES Y MÉTODOS

En 1997 la OMS acreditó al laboratorio de enterovirus del CNM como LNP en España, el programa de acreditación incluyó controles de calidad, revisión de procedimientos y uso de indicadores estándares, el laboratorio ha sido acreditado cada año.

Figura 3
Esquema de coordinación en España de la vigilancia de Parálisis Flácida Aguda y de enterovirus.



- Vigilancia del Plan de Erradicación de la Poliomielitis en España. En 1998 se constituyó la Red de Laboratorios para el Plan de Erradicación de la Poliomielitis de Vigilancia de PFA (RLPEP). Estaba constituida por 9 laboratorios distribuidos por todo el territorio nacional y coordinada por el LNP^{11,12}. Desde 1999 hasta la actualidad, los sistemas de vigilancia se han visto reforzados por los datos de aislamientos y detección de EV en otros síndromes respiratorios o neurológicos, principalmente los aislamientos procedentes de brotes de meningitis aséptica aportados por la red al LNP.

- Entre las responsabilidades del LNP se encuentran las de analizar todos los datos recibidos y caracterizar los aislados que, atendiendo a las recomendaciones de la OMS (apartado 5.2 del Documento EUR/ICP/CMDS 030113), utiliza tanto los métodos tradicionales como nuevos métodos moleculares que permiten (i) la confirmación de resultados y (ii) la detección y caracterización de PV y otros EV, incluso en muestras con cantidades que no son detectables por los tradicionales cultivos celulares, mediante las siguientes técnicas:

a. Serotipado de los EV no polio, mediante técnicas de microneutralización usando las mezclas de antisueros de Melnick y/o tipificación molecular mediante la amplificación, secuenciación y estudio del extremo 3 del gen VP1^{13,14}.

b. Serotipado de los PV mediante neutralización con antisueros policlonales combinados en cuatro grupos para identificar las mezclas de PV (RIVM pools, *National Institute of Public Health and the Environment*, Países Bajos).

c. Caracterización intratípica de PV para diferenciar las cepas vacunales de las salvajes mediante la retrotranscripción seguida de reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) específica para PV vacunal¹⁵.

d. Técnicas complementarias en caso de detección de PV vacunales asociados a parálisis, como son la determinación de la carga viral y la secuenciación completa del genoma con el objetivo de identificar: a) PV derivados de vacuna, con una homología en el gen VP1 menor del 99% con respecto a la cepa vacunal, b) mutaciones en la región 5' no-codificante o en otras regiones del genoma asociadas a neurovirulencia¹⁶ y c) recombinación¹⁶.

Además en el LNP se realiza una vigilancia ambiental suplementaria, mediante el estudio de muestras de agua potable y agua residual en varios puntos de muestreo de la Comunidad de Madrid, por lo que el sistema de implementación se encuentra disponible en caso necesario.

Todos estos aspectos engloban la vigilancia recomendada por la OMS

RESULTADOS

Durante el período de estudio se pueden diferenciar dos etapas, la primera de 1998 a 2005, correspondería a los años donde había circulación de PV vacunales en nuestro país, y la segunda de 2006 a 2012, en la que ya no existe la circulación de PV.

En la tabla 1 se pueden observar las muestras estudiadas en la 1ª etapa. El total de muestras fue de 70.046 con un total de 5.922 aislamientos de EV, lo que representa un rendimiento del 8,5%. El año en el cual se estudiaron mayor número de muestras fue el 2000, correspondiente a un año epidémico con gran número de casos de meningitis, los años con mayor rendimiento de EV fueron 2000 y 2001.

El total de muestras estudiadas en cultivos celulares en el segundo periodo

Tabla 1
Muestras estudiadas en cultivos celulares por la Red de laboratorios: aislamientos de enterovirus (EV) y Poliovirus (PV) obtenidos. Periodo 1998-2005 (circulación de PVs vacunal)

AÑO	Muestras estudiadas	EV	PV	Rendimiento (%)
1998	9.588	368	9	3,8
1999	8113	601	10	7,4
2000	11.383	1.590	16	13,9
2001	8.573	1.132	58	13,2
2002	8.583	784	52	6,7
2003	8.293	519	51	6,2
2004	8.181	421	12	5,1
2005	7.332	507	16	6,9
total	70.046	5.922	224	8,5

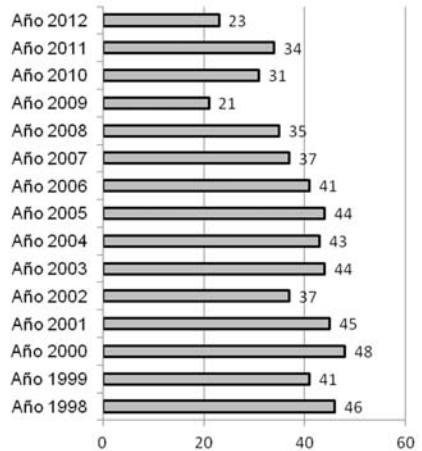
fue de 40.679, de las cuales 2.882 fueron positivas a EV (7,1%) (tabla 2).

