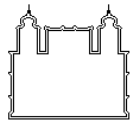




Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde
Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária



Gina Peres Lima dos Santos

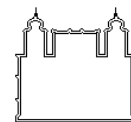
**ESTUDO DA FREQUÊNCIA DE ENTEROVÍRUS ASSOCIADOS A
SURTOS E CASOS ESPORÁDICOS DE MENINGITE VIRAL
OCORRIDOS NO BRASIL, NO PERÍODO DE DEZEMBRO DE 1998
A DEZEMBRO DE 2003, E ANÁLISE DO PERFIL DOS PACIENTES.**

Orientação: Dr. Edson Elias da Silva

Laboratório de Enterovírus – IOC – FIOCRUZ

Rio de Janeiro

Julho – 2005



**ESTUDO DA FREQUÊNCIA DE ENTEROVÍRUS ASSOCIADOS A
SURTOS E CASOS ESPORÁDICOS DE MENINGITE VIRAL
OCORRIDOS NO BRASIL, NO PERÍODO DE DEZEMBRO DE 1998
A DEZEMBRO DE 2003, E ANÁLISE DO PERFIL DOS PACIENTES.**

Por

Gina Peres Lima dos Santos

Dissertação apresentada à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em
Vigilância Sanitária do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde
– INCQS / FIOCRUZ, como requisito para a obtenção do grau de
Mestre em Ciências na Área de Vigilância Sanitária.

Orientação: Dr. Edson Elias da Silva

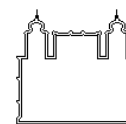
Laboratório de Enterovírus – IOC – FIOCRUZ

Rio de Janeiro

Julho – 2005



Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde
Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária



Esta Dissertação de Mestrado, intitulada:

**ESTUDO DA FREQUÊNCIA DE ENTEROVÍRUS ASSOCIADOS A
SURTOS E CASOS ESPORÁDICOS DE MENINGITE VIRAL
OCORRIDOS NO BRASIL, NO PERÍODO DE DEZEMBRO DE 1998
A DEZEMBRO DE 2003, E ANÁLISE DO PERFIL DOS PACIENTES,**

Apresentada por

Gina Peres Lima dos Santos

Foi avaliada e aprovada, em ____ / ____ /2005, pela Banca Examinadora,
da qual fizeram parte:

Dr. Edson Elias da Silva (Orientador) _____
IOC - FIOCRUZ

Dra. Paola Cardarelli Leite _____
INCQS - FIOCRUZ

Dra. Norma Suely de Oliveira Santos _____
IMPPG - UFRJ

Dr. Victor Augustus Marin (Suplente) _____
INCQS - FIOCRUZ

Rio de Janeiro

Julho – 2005

Ficha Catalográfica

Santos, Gina Peres Lima

Estudo da frequência de enterovírus associados a surtos e casos esporádicos de meningite viral ocorridos no Brasil, no período de dezembro de 1998 a dezembro de 2003, e análise do perfil dos pacientes. / Gina Peres Lima dos Santos. Rio de Janeiro: INCQS / FIOCRUZ, 2005.

xvii, 100p., il. color. tab. fot. gráf.

Dissertação em Vigilância Sanitária, Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária / INCQS, 2005. Orientador: Edson Elias da Silva.

1. Echovírus 30. 2. RT-PCR. 3. Sequenciamento Nucleotídico. 4. Vigilância em Saúde.

I. Título.

*Aos meus Pais, que me deram a vida,
e a enchem a cada dia de amor e alegrias. A
vocês, que dedicaram a mim e a meus irmãos
sua própria vida, seu tempo, seu amor e tudo
mais, dedico este meu trabalho.*

*E aos meus irmãos, meus queridinhos
Junior e Vivian, por toda nossa vida juntos,
pela convivência e paciência comigo sempre.*

O diálogo entre uma freira cuidando de pacientes terminais com hanseníase e um milionário texano. O milionário, vendo-a tratar daqueles doentes, disse: "Freira, eu não faria isso por dinheiro nenhum no mundo". E ela respondeu: "Eu também não, meu filho".

Nizan Guanaes

AGRADECIMENTOS

AGRADECIMENTOS

Ao agradecer aqueles que, de alguma maneira, colaboraram comigo nessa caminhada, é preciso contar com a memória e com a emoção, que costumam deixar a gente na mão justamente nessas horas. Então, orgulhosamente, tenho muito prazer em agradecer a TODOS que estiveram comigo não somente no mestrado, ou na dissertação, mas em todos os meus momentos, contribuindo, com certeza, com a formação do meu caráter e personalidade.

☺ Deus, obrigada! Obrigada pelos meus pais, responsáveis pelo início dessa minha vida, por meus irmãos e familiares, que vivem suas vidas junto com a minha, e por meus amigos, cujas vidas se cruzam com a minha. Obrigada pelo nosso irmão mais velho, Jesus, que me serve de exemplo em todos os instantes. Obrigada pela alegria, disposição e bom senso que me destes, características muito úteis à realização de um trabalho como este. Obrigada por tudo, enfim!

☺ Ao meu Orientador, Dr. Edson, por ter respondido ao meu e-mail, quando pedi para conhecer seu laboratório. Um ato tão simples, a princípio, mas que possibilitou, para mim, muito aprendizado acerca da Virologia e da Biologia Molecular. Muito obrigada por todo incentivo e ensinamentos sem fim, pelas conversas inteligentes e bem-humoradas e pela confiança para a realização deste trabalho.

☺ À Eliane, minha querida conselheira, amiga, por todos os maravilhosos dias de trabalho, pela incansável disposição em ajudar e ensinar e pelas conversas no Laboratório. Obrigada[∞]!

☺ À Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária do INCQS, pela oportunidade de ingressar no Mestrado. Às secretárias, Simone, Gisele e Ana, que são verdadeiras abelhinhas-operárias, muito eficientes e organizadas. E a “abelhinha-rainha”, Maria Helena, que é uma gracinha. E a todos os professores do Programa, incluindo a ex-coordenadora Teresa Santos, pelo apoio, pelas aulas e esclarecimentos dados ao longo desses dois longos anos.

☺ Aqueles que fizeram muito felizes meus dias no Laboratório de Enterovirus, tornando a gigantesca carga de trabalho e responsabilidade de todos, muito mais leve de carregar. Dr. Edson, Dra. Eliane, Jujú, Érika, Fernando, Cátia, Rosane, Ana Carolina, Michelona, Michelinha, Silas, Lú, Rafa, Aline I e Aline II, Renatinha, Paula, Dolcy, Lenise, Joseane, Júlia, Carina, Bianca, Juliana, Raquel, Gustavo. Gente, muito obrigada pela amizade, carinho, convivência tranquila, pelas dicas e por toda a ajuda em todas as fases deste trabalho.

☺ A meus avós, tios, primos e afilhadinhos, que proporcionam os melhores momentos de minha vida, e estão comigo em todos os outros. Agradeço novamente por não lhe faltarem palavras de estímulo e por serem essa fonte eterna de alegria, energia e amor.

☺ À minha madrinha Lili, que sempre me incentivou a estudar. Muito obrigada pelo amor e carinho sempre demonstrados em todas as fases de minha vida.

☺ À Congregação Espírita João Evangelista, e a seu grupo de mocidade, que me acompanham desde que me entendo por gente, e que colaboram para minha formação religiosa e social. Dum Dum, Aline, Hugo, Nilton, Tayanna, Chiquinho (e Clarinha), Teresa, Juliana, Carol, Léo, Cláudio, Márcia, Claudinha, Andréa, Keila, Rafaelzinho, Humberto, Haryston, Jana, Samir, Jennifer, Fábio, Alessandra, Paulo e Paula (e Gustavo), vocês fazem parte da minha vida e da minha família. E não vão sair dela nunca.

☺ Aos meus amigos e companheiros de jornada, que são muitos, muitos mesmo, dos mais variados lugares e épocas. Michele, Lilian (amigas de infância), Israel (amigo da família), Fred (8ª série), Cris (e Lelê), Priscila, Elaine, Ana Paula, Jane, André, Higor, Paula (ETEJK), Alina, Adrini (Irmã Clara), Nicole, Val, Adriana, Karina, Átila (Miguel Couto), Jú (e Luccas), Paulista, Lilás, Carol, Vanessa, Ulisses (UNIRIO), Rosa, Vera, Rosana, Marcia (Lab UFRJ), Márcia Sarpa, Bira, Marília, Aline, Luciane, Luciana, Márcia, Sandro, Sônia, Cristina, Marco (INCQS), Cíntia, Neide, Dione, Silvia, Natércia (Dança). Meus amores, obrigada por cada palavra de carinho, pelas risadas, pelas lágrimas, pela compreensão nos momentos de ausência, pelas histórias autênticas, hilárias e inesquecíveis que vivemos juntos, e por saber q posso contar com vocês para tudo. Saibam que seus lugares no meu coração são cativos.

♥♥ Ao meu namorado Vinicius. Fico muito feliz em dizer que você é meu último namorado. *“Demorei muito pra te (re)encontrar, agora quero só você, seu jeito todo especial de ser, fico louca com você. Te abraço e sinto coisas que eu não sei dizer, só sinto com você, meu pensamento voa de encontro ao seu”*. Muito obrigada por todo amor e dedicação, mesmo com essa distância chata, ainda que temporária. Te Adoro!

☺ Aos pacientes envolvidos neste trabalho, primordiais à sua realização.

\$\$\$ À CAPES, pelo apoio financeiro concedido.

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Enterovírus do Departamento de Virologia, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz – Rio de Janeiro, sob a orientação do Dr. Edson Elias da Silva e apoio financeiro da CAPES, FIOCRUZ e SVS/MS.

RESUMO

Infecções virais agudas do Sistema Nervoso Central (SNC), como as meningites e encefalites, são responsáveis por uma elevada morbidade, especialmente em crianças. Os enterovírus não-polio (EVNP) são responsáveis por mais de 80% dos casos de meningite viral em que o agente etiológico é identificado. No presente estudo nós mostramos a frequência de ocorrência de enterovírus em surtos e casos esporádicos de meningite viral no Brasil no período de dezembro de 1998 a dezembro de 2003. Das 1022 amostras de Líquido Cefalorraquidiano (LCR) analisadas pelo Laboratório de Enterovírus – FIOCRUZ, 162 (162/1022 - 15,85%) apresentaram isolamento viral em culturas de células RD e/ou HEp2. Destas, 139 (139/163 - 85,27%) foram identificadas por sequenciamento genômico parcial como echovírus 30. Outros enterovírus identificados foram: coxsackievírus B5 (6/162 - 3,70%), echovírus 13 (6/162 - 3,70%), echovírus 18 (5/162 - 3,08%), echovírus 6 (2/162 - 1,23%), echovírus 25 (2/162 - 1,23%), echovírus 1 (1/162 - 0,61%) e echovírus 4 (1/162 - 0,61%). A idade dos pacientes variou de 28 dias de vida a 68 anos. Os sintomas mais frequentes foram febre (77,00%), cefaléia (69,51%), ânsia de vômito (71,30%), rigidez na nuca (41,35%), convulsão (7,13%) e diarreia (3,74%). Durante o período de estudo, cinco surtos de meningite viral foram identificados e confirmados, sendo três no estado do Paraná (sul do Brasil), um em Pernambuco (nordeste do Brasil) e um no Rio Grande do Sul (sul do Brasil). Echovirus 30 causou quatro dos cinco surtos, e echovírus 13 foi responsável pelo último surto. Além dos surtos, 734 casos esporádicos também foram identificados durante o período de estudo e 59 destes casos apresentaram isolamento viral (59/734 - 8,03%). Echovírus 30 foi responsável pela maioria destes casos esporádicos (42/59 - 71,18%). Este estudo chama a atenção para o echovírus 30 como o principal agente etiológico envolvido em casos esporádicos e em surtos de meningite viral ocorridos no Brasil durante o período de estudo.

ABSTRACT

Acute viral infections of the Central Nervous System (CNS), as meningitis and encephalitis, are responsible for a high morbidity, particularly in children. Non-polio enteroviruses (NPEV) are responsible for over 80% of viral meningitis in which the etiologic agent is identified. In the present study we show the frequency of occurrence of enteroviruses in both outbreaks and sporadic cases of viral meningitis occurred in Brazil during the period of December 1998 to December 2003. From 1022 samples of Cerebrospinal Fluid (CSF) analyzed at the Enterovirus Laboratory, FIOCRUZ, 162 (162/1022 - 15,85%) were positive regarding viral isolation in RD and/or HEp2 cells. From this total, 139 (139/162 - 85,27%) were identified by partial genome sequencing as being echovirus 30. Other identified enteroviruses were: coxsackievirus B5 (6/162 - 3,70%), echovirus 13 (6/162 - 3,70%), echovirus 18 (5/162 - 3,08%), echovirus 6 (2/162 - 1,23%), echovirus 25 (2/162 - 1,23%), echovirus 1 (1/162 - 0,61%) and echovirus 4 (1/162 - 0,61%). The age of the patients ranged from 28 days to 68 years old. The most frequent symptoms were fever (77,00%), headache (69,51%), vomiting (71,30%), neck stiffness (41,35%), convulsion (7,13%) and diarrhea (3,74%). Throughout the surveillance period, five viral meningitis outbreaks were identified and confirmed, being three at Paraná State (southern Brazil), one at Pernambuco (northeast Brazil) and one at Rio Grande do Sul (southern Brazil). Echovirus 30 caused four out of the five outbreaks, and echovirus 13 caused the last one. Besides the outbreaks, 734 sporadic clinical cases were also identified during the period of study and 59 of these were positive with regard viral isolation (59/734 - 8,03%). Echovirus 30 accounted for the majority of these sporadic cases (42/59 - 71,18%). This study calls the attention to the echovirus 30 as the most prevalent etiological agent involved in both sporadic cases and outbreaks of viral meningitis occurred in Brazil during the period of study.

LISTA DE ABREVIATURAS

3' NC	Região 3' Não Codificante
5' NTR	<i>5' Non Translated Region</i>
BP	<i>Bases Pairs</i>
CDC	<i>Center for Disease Control and Prevention</i>
c-DNA	DNA Complementar
CNS	<i>Central Nervous System</i>
CSF	<i>Cerebrospinal Fluid</i>
CVA	Coxsackievírus A
CVB	Coxsackievírus B
Da	Dalton
ddNTP`s	Dideoxynucleotídeos Tri-Fosfato
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
DNTP`s	Deoxynucleotídeos Tri-Fosfato
Echo	Echovírus
ECP	Efeito Citopático
EV	Enterovírus
EVNP	Enterovírus não-polio
g	Gravidade
HCl	Ácido Clorhídrico
HEV	Enterovírus Humanos
HTLV	<i>Human T-Cell Leukemia Virus</i>
ICTV	<i>International Committee on Taxonomy of Viruses</i>
IRES	<i>Internal Ribosome Entry Site</i>
Kb	Kilo - bases
Lab-EV	Laboratório de Enterovírus
LACEN	Laboratório Central Estadual
LCR	Líquido Cefalorraquidiano
MEM	Meio Mínimo Essencial
MS	Ministério da Saúde
NPEV	<i>Non-Polio Enteroviruses</i>
OMS	Organização Mundial de Saúde
PB	Pares de Bases
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (Reação em Cadeia da Polimerase)
PV	Poliovírus
RFLP-PCR	<i>Restriction Fragment Length Polymorphism - Polymerase Chain Reaction</i>
RNA	Ácido Ribonucléico
RT-PCR	<i>Reverse Transcription - Polymerase Chain Reaction</i>
SNC	Sistema Nervoso Central
SUS	Sistema Único de Saúde
SVS	Secretaria de Vigilância em Saúde
TAE	Tampão Tris-Acetato-EDTA
TBE	Tampão Tris-Borato-EDTA
UV	Luz Ultravioleta
VPg	<i>Virion Protein genome</i>
WHO	<i>World Health Organization</i>

ÍNDICE GERAL

1 – INTRODUÇÃO	01
1.1 – Aspectos Gerais da Meningite Viral	02
1.2 – Epidemiologia da Meningite Viral	02
1.3 – Características Clínicas da Meningite Viral	03
1.4 – Tratamento da Meningite Viral	04
1.5 – Diagnóstico da Meningite Viral	04
1.6 – Etiologia da Meningite Viral	05
1.7 – Classificação Taxonômica dos Enterovírus	06
1.8 – Composição dos Enterovírus.....	07
1.9 – Características Físico-Químicas dos Enterovírus.....	09
1.10 - Distribuição Geográfica dos Enterovírus.....	09
1.11 – Ciclo Replicativo Viral	09
1.12 – Patogenia dos Enterovírus.....	12
1.13 – Doenças Causadas pelos Enterovírus.....	13
1.14 – Isolamento dos Enterovírus.....	13
1.15 – Detecção e Identificação de Enterovírus.....	14
1.16 – Direito e Ações de Vigilância em Saúde	14
1.17 – Relevância da Vigilância Epidemiológica da Meningite Viral	17
2 – OBJETIVOS	22
2.1 – Objetivo Geral	23
2.2 – Objetivos Específicos	23
3 - MATERIAL E MÉTODOS	24
3.1 - Amostras Clínicas	25
3.1.1 – Coleta das Amostras	25
3.1.2 - Critérios para Inclusão e Exclusão das Amostras	25
3.2 – Análise do Perfil dos Pacientes	26
3.3 - Isolamento Viral em Culturas Celulares	26
3.4 - Identificação de Enterovírus Entre os Isolados	27
3.4.1 – RT-PCR	27

3.4.2 – Visualização dos Produtos Amplificados em Gel de Acrilamida	28
3.5 - Identificação (Tipagem Molecular) dos Enterovírus Isolados	28
3.5.1 - Extração de RNA Viral	28
3.5.2 – Síntese do c-DNA	29
3.5.3 – Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)	30
3.5.4 – Visualização dos Produtos Amplificados em Gel de Agarose	30
3.5.5 - Eluição do DNA	31
3.5.6 - Quantificação da Concentração de DNA	31
3.5.7 – Reações Cíclicas de Sequenciamento (<i>Cycle-Sequencing</i>)	31
3.5.8 – Purificação dos Produtos de <i>Cycle-Sequencing</i>	32
3.5.9 - Análise das Sequências (Determinação da Identidade Viral)	32
3.6 – Identificação e Confirmação de Surtos e Casos Esporádicos	33
4 – RESULTADOS	35
4.1 – Amostras Clínicas	36
4.2 – Análise do Perfil dos Pacientes	37
4.3 - Isolamento Viral em Cultura Celular	38
4.4 - Identificação de Enterovírus entre os Isolados por RT-PCR	39
4.5 - Identificação (Tipagem Molecular) dos Enterovírus Isolados	40
4.6 – Identificação e Confirmação de Surtos e Casos Esporádicos	41
5 – DISCUSSÃO	46
6 – CONCLUSÕES	53
ANEXO	56
7 - REFERÊNCIAS	89

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 01 - Esquemas do Capsídeo de um Enterovírus com as Proteínas VP1, VP2, VP3 e VP4	08
Figura 02 - Esquema do Genoma dos Enterovírus	08
Figura 03 – Ciclo Replicativo Viral	11
Figura 04 – Patogenia dos Enterovírus	12
Figura 05 – Casos de Meningites no Brasil, 2003	18
Figura 06 – Meningite Viral no Brasil: Incidência e Letalidade, 1990 – 2003 (Dados Parciais)	18
Figura 07 – Incidência de Meningite Viral por Região do Brasil, 1990 – 2003 (Dados Parciais)	19
Figura 08 - Coeficiente de Incidência por Faixa Etária no Brasil, 2000 – 2003	19
Figura 09 – Fluxograma Simplificado da Metodologia Realizada	34
Figura 10 – Distribuição Temporal de Casos de Meningite Viral no Brasil Recebidos pelo Laboratório de Enterovírus (Dezembro de 1998 – Dezembro de 2003)	36
Figura 11 – Perfil Eletroforético dos Produtos Amplificados, por RT-PCR, para a Identificação do Grupo Enterovírus, Utilizando o Par de <i>Primers</i> EVR-EVF (153 pb)	39
Figura 12 – Perfil Eletroforético dos Produtos Amplificados, por PCR, para a Tipagem Molecular dos Enterovírus Envolvidos nos Casos de Meningite Viral, Utilizando o Par de <i>Primers</i> 222-292 (357 pb)	40
Figura 13 – Frequência de Enterovírus Isolados a Partir de LCR Provenientes de Casos de Meningite Viral Ocorridos no Brasil (Dezembro de 1998 – Dezembro de 2003)	41
Figura 14 – Curva Epidêmica dos Cinco Surto de Meningite Viral Ocorridos no Brasil, no Período entre Dezembro de 1998 e Dezembro de 2003	44

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 01 - Características do LCR em Pacientes com Meningite Bacteriana e Viral	03
Tabela 02 – Classificação dos Enterovírus Baseada na Análise do Genoma Viral	07
Tabela 03 - Frequência Anual de Casos de Meningite Viral no Brasil Recebidos pelo Laboratório de Enterovírus (Dezembro de 1998 – Dezembro de 2003)	37
Tabela 04 – Dados Clínico-Epidemiológicos dos Pacientes com Meningite Viral	38
Tabela 05 - Taxas de Isolamento de Enterovírus (EV) nos LCRs de Todos os Casos de Meningite Viral Recebidos pelo Laboratório de Enterovírus (Dezembro de 1998 – Dezembro de 2003)	39
Tabela 06 – Resumo das Características Geográficas, Temporais e os Diagnósticos Associados aos Cinco Surtos de Meningite Viral no Brasil, entre Dezembro de 1998 e Dezembro de 2003	43
Tabela 07 – Distribuição Anual de Casos Esporádicos de Meningite Viral no Brasil, Recebidos e Analisados pelo Laboratório de Enterovírus (Dezembro de 1998 – Dezembro de 2003)	45

1 - INTRODUÇÃO

1 – INTRODUÇÃO

1.1 – Aspectos Gerais da Meningite Viral

Meningite viral é o nome dado ao conjunto de manifestações clínicas estabelecidas após infecção das meninges por vírus. Ela é também conhecida como meningite asséptica e esta denominação é comumente utilizada devido às características do líquido cefalorraquidiano (LCR), ou líquido, nessa síndrome. Ao contrário das meningites bacterianas, onde o LCR apresenta-se geralmente turvo, nas meningites virais, este permanece límpido, dando a falsa impressão de que está estéril, como num indivíduo sadio.

A meningite viral é uma doença infecto-contagiosa. A contaminação fecal-oral é a principal forma de transmissão, mas evidências mostram que perdigotos ou aerossóis de secreções respiratórias de indivíduos infectados podem também ser fontes de transmissão desses vírus. Por isso, um dos hábitos de higiene mais comuns, a lavagem das mãos, é o método mais eficaz de prevenção da doença (MELNICK, 1996). Além disso, a desinfecção de superfícies e objetos contaminados e a limpeza adequada de reservatórios de água e piscinas, visando a diminuição da possibilidade de surtos também colaboram efetivamente para evitar ou controlar a propagação dos agentes virais.

Algumas características do LCR em pacientes com meningite bacteriana e viral estão descritas na **Tabela 01** (BRASIL, 2002).

1.2 – Epidemiologia da Meningite Viral

As meningites de etiologia viral constituem-se no tipo mais comum de meningite. Apesar da baixa taxa de letalidade, em comparação com a meningite bacteriana, a meningite viral apresenta caráter cosmopolita e representa uma significativa causa de morbidade, principalmente em crianças, sem predileção por sexo, podendo, inclusive, levar a sequelas neurológicas e, em casos de maior acometimento do paciente, levar a morte (MELNICK, 1996).

Nas últimas décadas houve uma mudança no quadro epidemiológico das meningites virais devida à introdução de vacinas anti-virais (poliomielite, sarampo e caxumba) e ao surgimento de metodologias de diagnóstico mais sensíveis e específicas, que tem

umentado a possibilidade de identificação dos agentes etiológicos (OBERSTE et al., 2000).

Tabela 01 - Características do LCR em Pacientes com Meningite Bacteriana e Viral.