Todas las muestras estudiadas procedían de casos de PFA o con otros síndromes compatibles con una infección por EV. El total de casos de PFA declarados en los 15 años fue de 570 (figura 4).

Tabla 2
Muestras estudiadas en cultivos celulares por la Red de laboratorios: aislamientos de enterovirus (EV) y Poliovirus (PV) obtenidos. Periodo 2006-2012 (no circulación de PV vacunal)

AÑO	Muestras estudiadas	EV	PV PFA0712	Rendimiento (%)
2006	8.274	783	3	9,5
2007	8.084	532	0	6,6
2008	6.063	425	0	7,0
2009	5.073	264	0	5,2
2010	4.611	275	0	6,0
2011	5.032	266	0	5,3
2012	3.542	337	0	9,5
total	40.679	2.882	3	7,1

Figura 4
Número de casos de Parálisis Flácida Aguda declarados por año



Tipificación y caracterización intratípica de PV

En la tabla 3 se representan todos los PV aislados por los laboratorios de la LRPEP en los 8 primeros años de la vigilancia, tanto de casos de PFA como de otros síndromes. En los primeros meses de 2004 se aislaron los últimos PV caracterizados como Sabin Like (7 PV1 y 3 PV2), provenientes de otros síndromes distintos de PFA.

En el año 2005 y 2006, todos los PV aislados (16, y 3) respectivamente correspondieron a un caso de PFA en un niño marroquí de 14 meses de edad con inmunodeficiencia HLA II, que presentaba un cuadro de tetraparesia. El niño residió en Marruecos hasta los 6 meses de vida y allí recibió dos dosis de vacuna antipliomielítica oral atenuada a los 2 y 4 meses. Los aislados se obtuvieron de 10 muestras de heces consecutivas del niño y de tres de sus contactos. El estudio virológico del caso por técnicas moleculares y de cultivos celulares demostró un PV2 caracterizándose como derivado de vacuna (iVDPV) al tener una homología en VP1 menor del 99%

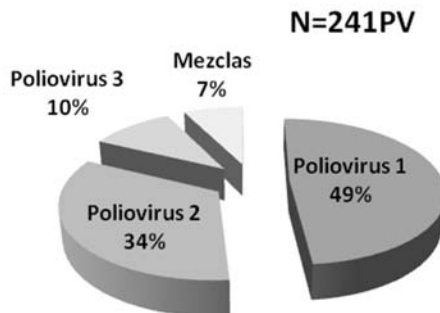
Tabla 3
Poliovirus (PV) detectados en casos de PFA y otros síndromes, distribuidos por serotipo y año (años 1998-2005)

AÑO	Síndrome	PV1	PV2	PV3	Mezcla	Total PV
1998	PFA caso	0	0	0	0	0
	PFA caso	1	0	1	0	2
	Otros síndromes	7	0	0	0	7
1999	PFA caso	2	0	2	0	4
	PFA caso	0	0	0	0	0
	Otros síndromes	4	1	1	0	6
2000	PFA caso	0	0	0	0	0
	PFA caso	0	0	0	0	0
	Otros síndromes	5	9	0	2	16
2001	PFA caso	0	4	0	0	4
	PFA caso	0	0	1	1	2
	Otros síndromes	26	18	5	3	52
2002	PFA caso	0	0	0	0	0
	PFA caso	0	0	0	0	2
	Otros síndromes	25	17	6	2	50
2003	PFA caso	0	0	0	0	0
	PFA caso	0	0	0	0	0
	Otros síndromes	24	9	8	10	51
2004	PFA caso	0	0	0	0	0
	PFA caso	2	0	0	0	2
	Otros síndromes	7	3	0	0	10
2005	PFA caso	0	9	0	0	9
	PFA caso	0	7	0	0	7
	Otros síndromes	0	0	0	0	0
total serotipos		105	77	24	18	224

respecto a la cepa vacunal, también se encontraron en todas las muestras positivas (caso y contactos) dos sitios no contiguos de recombinación con PV1 tipo Sabin en la zona no estructural del genoma¹⁷.