Parâmetros de análise	Meningite bacteriana	Meningite viral
Aspecto	Turvo	Límpido
Cor	Branca-leitosa ou xantocrômica	Incolor ou opalescente
Coágulo	Presente ou ausente	Ausente
Cloretos	Diminuídos	Normais
Glicose	Diminuída	Normal
Proteínas totais	Aumentadas	Levemente aumentadas
Globulinas	Positiva (gama)	Negativa ou Positiva (gama)
Leucócitos	200 a milhares (neutrófilos)	5 a 500 (linfócitos)
VDRL	Não reagente	Não reagente
Contra- imunoeletoforese	Reagente *	Não reagente
Látex	Reagente*	Não reagente
Microscopia óptica	Visualização, ou não, de Cocos Gram+, Diplococos Gram-, Bacilos Gram + e -	Nenhuma visualização
Crescimento em cultura	Ágar-chocolate (para bacilos Gram-)	Cultura celular com Meio MEM-Earle com soro fetal bovino

* - Reagente para *N. meningitidis*, *H. influenzae* e *S. pneumoniae*

1.3 – Características Clínicas da Meningite Viral

As manifestações clínicas da meningite viral variam em relação à idade do paciente, ao agente etiológico e a fatores associados à infecção, como outras doenças concomitantes e imunossupressão. Mas os sintomas mais comuns relatados pelos pacientes são hipertermia, cefaléia intensa, fotossensibilidade, náuseas, ânsia de vômito, rigidez na nuca, sonolência e confusão mental. Alguns sinais conhecidos também podem ocorrer, como os de Kerning (flexão da perna sobre a coxa e desta sobre a bacia ao se elevar o tronco, quando em decúbito dorsal) e de Brudzinski (mesmo movimento de flexão ao se antefletir a cabeça). A rigidez na nuca é a característica clínica mais importante e é ocasionada pela irritação das leptomeninges nas raízes raquianas cervicais e torácicas superiores. Em recém-nascidos, os sinais são identificados com dificuldade. Os sintomas

desaparecem naturalmente em 7-10 dias e o paciente, na maioria das vezes, tem uma recuperação completa (*Center for Disease Control and Prevention Home Page*; MELNICK, 1996).

A população em geral está exposta aos vírus causadores da meningite. Entretanto, a maioria dos indivíduos adultos infectados não apresenta sinais característicos da doença, mas apenas relatam sintomas respiratórios. Apenas 0,1% dos indivíduos infectados desenvolvem os sinais característicos da doença (*Center for Disease Control and Prevention Home Page*). Esta baixa morbidade pode ser encarada positivamente, pois poucos dentre os indivíduos infectados ficam doentes. Por outro lado isto pode ser considerado preocupante, uma vez que muitos indivíduos apresentam apenas infecção inaparente, e podem estar transmitindo o vírus a outras pessoas. Dessa forma, torna-se muitas vezes difícil, por parte das autoridades de saúde, a avaliação da fonte de infecção.

1.4 – Tratamento da Meningite Viral

Não há tratamento específico para a meningite viral. A maioria dos pacientes recupera-se naturalmente, havendo, normalmente, apenas a recomendação de repouso, ingestão de muito líquido e prescrição de analgésicos e antitérmicos para aliviar a cefaléia e a hipertermia (*Directors of Health Promotion and Education Home Page*).

1.5 – Diagnóstico da Meningite Viral

O diagnóstico da meningite viral pode ser feito por várias técnicas. Dentre elas, podemos citar o isolamento do vírus a partir do líquido cefalorraquidiano (LCR) em cultura de células, onde se observa o efeito citopático viral. Esta metodologia, porém, requer um tempo relativamente longo (de 7 a 14 dias) para uma identificação positiva. Além disso, o isolamento viral pode ser mal-sucedido devido a baixos títulos virais em algumas amostras clínicas e também devido ao fato de alguns agentes virais não serem replicados em cultivos celulares de uso rotineiro (CHONMAITREE et al., 1988). Os ensaios de neutralização de infecciosidade viral, com o uso de soros imunes específicos, também são utilizados na identificação do vírus causador da doença (BUXBAUM et al., 2001).

É importante a realização de um diagnóstico diferencial entre as meningites e meningoencefalites de origem viral e aquelas de outras etiologias, como as riquetsioses e Doença de Lyme, que apresentam sinais semelhantes aos da meningite viral.

Nas últimas décadas, o desenvolvimento de novas técnicas laboratoriais vem permitindo a identificação de numerosos agentes virais, contribuindo para um melhor conhecimento da etiologia e epidemiologia destas patologias. O diagnóstico viral específico é mais comum em crianças do que em adultos. As técnicas convencionais supracitadas, utilizadas para identificação viral, vêm sendo complementadas atualmente com técnicas moleculares, como PCR (*Polymerase Chain Reaction*), RT-PCR (*Reverse Transcription - Polymerase Chain Reaction*) e sequenciamento nucleotídico, que são altamente sensíveis e tem elevada especificidade e rapidez.

A detecção rápida de RNA viral por ensaios diagnósticos baseados em PCR podem influenciar no controle clínico de meningite viral (ROMERO, 1999), colaborando efetivamente para a vigilância sanitária no Brasil.

1.6 – Etiologia da Meningite Viral

Os Enterovírus são responsáveis por mais de 80% dos casos de meningite viral em que o agente etiológico é identificado e o número de casos anualmente nos Estados Unidos e no Canadá é de aproximadamente 50.000 hospitalizações devidas à esta doença (MORENS; PALLANSCH, 1995).

Tem sido observada uma contínua circulação de diversos sorotipos de enterovírus envolvidos em surtos e casos esporádicos de meningite viral no mundo, tais como o echovírus 13, nos Estados Unidos (KIRSCHKE et al., 2002), no Japão (KEINO et al., 2001) e em Israel (SOMEKH et al., 2003), coxsackievírus B5, na Bélgica (THOELEN et al., 2003) e enterovírus 71, em Taiwan (LIU et al., 2000). Também foram descritos recentemente casos de meningite devidos aos echovírus 4, 6, 7, 16, 18, 30 e coxsackievírus B2, B3, B6 (KUBO; IRITANI; SETO, 2002; SILVA et al., 2002; WANG et al., 2002; THOELEN et al., 2003).

Além dos enterovírus, vírus de outras famílias podem causar meningite viral, como os adenovírus, arbovírus, varicela-zoster vírus, herpes simplex vírus-1 e herpes simplex vírus-2 (NOWAK; BOEHMER; FUCHS, 2003).

1.7 – Classificação Taxonômica dos Enterovírus

Segundo a classificação taxonômica atual dos vírus, oficializada no VII ICTV (*International Committee on Taxonomy of Viruses*), os enterovírus são pertencentes à família *Picornaviridae* (*pico* = pequeno; *rna* = ácido ribonucléico). Esses vírus foram inicialmente identificados e classificados com base nas suas características morfológicas e antigenicidade verificada em testes de neutralização com antisoros específicos para esses vírus. Atualmente, são conhecidos nove gêneros (ou grupos) desta família: *Enterovirus* (89 sorotipos), *Rhinovirus* (103 sorotipos), *Cardiovirus* (3 sorotipos), *Aphthovirus* (8 sorotipos), *Hepatovirus* (2 sorotipos), *ParEchovirus* (2 sorotipos), *Teschovirus* (10 sorotipos), *Kobuvirus* (1 sorotipo) e *Erbovirus* (1 sorotipo) (KING et al., 2000).

Os enterovírus humanos são representados por diversos sorotipos, sendo eles: poliovírus (apresentando 3 sorotipos), coxsackievírus A (23 sorotipos), coxsackievírus B (6 sorotipos), echovírus (28 sorotipos) e enterovírus sorotipos 68, 69, 70 e 71 (PRINGLE, 1999; KING et al., 2000). Além destes, alguns grupos de pesquisas propuseram, recentemente, alguns novos sorotipos: enterovírus 73 (OBERSTE et al., 2001), enterovírus 74 e 75 (OBERSTE et al., 2004), enterovírus 77 e 78 (NORDER et al., 2003) e enterovírus 76, 89, 90 e 91 (OBERSTE et al., 2005).

Uma outra classificação para os enterovírus, com base em dados biológicos e em resultados de experimentos moleculares para análise do genoma completo viral, bem como das regiões VP1, VP2 e 3D (KING et al., 2000; NORDER et al., 2003; OBERSTE et al., 2001; OBERSTE et al., 2004; OBERSTE et al., 2005), agrupa os enterovírus humanos (HEV) em cinco espécies, como pode ser observado na **Tabela 02**.

Tabela 02 – Classificação dos Enterovírus Humanos Baseada na Análise do Genoma Viral.

Espécies dos enterovírus				
Poliovírus	Enterovírus humanos A (HEV-A)	Enterovírus humanos B (HEV-B)	Enterovírus humanos C (HEV-C)	Enterovírus humanos D (HEV-D)
PV1	CVA2-A8	CVB1-B6	CVA1	EV68
PV2	CVA10	CVA9	CVA11	EV70
PV3	CVA12	Echo1-7	CVA13	
	CVA14	Echo9	CVA15	
	CVA16	Echo11-21	CVA17-22	
	EV71	Echo24-27	CVA24	
	EV76	Echo29-33		
	EV89	EV69		
	EV90	EV73		
	EV91	EV74		
			EV75	
		EV77		
		EV78		

Legenda: PV – poliovírus; CVA – coxsackievírus A; EV – enterovírus; CVB – coxsackievírus B; Echo – echovírus.

1.8 – Composição dos Enterovírus

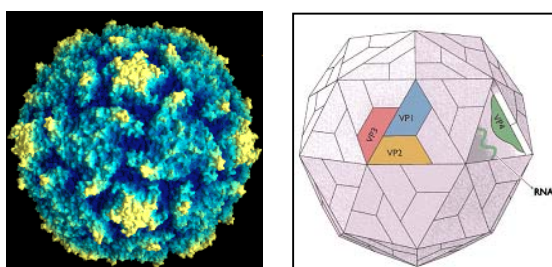
Os enterovírus são vírus esféricos, não envelopados, medindo em média 27 nm de diâmetro. Sua estrutura genômica consiste em um RNA de fita simples de polaridade positiva, com aproximadamente 7,5 Kb, e peso molecular de cerca de $2,6 \times 10^6$ Da, poliadenilado na extremidade 3' (de 40 a 100 nucleotídeos), e que apresenta uma proteína, a VPg (*Virion Protein genome*), ligada covalentemente à extremidade 5' do RNA viral. O RNA desses vírus contém uma única fase de leitura codificando uma poliproteína, que é clivada na tradução do genoma viral. As clivagens são realizadas por proteínas codificadas pelo próprio vírus, gerando diversos produtos protéicos com diferentes funções, como as proteínas do capsídeo, proteinases e RNA polimerases. Seu capsídeo tem simetria icosaédrica, composto de 60 subunidades idênticas (protômeros), constituídos de 4 polipeptídeos ou proteínas, denominadas VP1, VP2, VP3 e VP4, que são produtos de reações proteolíticas do segmento P1 (RACANIELLO, 1988; RUECKERT, 1996; OXMAN, 1999). VP1, VP2 e VP3 estão expostas na superfície do vírion, enquanto que VP4 fica internalizada e associada ao RNA viral. Dessa forma, os epítomos responsáveis

pela indução de anticorpos neutralizantes estão localizados, principalmente, em VP1, que é a proteína mais exposta, e também em VP2 e VP3 (HOGLE; CHOW; FILMAN, 1985).

O hospedeiro apresenta uma resposta imunológica sorotipo-específica contra infecções pelos enterovírus, de modo que um indivíduo pode adquirir várias infecções por diferentes sorotipos de enterovírus.

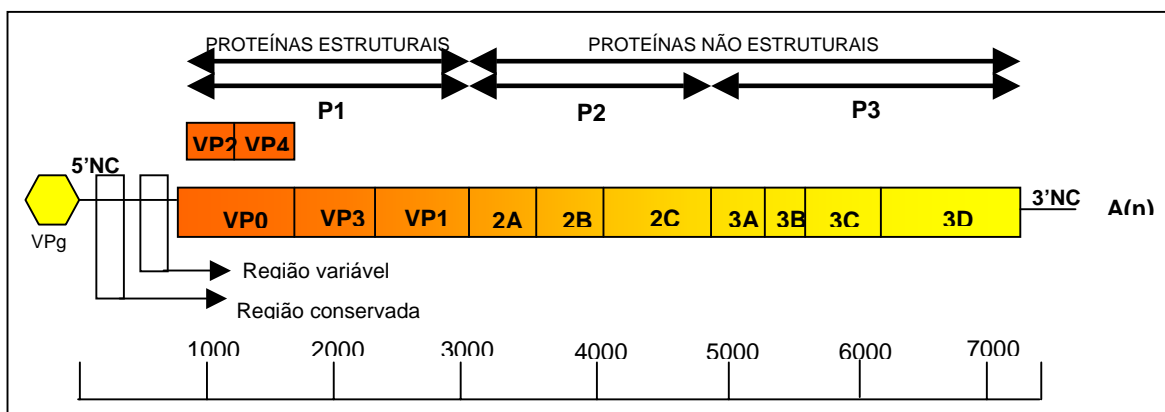
A **Figura 01** ilustra o capsídeo viral de um enterovírus e a localização de suas proteínas estruturais. A **Figura 02** mostra a localização, no genoma dos enterovírus, dos genes que são traduzidos nas proteínas supracitadas.

Figura 01 - Esquemas do Capsídeo de um Enterovírus com as Proteínas VP1, VP2, VP3 e VP4.



Fontes: Geenor's Home Page (acesso em 19/04/05) e Office of College Communications Home Page (acesso em 19/04/05).

Figura 02 - Esquema do Genoma dos Enterovírus.



Fonte: Adaptado de Costa, 1999.

1.9 - Características Físico-Químicas dos Enterovírus

Os enterovírus são resistentes a antibióticos, enzimas proteolíticas e desinfetantes como álcool e éter. Eles são estáveis, em culturas celulares, por muitos anos a baixas temperaturas (-70°C), por semanas a 4°C e por dias a temperatura ambiente. Por outro lado, podem ser inativados pela luz ultravioleta, formaldeído a 0,3%, cloro residual livre (0,3 a 0,5 ppm), HCl (0,1N) e pelo calor (50°C / 30 minutos) (MOORE; MORENS, 1984; MELNICK, 1996).

1.10 - Distribuição Geográfica dos Enterovírus

Os enterovírus têm uma distribuição universal, com características epidemiológicas variadas, podendo apresentar-se de forma epidêmica ou em casos esporádicos. Estes vírus estão amplamente disseminados na natureza e têm maior incidência no verão e outono, nas regiões temperadas, e não há um padrão sazonal evidente em regiões tropicais (SAWYER, 1999).

1.11 – Ciclo Replicativo Viral

O ciclo replicativo viral se inicia no momento em que ocorre a interação vírus-célula hospedeira, com a adsorção do vírion a receptores celulares específicos presentes na membrana plasmática (RACANIELLO, 2001).

Após a adsorção, o vírus é então internalizado e tem seu capsídeo fragmentado. A internalização se dá por endocitose, em alguns pontos da superfície celular revestidos internamente por clatrin, onde os receptores estão concentrados, ocorrendo a invaginação e a posterior formação de vesículas. A acidificação no interior das vesículas, devido à atuação da bomba de prótons, provoca mudanças na estrutura do vírion, resultando na liberação de VP4 e no aparecimento de sítios hidrofóbicos presentes na região amino-terminal da proteína do capsídeo VP1, ambos escondidos anteriormente na região interna do capsídeo viral. A fusão da membrana lipídica com os sítios hidrofóbicos de VP1 permite a formação de um poro e a conseqüente transferência do RNA do vírion para o

citossol, onde ocorre a sua replicação. A proteína VPg é então removida do RNA viral por enzimas celulares.

O RNA, agindo como RNA mensageiro (RNAm), é automaticamente traduzido, sem interrupção, em uma única poliproteína que, ainda no processo de formação, é clivada autocataliticamente nos intermediários P1, P2 e P3 (RUECKERT, 1996; RACANIELLO, 2001). O processamento da poliproteína precursora é realizado cotransducionalmente por reações intramoleculares (*in cis*), as quais são chamadas de clivagens primárias, seguidas pelo processamento secundário *in cis* ou *in trans* (intermolecular). O evento inicial na sequência de clivagens é a liberação do precursor P1 da poliproteína nascente pela protease 2A. A 2A^{pro} é liberada da poliproteína por clivagem cotransducional na sua terminação amino. Esta clivagem é um pré-requisito para o processamento proteolítico da região precursora do capsídeo. Já a 3C^{pro} é responsável pela clivagem primária entre 2C e 3A, separando os segmentos P2 e P3, e pela maioria das clivagens secundárias ocorridas nos intermediários P1, P2 e P3. A forma precursora 3CD^{pro} parece catalisar eficientemente algumas clivagens ocorridas no segmento P1. O precursor P1 é clivado para produzir, inicialmente, VP0, VP1 e VP3 e, finalmente, as quatro proteínas estruturais VP1, VP2, VP3 e VP4. Os segmentos P2 e P3 são processados para darem origem às proteínas não estruturais envolvidas no processamento protéico (2A^{pro}, 3C^{pro}, 3CD^{pro}) e na replicação do genoma (2B, 2C, 3AB, 3B^{VPg}, 3D^{pol}) (RUECKERT, 1996; RACANIELLO, 2001).

Estudos sobre o processo de tradução dos vírus da família *Picornaviridae* demonstraram a presença, na região 5' NC do genoma viral, de uma sequência correspondente a um sítio interno de entrada de ribossomos, responsável por direcionar a tradução, o IRES (*internal ribosome entry site*), que consiste em um elemento regulatório de 450 - 600 nt. A subunidade 40S ribossomal liga-se ao RNAm através do IRES e “desliza” até o códon de iniciação AUG (RACANIELLO, 2001).

A síntese do genoma viral é obtida por uma sequência de eventos onde participam as moléculas de RNA viral, atuando como molde, e as RNA polimerases codificadas pelos vírus, além de outras proteínas virais e celulares. Todo esse processo ocorre no interior do citoplasma, fortemente associado ao retículo endoplasmático liso.

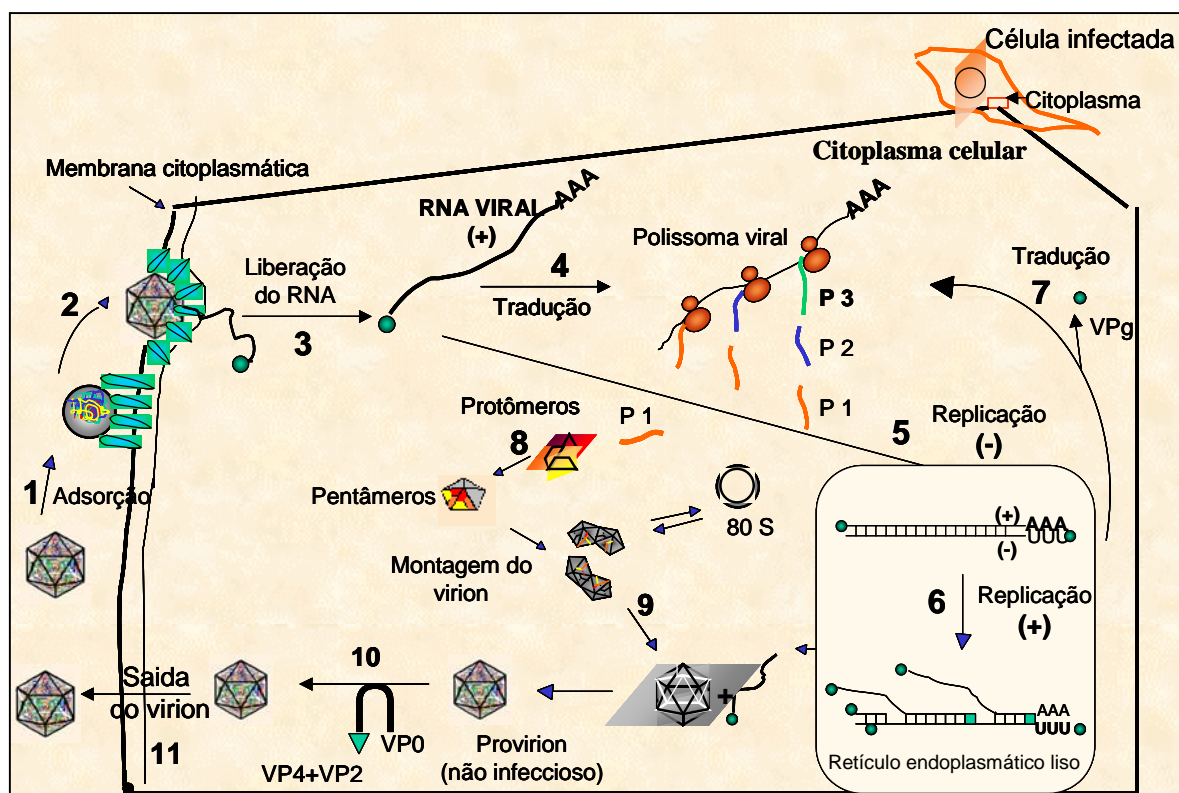
O primeiro passo na replicação do RNA viral é copiar o RNA genômico para formar uma fita complementar de polaridade negativa, a qual servirá de molde para a síntese de novas fitas de polaridade positiva. A síntese da fita complementar é iniciada na extremidade 3' NC do genoma viral e utiliza a proteína VPg como um iniciador (*primer*). A partir de uma fita complementar de polaridade negativa, várias fitas nascentes de RNA

com polaridade positiva são transcritas simultaneamente pela RNA polimerase viral, formando o chamado intermediário replicativo (RUECKERT, 1996; RACANIELLO, 2001).

Durante o início da replicação, parte do RNA positivo retorna ao citoplasma para a tradução de mais proteínas, enquanto outra parte permanece no retículo endoplasmático liso para a formação de mais centros de replicação de fita positiva. Posteriormente, as fitas positivas de RNA são acumuladas até serem empacotadas nos capsídeos. As partículas completas são liberadas pela desintegração da célula hospedeira (RUECKERT, 1996). A **Figura 03** esquematiza todo o ciclo replicativo viral.

A duração de um ciclo de replicação completo, desde a infecção até a completa montagem do vírus, varia, geralmente, de 5 a 10 horas, dependendo de alguns fatores, como: pH, temperatura, sorotipo do vírus, célula hospedeira, estado nutricional da célula hospedeira e o número de partículas que a infectaram. Em condições ótimas, pode ocorrer a biossíntese de 25.000 a 100.000 partículas virais por célula, mas somente 0,1% a 10% destas são infecciosas (MOORE; MORENS, 1984).

Figura 03 – Ciclo Replicativo Viral.

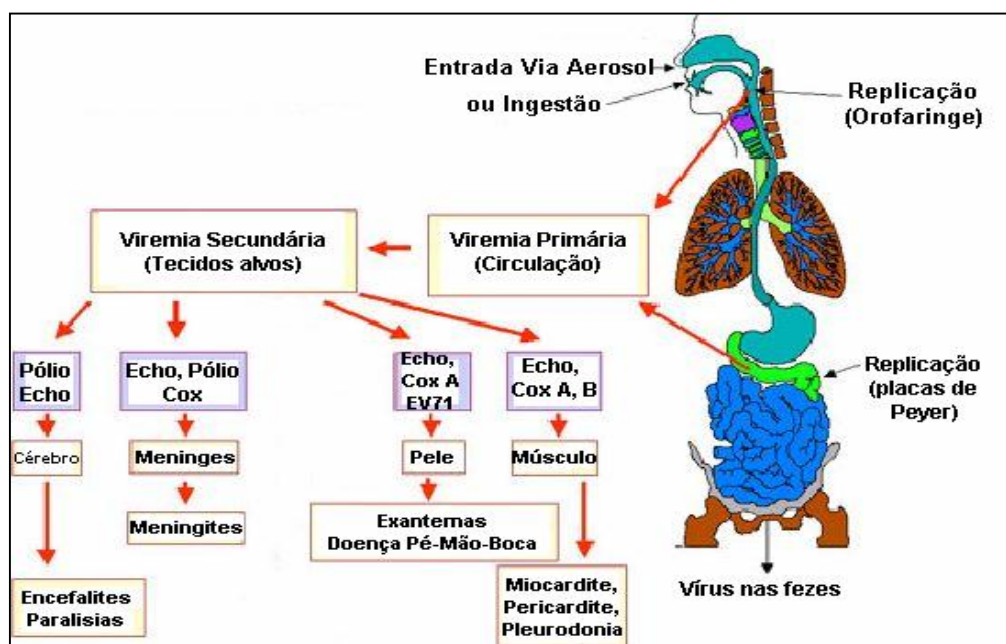


Fonte: Costa, 1999.