Desde el año 2007 no se ha detectado ningún PV, dato que está en concordancia con el uso de la vacuna inactivada, que está incluida en el calendario vacunal en todo el territorio nacional desde 2004.

Figura 5
Distribución de poliovirus por serotipo en 15 años de estudio (1998-2012)



Otros 14 PV fueron aislados en la primera etapa por laboratorios no pertenecientes a la LRPEP. Por lo que el total de PV aislados durante los 15 años fue de 241. El 49% se aislaron de heces y el 51% de exudados faríngeos. El 33% de pacientes con síndromes respiratorios y el 26% en pacientes con fiebre. El 80% correspondió a niños menores de 1 año. En todos los casos los PV se caracterizaron como vacunales excepto en el caso procedente de Marruecos. En la figura 5 se representa la distribución de estos 241 PV por serotipos.

DISCUSIÓN

España se encuentra libre de poliomieltis desde que se notificaron los últimos casos autóctonos ocurridos en un brote en Andalucía en 1987 y 1988 el cual afectó a población marginal no vacunada. En 1989 se produjo un caso importado de Mauritania. Los últimos casos de poliomieltis asociados a la vacuna VPO se produjeron entre 1995 y 2001 en Barcelona, Murcia y Bilbao y en 2005 en un lactante inmunodeprimido de 6 meses que había recibido la VPO en su país de origen (Marruecos) se caracterizó un PV derivado de vacuna¹⁷.

En el LNP se ha realizado el serotipado y la caracterización intratípica de todos los PV aislados en España de cualquier síndrome, con ello se ha confirmado que el

PV salvaje no ha circulado en nuestro país durante los 15 años que recoge este trabajo^{18,19}, lo que ha conducido a la firma del Acta de la “Erradicación de la Poliomielitis en España” por parte de la OMS en 2001, y el 21 de junio de 2002 a la “Certificación de la Erradicación Europea como libre de circulación de PV salvaje”. En nuestro país es difícil mantener la sensibilidad del sistema de vigilancia de PFA dada la ausencia de casos de PV salvaje desde 1988, lo que puede hacer creer que ya no hay riesgo de poliomielitis. Sin embargo, mientras no sea erradicada a nivel mundial, existe un riesgo de importación de PV que no se puede menospreciar. España es un país que puede ser considerado de riesgo para la importación por el flujo constante de personas a través de las fronteras, el aumento creciente de población inmigrante procedente de países con diferentes niveles de cobertura vacunal, así como el aumento de situaciones que favorecen el desarrollo de la enfermedad (inmunodeficiencias), puesto que en nuestro país en junio de 2004 se cambió la política de vacunación pasando de VPO a VPI, cualquier aislamiento de PV debe ser considerado como sospechoso de ser un PV salvaje o derivado de vacuna y ser caracterizado en profundidad como así ocurrió con el caso del 2005. En este caso gracias a las altas coberturas de vacunación y al correcto funcionamiento de la red de vigilancia se pudo controlar el caso y no se propagó a la comunidad

Los tres objetivos principales para conservar la certificación en España son: 1º) mantener las coberturas de vacunación por encima del 90%; 2º) mantener activo un sistema de vigilancia con una alta sensibilidad y 3º) asegurar una adecuada contención de PV salvaje en los laboratorios. En estos dos últimos objetivos ha estado directamente implicado el LNP durante los últimos 16 años²⁰. Estos objetivos deben seguir cumpliéndose hasta que se haya conseguido la erradicación a nivel mundial. Hoy en día, sólo 3 países presentan

transmisión endémica de PV salvaje (Paquistán, Afganistán y Nigeria), en los últimos años se están produciendo brotes activos importantes en países no-endémicos, como el declarado este mismo año 2013 en los países del cuerno de África producido por PV1 salvaje con casi 200 casos reportados hasta septiembre (Somalia 174, Kenia 14, Etiopía 3, Sudán del sur 3)¹⁰. Para conseguir finalmente la erradicación de la poliomielitis en el mundo y su mantenimiento posterior se necesita no sólo vacunar con eficacia y rapidez sino diseñar y aplicar todas aquellas herramientas que el actual conocimiento científico nos permite así como perseverar.

AGRADECIMIENTOS

Los autores quieren agradecer a Isidoro Bustillo, Teresa de Miguel, Hortensia del Pozo, Purificación Higuera y Almudena Otero la asistencia técnica prestada.