1.12 – Patogenia dos Enterovírus

O trato gastrointestinal e o trato respiratório superior, mais especificamente a orofaringe, são as principais portas de entrada para os enterovírus. Após sua entrada no hospedeiro, há uma replicação viral em alguns sítios de implantação (amígdalas, linfonodos da orofaringe e dos intestinos), podendo haver uma disseminação sistêmica, com a ocorrência de uma viremia transitória, que pode resultar na replicação viral em localizações secundárias como o Sistema Nervoso, tanto o Central (SNC) como o Periférico (SNP) e o coração. As vias de penetração dos vírus no SNC são a via neural (REN; RACANIELLO, 1992), a via olfativa ou a via hematogênica (LASSMAN; ZIMPRICH; ROSSLER, 1991). O período de incubação desses vírus pode levar, dependendo do sorotipo de enterovírus e do quadro clínico a ele associado, de 12 horas a 35 dias. Os enterovírus são eliminados nas fezes por até dois meses após a infecção. Desta maneira, o material fecal é frequentemente utilizado para o diagnóstico das infecções por estes agentes. A produção de anticorpos ocorre já no fim da infecção (MOORE; MORENS, 1984). A **Figura 04** ilustra a patogenia dos enterovírus esquematizada no homem.

Figura 04 – Patogenia dos Enterovírus.



Fonte: *University of South Carolina Home Page* (acesso em 01/06/04).

1.13 – Doenças Causadas pelos Enterovírus

Infecções do sistema nervoso causadas por enterovírus são conhecidas desde a antiguidade. Após a erradicação do poliovírus selvagem no Brasil, em 1989, a presença de outros enterovírus como agentes de infecções do SNC tornou-se ainda mais evidente (*Center for Disease Control and Prevention Home Page*).

As infecções por enterovírus estão relacionadas com diversas síndromes que afetam o Sistema Nervoso, além da meningite viral. Dentre elas, podem ser citadas as encefalites, a ataxia aguda cerebelar, a paralisia flácida aguda (poliomielite), mononeurites, polineurites e Síndrome de Reye (ALEXANDER et al., 1994). MEYER e colaboradores, em 1960, publicaram um dos primeiros e mais completos trabalhos sobre infecções do Sistema Nervoso Central e encontraram 60,3% (430/713) dos pacientes com síndrome da meningite e em 70,9% desses pacientes (304/430) a etiologia foi determinada: 41,9% dos casos foram causados por enterovírus não-pólio; 12,4% por poliovírus; 22,2% pelo vírus da caxumba; 12,4% pelo vírus da coriomeningite linfocitária benigna; 5,5% por *Leptospira* sp. e 1,9% por herpes simplex.

Os enterovírus são também agentes etiológicos de algumas doenças do trato gastrointestinal humano, como diarreia e pancreatite, além de miocardite, exantema febril, doença respiratória aguda e doença de pé, mão e boca.

1.14 – Isolamento dos Enterovírus

Os enterovírus podem ser isolados a partir de materiais clínicos como fezes, líquido cefalorraquidiano (LCR), soro, secreção nasofaríngea, urina ou material histopatológico. Assim como a maioria dos vírus que infectam os seres humanos, eles são citopatogênicos. Seu isolamento pode ser feito em cultura de células, selecionadas por permitirem a replicação de enterovírus e várias linhagens celulares podem ser utilizadas: RD (célula de rabdomyosarcoma embrionário humano), HEp2 (célula de carcinoma epidermóide de laringe humana), HeLa (célula originária de carcinoma epitelial de cérvix humano) e Vero (célula de rim de macaco, *Cercopithecus aethiops*) (DAGAN; MENEGUS, 1986; MELNICK, 1996).

1.15 – Detecção e Identificação de Enterovírus

JACQUES e colaboradores (2003), LEE e colaboradores (2002), VERSTREPEN; BRUYNSEELS; MERTENS (2002), KILPATRICK e colaboradores (2001), CHESKY e colaboradores (2000), OBERSTE e colaboradores (2000) e POZO e colaboradores (1998), entre outros, desenvolveram algumas técnicas e protocolos específicos de RT-PCR, RT nested PCR e RFLP-PCR para detecção de enterovírus.

Recentemente, esforços têm sido feitos a fim de classificar os sorotipos de enterovírus humanos por sequenciamento nucleotídico parcial de seus genomas e análise filogenética das sequências. Estão sendo estudadas as sequências conservadas da 5` NTR (BAILY et al., 1996), as regiões VP4 e VP2 (SHIMIZU et al., 1999) e VP1 (OBERSTE et al., 1999; OBERSTE et al., 2000; OBERSTE et al., 2001; HEIM; SCHUMANN, 2002).

Os métodos para identificação de enterovírus humanos devem não somente identificar os sorotipos rapidamente, como também detectar cepas variantes antigenicamente ou novos sorotipos (OBERSTE et al., 2001). A habilidade de detectar rapidamente e distinguir doenças associadas a enterovírus daquelas causadas por bactérias ou outros vírus é essencial para fins prognósticos, terapêuticos e epidemiológicos (CASAS et al., 1999).

Devido ao fato de o controle da infecção e os resultados desse controle em cada paciente ser muito heterogêneo, o estabelecimento de um diagnóstico para os enterovírus factível e rápido, no início do curso da meningite, elimina ou minimiza o tratamento e o período de hospitalização (CHONMAITREE; BALDWIN; LUCIA, 1989).

1.16 – Direito e Ações de Vigilância em Saúde

Abaixo segue transcrito, o artigo e respectivo parágrafo em que a Lei orgânica nº 8.080 (BRASIL, 1990) se remete ao direito da saúde do ser humano e ao dever do Estado de garanti-la.

“Art. 2 - A saúde é um direito fundamental do ser humano, devendo o Estado prover as condições indispensáveis ao seu pleno exercício.

§ 1 - O dever do Estado de garantir a saúde consiste na formulação e execução de políticas econômicas e sociais que visem à redução de riscos de doenças e de outros agravos e no estabelecimento de condições que assegurem acesso universal e igualitário às ações e aos serviços para a sua promoção, proteção e recuperação”.

As primeiras ações para o controle das doenças e epidemias, como a quarentena e o isolamento, são práticas muito antigas. A partir da segunda metade do século XIX, com o desenvolvimento da microbiologia, e de investigações de campo voltadas para a identificação dos elos da cadeia de transmissão das doenças infecciosas, surgiu a idéia de vigilância, no sentido da observação sistemática dos contatos dos doentes (PALMEIRA, 2003).

Com as campanhas de erradicação de diversas doenças infecciosas, iniciadas após a segunda guerra mundial, a vigilância deixou de ser feita sobre as pessoas (doentes e contatos) e passou a ter como objeto a doença. Consolidou-se, assim, a idéia de vigilância epidemiológica como observação ativa e sistemática da distribuição da ocorrência de agravos, a avaliação da situação epidemiológica com base na análise das informações obtidas, e a definição das medidas de prevenção e controle pertinentes. O conjunto de atividades de vigilância epidemiológica configura um sistema, em geral voltado para agravos específicos, cujo objetivo final é a prevenção, e constitui um instrumento indispensável à elaboração, ao acompanhamento e à avaliação de programas de saúde (PALMEIRA, 2003).

A identificação dos fatores de risco envolvidos na determinação das doenças, não só as infecto-contagiosas, mas, principalmente, as crônico-degenerativas, que passam a ocupar um lugar predominante no perfil epidemiológico das populações em sociedades industriais, vêm provocando a modernização das estratégias de ação no campo da saúde pública (TEIXEIRA; PAIM; VILLASBÔAS, 2003).

A busca desses fatores de risco e do conhecimento acerca da distribuição dos agentes etiológicos das infecções, nesse caso a meningite viral, colabora com a implementação desse processo.

Dentre as áreas que constituem objeto da atenção do campo da vigilância em saúde, a vigilância epidemiológica e todas as operações a ela relacionadas, que indiretamente se relacionam à saúde e qualidade de vida de toda a população, representam incontestavelmente, ou deveriam representar, uma grande preocupação das autoridades

governamentais. Estes, por sua vez, devem estar imbuídos de uma constante preocupação em implementar uma vigilância em saúde em nosso país, que fomente um processo de avanço verdadeiro também nas práticas de vigilância sanitária, cujas ações visam a proteção, promoção, recuperação e reabilitação da saúde.

Assim sendo, além da ampliação do objeto dos “programas de controle”, que tendem a ultrapassar o limite estreito das doenças infecciosas e parasitárias, e se dirigem a grupos populacionais expostos a riscos diferenciados de adoecer e morrer, como os programas de saúde materno-infantil, do trabalhador, e do idoso, vem se observando ainda, notadamente a partir dos anos 70, a formulação e a implementação de propostas dirigidas à montagem de “sistemas de vigilância epidemiológica”, cuja tradução operacional pretende ser uma ampla rede de unidades geradoras de dados que permitam a adoção de decisões, a execução de ações de investigação e de controle e a visualização do impacto das doenças e de seus agentes sobre a saúde da população (TEIXEIRA; PAIM; VILLASBÔAS, 2003).

Segundo o Guia de Vigilância Epidemiológica (BRASIL, 2002), são imprescindíveis o planejamento e a execução do Programa de Investigações Epidemiológicas de Casos e Epidemias, que tem como objetivos: a) identificar a fonte e modos de transmissão; b) identificar grupos expostos a maior risco; c) verificar os fatores determinantes; d) confirmar o diagnóstico; e) determinar as principais características epidemiológicas, orientando medidas de controle para impedir a ocorrência de novos casos.

Dentre as medidas adotadas frente a um caso ou epidemia de alguma doença, inclusive a meningite viral, estão a assistência médica ao(s) paciente(s); proteção do restante da população; e a execução de um roteiro de investigação de casos, que inclui etapas de confirmação do diagnóstico da doença e confirmação da epidemia, coleta de dados sobre o(s) caso(s), busca de evidências sobre fonte de contágio, período de duração da epidemia, modos de transmissão, distribuição geográfica da epidemia, atributos dos grupos envolvidos, como faixa etária, sexo e grupo social e verificação de fatores de risco. Outras etapas são a busca ativa de casos e o processamento e análise dos dados para elaboração de um relatório da investigação.

O processo citado anteriormente de confirmação da existência de um surto ou epidemia envolve o estabelecimento das condições do estado epidêmico, que diz respeito a uma situação dinâmica de epidemia ou surto e a caracterização desse evento. O conceito de Epidemia é uma elevação do número de casos de uma doença ou agravo, em um determinado lugar e período de tempo, caracterizando de forma clara, um excesso em

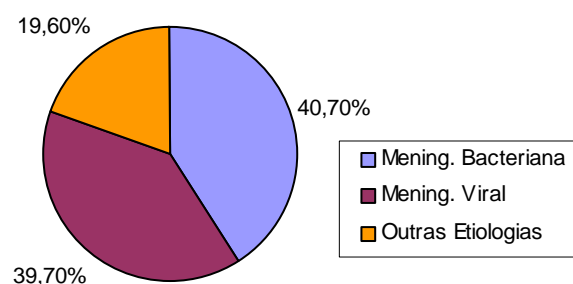
relação à frequência esperada da doença. Um Surto consiste num tipo de epidemia em que os casos se restringem a uma área geográfica pequena e bem delimitada, ou a uma população institucionalizada, como creches, quartéis, etc.. Para a confirmação de um desses eventos, é importante que o nível endêmico desses casos em determinada localidade seja conhecido, para que seja feita uma comparação entre os dados de incidência da doença no momento de ocorrência do evento investigado e o nível endêmico usualmente verificado na mesma população (BRASIL, 2002).

1.17 – Relevância da Vigilância Epidemiológica da Meningite Viral

No Brasil, em anos recentes, tem sido observada uma contínua circulação de enterovírus como agentes etiológicos de surtos e casos esporádicos de meningite viral que vem ocorrendo principalmente na região sul do País. Concomitantemente, a Coordenação de Vigilância de Doenças de Transmissão Respiratória e Imunopreveníveis, da Secretaria de Vigilância em Saúde, do Ministério da Saúde (SVS/MS), com o objetivo de implementar a vigilância de meningites virais estipulou alguns desafios, como implantar oficialmente a vigilância da meningite viral, atuar oportunamente no controle das situações de surto e identificar os agentes etiológicos responsáveis pelos surtos no Brasil.

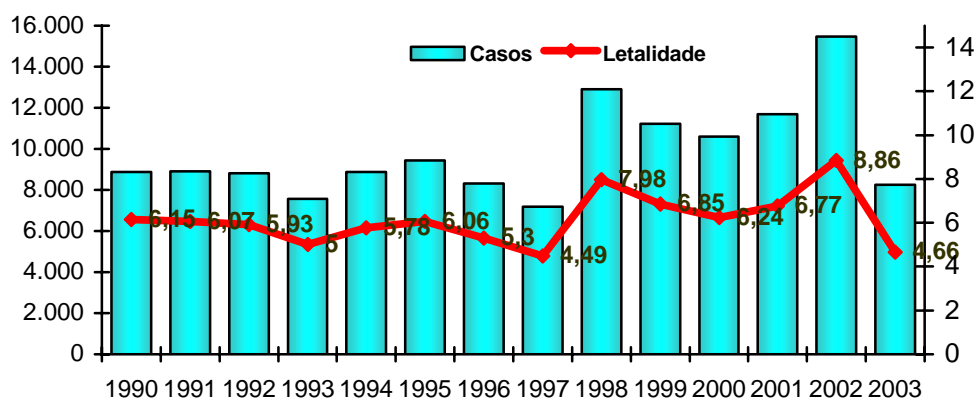
Esta Coordenação tem feito alguns levantamentos, agrupando dados epidemiológicos consistentes, nos quais podem ser observadas a frequência, incidência, letalidade e outros aspectos referentes às meningites virais ocorridas no país, nos últimos anos (**Figuras 05, 06, 07 e 08**). Ainda, segundo dados desta Coordenação, nos últimos quatro anos, a incidência de meningites virais no Brasil foi de 6,63 / 100.000 hab, apresentando uma taxa de letalidade de 1,81% neste período.

Figura 05 – Casos de Meningites no Brasil, 2003.
Número de casos confirmados de meningites no Brasil, 2003 (dados parciais) – 28768, dos quais:



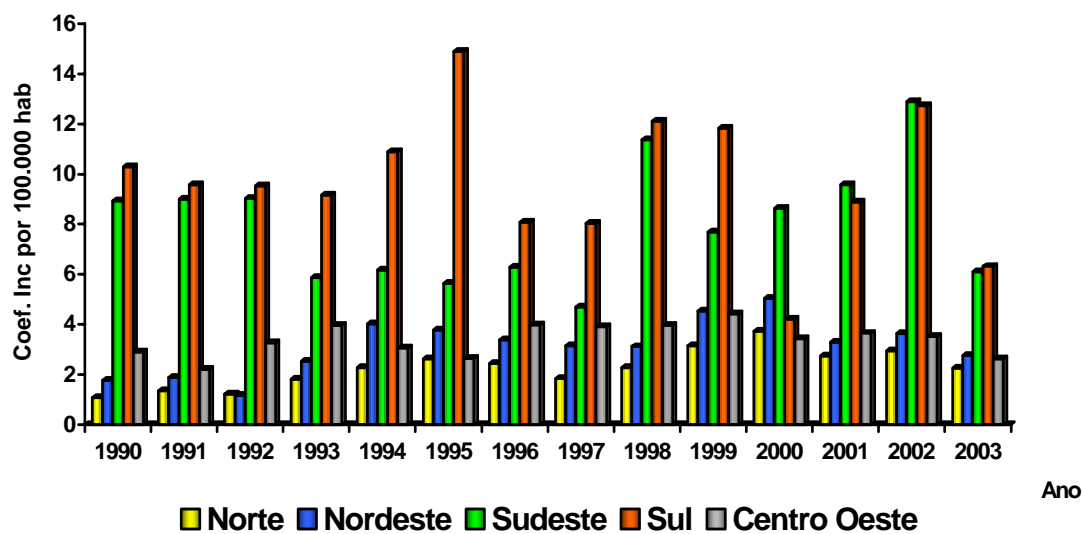
Fonte: COVER-SINAN/DEVEP/SVS/MS (2003).

Figura 06 – Meningite Viral no Brasil: Incidência e Letalidade, 1990 – 2003 (Dados Parciais).



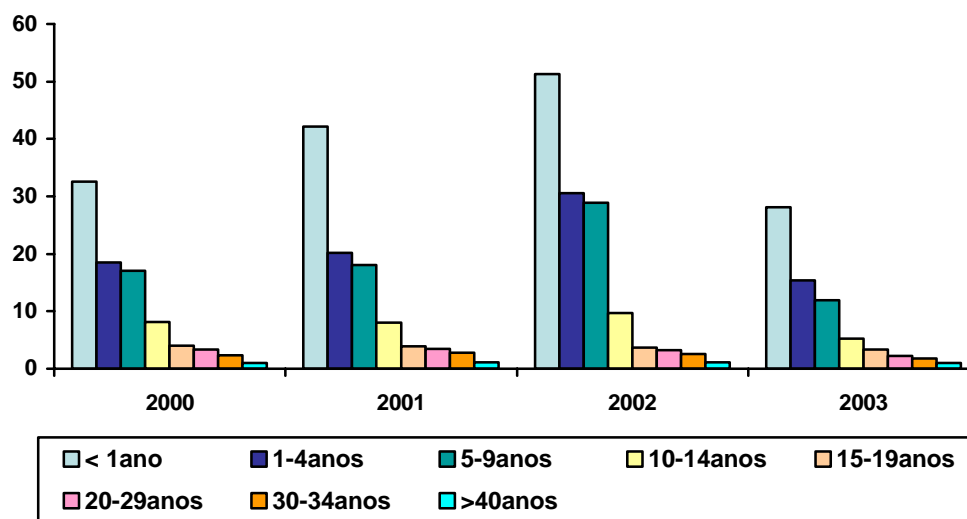
Fonte: COVER-SINAN/DEVEP/SVS/MS (2003).

Figura 07 – Incidência de Meningite Viral por Região do Brasil, 1990 – 2003 (Dados Parciais).



Fonte: COVER-SINAN/DEVEP/SVS/MS (2003).

Figura 08 - Coeficiente de Incidência por Faixa Etária no Brasil, 2000 – 2003.



Fonte: COVER-SINAN/CGDT/DEVEP/SVS/MS (2003).

Com base nos dados supracitados, fica evidenciada a importância do estudo da meningite viral para a saúde pública como um todo.

Segundo os dados observados na **Figura 07**, há uma maior incidência de casos nas regiões sul e sudeste. Mas este maior número de notificações nas regiões sul e sudeste possivelmente se deve a uma sub-notificação de casos nas outras regiões (norte, nordeste e centro-oeste), apesar de a meningite viral ser uma doença de notificação compulsória (BRASIL, 2001). Se a situação for vislumbrada por esse ângulo, é certa a necessidade de melhoria das condições de atendimento e acompanhamento médico, e também a urgência no aumento da capacidade de diagnóstico laboratorial e vigilância epidemiológica nestas regiões para que se possa ter uma idéia real da incidência da meningite viral em todas as regiões do Brasil.

A Lei nº 8.080 (BRASIL, 1990), em seu Artigo 6º, traz a definição da Vigilância Epidemiológica, como transcrito a seguir:

“Art 6º - Estão incluídas ainda no campo de atuação do Sistema Único de Saúde (SUS):

I - a execução de ações:

a) de vigilância sanitária;

b) de vigilância epidemiológica;

c) de saúde do trabalhador; e

d) de assistência terapêutica integral, inclusive farmacêutica;

(...)

§ 2 - Entende-se por vigilância epidemiológica um conjunto de ações que proporcionam o conhecimento, a detecção ou prevenção de qualquer mudança nos fatores determinantes e condicionantes de saúde individual ou coletiva, com a finalidade de recomendar e adotar as medidas de prevenção e controle das doenças ou agravos”.

Praticamente todos os estudos de vigilância de infecções causadas por enterovírus disponíveis na literatura foram, ou são conduzidos, em países desenvolvidos (Lina, 1996).

As investigações acerca das meningites de etiologia viral no Brasil estão ainda em fase inicial de implantação pelo Programa de Vigilância de Surto e Casos de Meningites

Virais, do Ministério da Saúde do Brasil, não existindo, entretanto, estudos sistemáticos sobre os agentes etiológicos envolvidos nestes surtos. E esse tipo de estudo é muito importante sob a ótica da vigilância epidemiológica, pois propicia um acréscimo no conhecimento a respeito da ocorrência destes agentes virais e das infecções causadas por eles. Além disso, também é relevante sob o ponto de vista da vigilância sanitária e da saúde pública como um todo, colaborando para a promoção da saúde da população, uma vez que tais conhecimentos podem ajudar no controle da meningite viral (MCINTYRE; KEEN, 1993; HOVI et al., 1996; MUIR, 1998). A motivação e justificativa para o desenvolvimento deste trabalho estão inseridas exatamente neste contexto.

Além da vigilância epidemiológica de casos de meningite viral, o estudo detalhado destas amostras virais epidêmicas, em nível molecular, certamente trará grandes benefícios para o nosso conhecimento acerca da epidemiologia molecular dos enterovírus, bem como de seu relacionamento filogenético.

2 - OBJETIVOS

2 - OBJETIVOS

2.1 – Objetivo Geral

O presente trabalho tem como objetivo geral o estudo dos enterovírus associados a casos esporádicos e surtos de meningite viral ocorridos no Brasil entre dezembro de 1998 e dezembro de 2003, e a análise do perfil dos pacientes acometidos pela doença, colaborando com a Coordenação de Vigilância de Doenças de Transmissão Respiratória e Imunopreveníveis, da Secretaria de Vigilância em Saúde, do Ministério da Saúde (SVS/MS);

2.2 – Objetivos Específicos

- Analisar as características epidemiológicas dos pacientes, tais como idade e sexo, e características clínicas, como sintomas, duração da doença e período de hospitalização, a partir das fichas que chegaram junto com as amostras clínicas;
- Isolar os agentes etiológicos responsáveis por casos de meningite viral ocorridos no Brasil e recebidos pelo Laboratório de Enterovírus entre dezembro de 1998 e dezembro de 2003;
- Identificar dentre os agentes etiológicos isolados, os enterovírus;
- Caracterizar, por sequenciamento nucleotídico parcial, as amostras com enterovírus isolados;
- Identificar e confirmar surtos e casos esporádicos de meningite viral ocorridos no período de estudo (dezembro de 1998 a dezembro de 2003);
- Estudar a frequência de ocorrência dos enterovírus nestes surtos e nos casos esporádicos;
- Fornecer à Coordenação de Vigilância de Doenças de Transmissão Respiratória e Imunopreveníveis, da Secretaria de Vigilância em Saúde, do Ministério da Saúde, bem como à Agência Nacional de Vigilância Sanitária os subsídios necessários para proposição e implantação de medidas pertinentes aos cuidados a serem tomados pela população em relação às infecções virais, no intuito da proteção da saúde coletiva.

3 - MATERIAL E MÉTODOS

3 - MATERIAL E MÉTODOS

3.1 - Amostras Clínicas

As 1022 amostras clínicas utilizadas nesse trabalho (LCR) foram provenientes de pacientes apresentando quadros de meningite viral ocorridos entre dezembro de 1998 e dezembro de 2003. Como o Laboratório de Enterovírus é credenciado pelo Ministério da Saúde como Centro-Piloto de Referência Nacional para o Programa de Vigilância de Surto e Casos de Meningites Virais, materiais clínicos provenientes de várias localidades do Brasil são recebidos para esclarecimento diagnóstico. Foram analisadas amostras de LCR recebidas dos seguintes estados da federação: Paraná, Rio Grande do Sul, Rio de Janeiro, Minas Gerais, Espírito Santo, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Goiás, Distrito Federal, Pernambuco, Alagoas e Ceará. A **Figura 09** esquematiza de maneira simplificada a sequência de toda metodologia realizada.

3.1.1 – Coleta das Amostras

A coleta das amostras de LCR utilizadas neste trabalho foi realizada por punção líquórica, na região lombar, entre as vértebras L1 e S1, sendo mais indicados os espaços L3-L4, L4-L5 ou L5 e S1. O volume médio retirado na punção foi de 2-3 ml de LCR e o material foi armazenado em tubos apropriados estéreis a -20°C até sua chegada ao laboratório.