BIBLIOGRAFIA

1. Strebel PM, Sutter RW, Cochi SL y col. Epidemiology of poliomyelitis in the United States one decade after the last reported case of indigenous wild virus associated disease. *Clin Infect Dis*. 14:568-79.
2. Kew OM, Sutter RW, de Gourville EM, Dowdle WR, Pallansch MA. Vaccine-derived PVes and the endgame strategy for global polio eradication. *Annu Rev Microbiol*. 2005;59:587-635
3. Pérez Gallardo F. Epidemiología de la poliomielitis en España. Aislamiento de virus poliomiélico y otros enterovirus. *Rev Sanid Hig Pública*. 1962; Dic:1-14.
4. Pérez Gallardo F, Nájera Morondo E, Ruiz Falcó F. Epidemiología de la poliomielitis en España. *Rev Sanid Hig Pública*. 1963; Ene-Feb.
5. Pérez Gallardo F, Vega Villalonga J, Pérez Mel J, López Villalba L, Nájera Morondo R. Campaña piloto de vacunación antipoliomiélica por vía oral. *Rev Sanid Hig Pública*. 1964; :
6. Bernal A, García-Sáiz A, Llácer A, de Ory F, Tello O, Nájera R. Poliomyelitis in Spain, 1982-1984: virologic and epidemiologic studies. *Am J Epidemiol*. 1987; 126 (1): 69-76.

7. Henderson RH. The World Health Organization's plan of action for global eradication of poliomyelitis by the year 2000. *Ann N Y Acad Sci.* 1989;569:69-85.
8. Laboratory support for poliomyelitis eradication: Memorandum from a WHO meeting. *Bull World Health Organ.* 1989;67:365-7.
9. Erradicación de la poliomiélitis: Informe de la 1ª reunión de la Comisión regional Europea de certificación de la erradicación de la poliomiélitis. París: Comisión Regional Europea de certificación de la erradicación de la poliomiélitis;1996.
10. Global Polio Eradication Initiative. Wild Poliovirus cases as of 01 October 2013 (Internet) Disponible en: <http://www.polioeradication.org/dataandmonitoring/Poliowhiskweek.aspx>
11. Ministerio de Sanidad y Consumo. Plan de actuaciones necesarias para la consecución del certificado de erradicación de la poliomiélitis. Madrid: Ministerio de Sanidad y Consumo; 1997.
12. Trallero G, Avellón A, Otero A, de Miguel T, Alonso M, Pérez-Breña P; Red de Laboratorios de Vigilancia de Parálisis Flácida Aguda. Laboratory Network within the Polio Eradication Initiative (1998-2003): six years of surveillance for acute flaccid paralysis in Spain. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2006 Mar;24(3):167-72
13. Melnick JL, Wimberly IL. Lyophilised combination pools of EV equine antiserum New LBM pools prepared from reserves of antiserum stored frozen for two decades. *Bull World Health Organ.* 1985; 63: 543-550.
14. Casas I, Palacios GF, Trallero G, Cisterna D, Freire MC, Tenorio A. Molecular characterization of human EVs in clinical samples: comparison between VP2, VP1, and RNA polymerase regions using RT nested PCR assays and direct sequencing of products. *J Med Virol.* 2001 Sep;65(1):138-48.
15. Yang CF, De L, Holloway BP, Pallansch MA, Kew OM. Detection and identification of vaccine-related PVs by the polymerase chain reaction. *Virus Res.* 1991 Jul;20(2):159-79.
16. Kew O, Morris-Glasgow V, Landaverde M y col. Outbreak of poliomyelitis in Hispaniola associated with circulating type 1 vaccine-derived PV. *Science.* 2002 Apr 12;296(5566):356-9
17. Avellón A, Cabrerizo M, de-Miguel T, Pérez-Breña P, Tenorio A, Pérez JL, Martínez-de-Aragón MV, Trallero G. Paralysis Case and Contact Spread of Recombinant Vaccine-derived Poliovirus, Spain. *Emerg Infect Dis.* 2008 Nov; 14(11):1807-9.
18. Trallero G, et al. Enteroviruses in Spain over the decade 1998–2007: Virological and epidemiological studies. *J Clin Virol.* 2010 Feb; 47(2):170-6.
19. Cabrerizo M, Echevarría JE, González I, de Miguel T, Trallero G. Molecular epidemiological study of HEV-B enteroviruses involved in the increase in meningitis cases occurred in Spain during 2006. *J Med Virol.* 2008 Jun; 80(6):1018-24.
20. Avellón A, Trallero G, Merino B, Pachón I, Sanz C, Pérez-Breña P. Poliomyelitis eradication initiative. Search for and control of wild poliovirus stored at Spanish laboratories. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2004;22 (2):77-82