3.1.2 - Critérios para Inclusão e Exclusão das Amostras

Alguns critérios para inclusão e exclusão das amostras foram utilizados:

- De todos os materiais clínicos recebidos pelo laboratório, como fezes, LCRs e soros, apenas os LCRs foram utilizados no estudo, apesar de o diagnóstico poder ser também realizado através de isolamento viral a partir de material fecal e da observação de soro-conversão, ou seja, observação do aumento significativo (4x ou mais) do título de anticorpos entre os soros de fase aguda e convalescente.
- Amostras de LCRs recebidas pelo laboratório em quantidades insuficientes para uma inoculação (volume < 50 µl) não foram utilizadas no estudo, uma vez que

não seria possível a estocagem de material clínico remanescente, para uma repetição posterior, caso fosse necessário.

Estes materiais foram manipulados, de acordo com as Boas Práticas de Laboratório, visando o isolamento e/ou detecção dos agentes etiológicos envolvidos.

3.2 – Análise do Perfil dos Pacientes

Alguns aspectos dos pacientes como idade, sexo e características clínicas, como sintomas, duração da doença e período de hospitalização, foram analisados a partir das fichas que chegaram ao Laboratório de Enterovírus, recebidas junto com as amostras clínicas, permitindo traçar um perfil dos pacientes acometidos pela meningite viral no Brasil.

3.3 - Isolamento Viral em Culturas Celulares

O isolamento viral foi realizado a partir de LCRs provenientes de pacientes com quadros clínicos de meningites virais. As amostras de LCR foram inoculadas em culturas celulares, de linhagens selecionadas por permitirem a replicação de enterovírus (DAGAN; MENEGUS, 1986).

A pesquisa do vírus através da inoculação dessas amostras em culturas de células foi feita como descrito no Manual de Diagnóstico da Rede de Laboratórios de Referência para Poliomielite da Organização Mundial de Saúde - OMS (WHO, 2004). As linhagens celulares utilizadas (RD e HEp2) foram gentilmente cedidas pelo CDC (*Center for Disease Control and Prevention* – Atlanta / Georgia - USA).

Cada amostra de LCR foi inoculada (volume de 0,2 ml) em tubos contendo 1 ml de uma suspensão contendo $4,0 - 5,0 \times 10^5$ células RD (célula de linhagem contínua proveniente de rhabdomyosarcoma humano) e em tubos contendo $3,0 - 4,0 \times 10^5$ células HEp2 (célula de carcinoma epidermóide de laringe humana) e deixou-se adsorver o inóculo por 30 minutos à temperatura ambiente. Após esse tempo, adicionou-se 1,8 ml de meio mínimo essencial (MEM-Earle's) contendo 2% de soro fetal bovino. Os tubos foram incubados a 37°C e leituras diárias foram efetuadas com o auxílio de um microscópio

invertido, por sete dias consecutivos. As amostras onde foi observada a existência de efeito citopático (ECP) característico de enterovírus foram estocadas a -20°C para posterior identificação por RT-PCR. As amostras negativas na primeira passagem foram submetidas a uma segunda passagem. Para cada grupo de amostras inoculadas, foi utilizado um controle celular, onde não foi inoculada nenhuma amostra, sendo constituído apenas de células e meio mínimo essencial.

As etapas de preparação dos tubos com as culturas celulares e as etapas de inoculação das amostras nessas culturas foram procedidas em ambientes físicos separados, a fim de evitar contaminação.

3.4 - Identificação de Enterovírus Entre os Isolados

3.4.1 – RT-PCR

Para detectar os enterovírus isolados, foi utilizada a técnica de RT-PCR. O par de iniciadores (ou *primers*) utilizados nas reações (EVR e EVF) flanqueiam a região terminal 5'NC (não codificante) do RNA, que é uma região conservada e comum ao genoma de todos os enterovírus humanos conhecidos. O tamanho do fragmento amplificado esperado é de 153 pb.

A sequência do *primer* EVR (R - *Reverse*) é: ATT GTC ACC ATA AGC AGC C e a posição em que ele se complementa ao genoma é entre os nucleotídeos 596 – 578 (numeração baseada na cepa protótipo de CVA24v). Já a sequência do *primer* EVF (F - *Forward*) é: CTC CGG CCC CTG AAT GCG GCT A (nucleotídeos 466 - 445). Este par de *primers* é utilizado na rotina de diagnóstico do Laboratório de Enterovírus (dados não publicados).

Foram aliqüotados 2 μl de suspensão celular contendo vírus em tubos de 0,2 ml e este conteúdo foi aquecido a 95°C por 5 minutos para inativação viral. Após a inativação, foram acrescentados 5 μl de tampão para PCR 10X e 50 pmoles do *primer* R, e foi procedida uma etapa de desnaturação do RNA seguida de uma etapa de hibridização do *primer*, submetendo a mistura primeiro a 95°C por 5 minutos e, em seguida, colocando-a em banho de gelo. A seguir, foram adicionados ao tubo: 50 pmoles do *primer* F, 6U de *RNASin*, (Promega), que é um inibidor de RNase, 1,25 U de *Taq DNA polimerase* (Invitrogen), 4 U de transcriptase reversa (*AMV-RT*, Invitrogen), 1,0 μl de dNTP's 10mM (Invitrogen) e água deionizada autoclavada para um volume final de reação de 25 μl . A

reação de RT-PCR foi realizada com uma etapa de transcrição reversa de 42°C por 30 minutos, seguida por 30 ciclos de 45 segundos a 95°C, 45 segundos a 55°C e 45 segundos a 72°C, em termociclador *GeneAmp® PCR System 9700* (Applied Biosystems).

As reações de RT-PCR foram acompanhadas por um controle positivo e um controle negativo. Para isso, foram utilizados os mesmos reagentes e enzimas para as amostras e para os controles. Amostras conhecidas (pertencentes ao grupo dos enterovírus) foram usadas como controles positivos das reações (volume utilizado de amostra: 2 µl) e água estéril foi usada como controle negativo das reações. Este acompanhamento com os controles foi feito para verificar tanto a eficiência da reação, ou seja, se todos os reagentes estavam viáveis (Controle Positivo), quanto para verificar se houve contaminação na manipulação das amostras ou dos reagentes (Controle Negativo).

A manipulação das amostras e o preparo das misturas de enzimas e reagentes utilizados na RT-PCR foram feitos em ambientes distintos, a fim de evitar contaminação cruzada.

3.4.2 – Visualização dos Produtos Amplificados em Gel de Acrilamida

Para visualização dos produtos amplificados na RT-PCR, 11 µl de amostra foram misturados a 4,0 µl de tampão de amostra (*Loading buffer 6X*) e a mistura foi aplicada em poços de um gel de acrilamida 10%. Foi utilizado como referência de tamanho molecular, o marcador *50 bp* (Invitrogen). A corrida da eletroforese foi procedida a 200 Volts em tampão TBE (Tris-Borato-EDTA) 0,5X por 30-40 minutos e, em seguida, o gel foi corado em solução de brometo de etídio (0,1 µg/ml). Os produtos da amplificação foram visualizados em um transiluminador (luz UV).

3.5 - Identificação (Tipagem Molecular) dos Enterovírus Isolados

3.5.1 - Extração de RNA viral

As amostras virais positivas para o gênero *Enterovirus*, com o uso dos *primers* grupo-específicos (item 3.4.1), foram submetidas à extração de RNA com o uso do reagente *Trizol® LS* (Life Technologies), de acordo com o protocolo do fabricante. Este método baseia-se na desnaturação de proteínas e precipitação sequencial de ácidos nucleicos contidos no meio através do fenol, em presença de isotiocianato de guanidina,

que é um inibidor da enzima RNase. Para esta técnica, em 250 µl de suspensão viral apresentando 4+ (++++) ECP (efeito citopático total) em cultura de tecidos foram adicionados 750 µl de *Trizol*[®] LS. A mistura foi agitada por 2 minutos em um agitador tipo vortex e incubada à temperatura ambiente por 5 minutos para desintegração do capsídeo e liberação do RNA. Foram adicionados 200 µl de clorofórmio, os tubos foram vigorosamente homogeneizados por 15 segundos e incubados novamente por 5 minutos à temperatura ambiente em câmara escura. A mistura foi centrifugada a 13.400 g por 15 minutos a 8°C. O RNA presente na fase aquosa, perfazendo um volume de aproximadamente 70% do volume de *Trizol*[®] LS utilizado inicialmente (~550 µl), foi transferido para um novo tubo e o RNA foi, então, precipitado com 500 µl de álcool isopropílico, agitando-se vigorosamente por 15 segundos e deixando-se a mistura em repouso por 20 minutos à temperatura ambiente. As amostras foram centrifugadas por 20 minutos a 17.900 g a 8°C e o sobrenadante foi desprezado. O precipitado, contendo o RNA viral, foi lavado adicionando-se etanol 75%, agitando o tubo e centrifugando por 10 minutos a 17.900 g a 8°C. Após este período, o sobrenadante foi desprezado, e a lavagem foi repetida, desta vez com etanol absoluto. O precipitado, então, foi seco em um termobloco a 60°C e ressuspensão em 8 µl de água deionizada estéril para ser utilizado imediatamente na síntese de c-DNA.

3.5.2 – Síntese do c-DNA

A síntese da fita de c-DNA, foi feita em três etapas distintas: na primeira etapa, foi adicionado ao RNA extraído e ressuspensão em água deionizada autoclavada, 100 pmoles de *Oligo-dT* (Promega), o tubo foi homogeneizado e a mistura foi incubada a 70°C por 10 minutos. Em seguida, na segunda etapa, foram adicionados 4 µl de tampão *5X first strand c-DNA* (Invitrogen), 2 µl de Di-Thio-Treitol (*DTT*, Invitrogen) 0,1 M, 1,5 µl de dNTP's 10 mM (Invitrogen), 0,5 µl de *RNAsin* (Promega) e 1,0 µl de água deionizada autoclavada. O tubo foi homogeneizado e a mistura foi incubada a 42°C por 1 minuto. Finalmente, foram adicionadas 20U da enzima transcriptase reversa (*AMV-RT*, Invitrogen) e a nova mistura foi submetida a uma incubação de 42°C por 50 minutos. Ao final, o c-DNA foi armazenado a -20°C. Todas as incubações da síntese de c-DNA foram feitas em termociclador *GeneAmp*[®] *PCR System 9700* (Applied Biosystems).

3.5.3 – Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

A reação em cadeia da polimerase (PCR) foi feita conforme descrito por OBERSTE e colaboradores (1999): adiciona-se 3 µl de c-DNA a uma mistura (*mix*), composta de 5 µl de tampão para PCR 10 X concentrado, 50 pmoles de cada *primer* (R e F), chamados, no caso deste estudo, respectivamente, 222 e 292, que amplificam 357 pb do gene que codifica para a VP1, 1,0 µl de dNTP's 10 mM (Invitrogen), 2,5 U da enzima *Platinum*[®] *Taq DNA polimerase* (Invitrogen) e água deionizada autoclavada para completar um volume final de reação de 50 µl. A reação de PCR teve uma etapa preliminar de ativação da enzima *Platinum*[®] *Taq DNA polimerase*, que consistiu em submeter a mistura a 94°C por 1,5 minuto. Em seguida, essa mistura foi submetida a 35 ciclos, sendo 30 segundos a 94°C, 45 segundos a 42°C e 30 segundos a 60°C, e a uma extensão final de 7 minutos a 72°C em termociclador *GeneAmp*[®] *PCR System 9700* (Applied Biosystems).

A sequência do *primer* reverso (R - *Reverse*) 222 é: CIC CIG GIG GIA YRW ACA T. A posição em que ele se complementa ao genoma é entre os nucleotídeos 2969 e 2951 (numeração baseada na cepa padrão de poliovírus Mahoney). E a sequência do *primer* 292 (F - *Forward*) é: MIG CIG YIG ARA CNG G (nucleotídeos 2628 – 2613) (OBERSTE et al., 1999; OBERSTE et al., 2003) (I= Inosina; Y= C / T; W= A / T; M= A / C; R= A / G; N= A / C / G / T).

As reações de PCR foram acompanhadas por um controle positivo e um controle negativo. Para isso, foi utilizando o mesmo *mix* das amostras nos controles. Os c-DNAs de amostras conhecidas (pertencentes ao grupo dos enterovírus) foram usados como controles positivos das reações. Água deionizada estéril foi usada como controle negativo das reações.

Para evitar contaminação entre as amostras e os produtos amplificados, a extração do RNA viral e o preparo das misturas de enzimas e reagentes utilizados na síntese do c-DNA e na PCR foram feitos em ambientes distintos.

3.5.4 – Visualização dos Produtos Amplificados em Gel de Agarose

Para visualização dos produtos da PCR, as amostras (50 µl), foram acrescidas de 8,2 µl de *Loading buffer 6X* e aplicadas em gel de agarose a 1%, em tampão TAE (Tris-Acetato-EDTA) 1X, contendo brometo de etídio (1,8 µl da solução estoque a 10 mg/ml), utilizando marcador de tamanho molecular 50 bp (Invitrogen) como referência. A corrida da eletroforese foi procedida a 130 Volts em tampão TAE (Tris-Acetato-EDTA) 1X por

30-40 minutos. Os produtos amplificados foram visualizados em um transiluminador (luz UV) e estas bandas foram cortadas e retiradas do gel de agarose para eluição do DNA.

3.5.5 - Eluição do DNA

Os produtos da PCR compatíveis com o tamanho esperado (357 pb) foram extraídos do gel de agarose, purificados com o uso do Kit “*QIAquick® Gel Extraction*” (Qiagen), de acordo com o protocolo fornecido pelo fabricante.

Após as bandas terem sido cortadas, elas foram pesadas e foi adicionado tampão QG, na proporção de 300 µl de tampão QG / 100 mg de gel. Os tubos foram incubados por 10 minutos a 50°C, com homogeneizações a cada 3 minutos durante a incubação. Após o gel ser integralmente dissolvido, foi transferido para colunas conectadas a um tubo coletor, e esses tubos foram centrifugados por 1 minuto a 15.700 g. Ao fim da centrifugação, o filtrado foi descartado em frasco exclusivo para o descarte de tampão QG. Foram adicionados mais 200 µl de tampão QG para remover os resíduos de agarose e os tubos foram centrifugados novamente por 1 minuto a 15.700 g. O filtrado foi descartado novamente, e, para a lavagem da coluna, foram adicionados 500 µl de tampão PE, contendo etanol; os tubos foram centrifugados por 1 minuto a 15.700 g, o filtrado foi descartado e os tubos foram novamente centrifugados, para garantir que todo o resíduo de etanol tenha sido removido da coluna. Cada coluna foi separada do tubo coletor e colocada num tubo de 1,5 ml estéril devidamente identificado. O DNA foi eluído da coluna adicionando-se 50 µl de tampão EB no centro da coluna e incubando-se a mesma por 1 minuto a temperatura ambiente. Após esse período, a coluna foi centrifugada por 1 minuto a 15.700 g e o DNA eluído foi estocado a -20°C.

3.5.6 - Quantificação da Concentração de DNA

Os produtos de PCR eluídos do gel foram, então, quantificados através da comparação, em gel de agarose 1%, com um marcador de massa molecular *Low DNA Mass Ladder* (Invitrogen). Foram utilizados para essa quantificação 4 µl do DNA adicionados de 2 µl de *Loading buffer* 6X e 6 µl de água deionizada autoclavada. As amostras foram aplicadas no gel contendo brometo de etídio (1,8 µl da solução estoque a 10 mg/ml).

3.5.7 – Reações Cíclicas de Sequenciamento (*Cycle-Sequencing*)

As concentrações de DNA utilizadas para as reações de *cycle-sequencing* foram padronizadas em função do tamanho do fragmento. Concentrações entre 100-120 ng/µl de

DNA foram suficientes para produzir eletroferogramas que forneciam leituras confiáveis das sequências. Foi utilizado o kit “ABI BigDye[®] Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction v3.1”, de acordo com o protocolo fornecido pelo fabricante (PE Applied-Biosystems). O fundamento do método de sequenciamento do kit utilizado é baseado na marcação com fluorescência dos dideoxinucleotídeos (ddNTP's) incorporados às cadeias de DNA com tamanhos variáveis formadas durante a reação. As reações continham os seguintes componentes: 5 pmoles de um *primer* (reverso ou senso – R ou F, em cada um dos tubos), 4,0 µl do tampão de sequenciamento fornecido pelo kit, 4,0 µl do Big Dye[®] Terminator, e o DNA, na concentração de 120 ng. Estas reações foram realizadas em termociclador GeneAmp[®] PCR System 9700 (Applied Biosystems), com 25 ciclos de 15 segundos a 95°C, 30 segundos a 42°C e 3 minutos a 60°C.

3.5.8 – Purificação dos Produtos de *Cycle-Sequencing*

Os produtos das reações de *cycle-sequencing* foram purificados por precipitação com álcool isopropílico. Em tubos tipo eppendorf de 1,5 ml, foram adicionados: o produto da reação (20 µl), 20 µl de água estéril e 60 µl de álcool isopropílico absoluto. O conteúdo do tubo foi brevemente agitado (em vórtex) e deixado em repouso por 15 minutos para a precipitação do produto. Em seguida, foi centrifugado, por 20 minutos a 15.700 g. O sobrenadante foi desprezado e foram adicionados 250 µl de álcool isopropílico 75%; a mistura foi rapidamente agitada e centrifugada novamente, por 5 minutos a 15.700 g. O sobrenadante foi desprezado e o material foi completamente seco a vácuo (*SVC100 Speed-Vac*, Savant Instruments).

O preparo das misturas de enzimas e reagentes utilizados no *cycle-sequencing*, a manipulação e a purificação destes produtos foram feitos em ambientes distintos, a fim de evitar contaminação cruzada entre os produtos do *cycle-sequencing*.

3.5.9 - Análise das Sequências (Determinação da Identidade Viral)

As amostras purificadas foram ressuspensas em 20 µl de tampão TSR (*Template Suppression Reagent* – Applied Biosystems) e aquecidas a 95°C em termobloco por 3 minutos para desnaturação, evitando a formação de estruturas secundárias. As amostras foram imediatamente colocadas em banho de gelo até serem analisadas.

As sequências nucleotídicas obtidas nas reações de *cycle-sequencing*, utilizando-se um dos *primers*, 222 ou 292, foram analisadas em um sequenciador automático PE 310

Genetic Analyser e editadas, quando necessário, utilizando o programa Bio-Edit 7.0 (HALL, 1999). Posteriormente, elas foram comparadas com o banco de dados contido no *GenBank* através do programa Blast, para determinação do sorotipo e confirmação da identidade viral (ALTSCHUL et al., 1990).

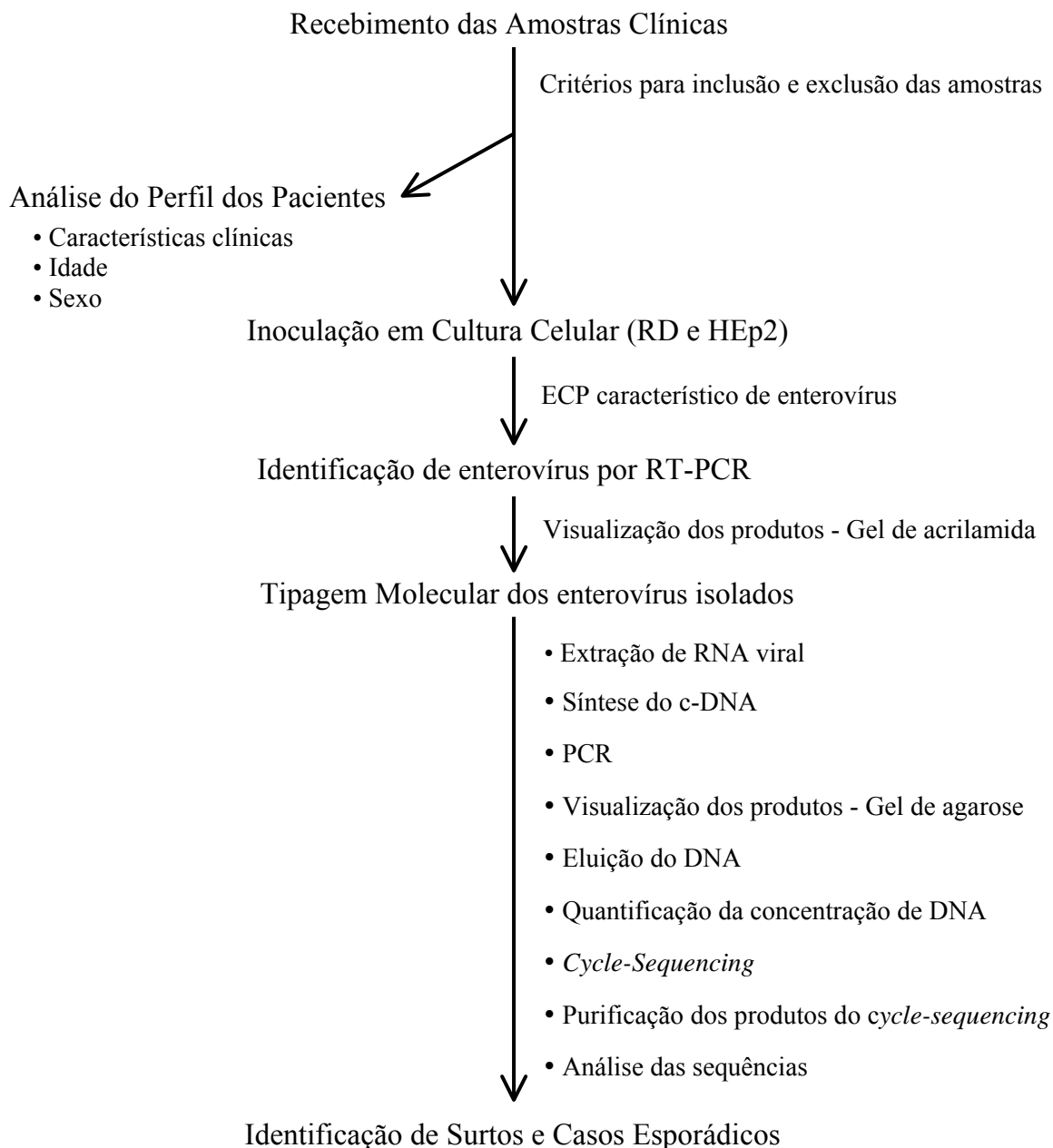
3.6 – Identificação e Confirmação de Surtos e Casos Esporádicos

A confirmação dos surtos foi realizada em conjunto com as Secretarias Estaduais de Saúde e com seus Laboratórios Centrais (LACENS) e Secretarias de Vigilância Epidemiológica, que verificaram um indício de elevação na frequência de notificações de casos de meningite viral em algumas localidades do país, diagnosticando uma possível situação epidêmica, restando saber se o agente viral envolvido era comum a todos os casos.

O papel do Laboratório de Enterovírus foi realizar a identificação dos agentes etiológicos envolvidos nestes casos, por sequenciamento nucleotídico parcial do genoma viral, colaborando para a confirmação da suspeita de surtos levantada nas investigações epidemiológicas. Esta etapa do trabalho foi realizada de acordo com o Guia de Vigilância Epidemiológica (BRASIL, 2002) e o Manual de Diagnóstico da Rede de Laboratórios de Referência para Poliomielite da Organização Mundial de Saúde - OMS (WHO, 2004).

Os casos não relacionados geograficamente ou temporalmente com aqueles ocorridos nos surtos foram considerados casos esporádicos de meningite viral.

Figura 09 – Fluxograma Simplificado da Metodologia Realizada.



4 - RESULTADOS

4 - RESULTADOS

4.1 – Amostras Clínicas

Durante o período entre dezembro de 1998 e dezembro de 2003, o Laboratório de Enterovírus recebeu 1022 amostras de LCR provenientes de pacientes apresentando quadros de meningite viral, de vários estados do Brasil. O número médio de amostras de LCR recebidas por ano foi de 198.

Durante o período de estudo, o recebimento de amostras de LCR oscilou entre uma e 136 amostras por mês. Estes dados são mostrados na **Figura 10**. A frequência anual de casos recebidos pelo Laboratório de Enterovírus durante o período de estudo estão na **Tabela 03**.

Figura 10 – Distribuição Temporal de Casos de Meningite Viral no Brasil Recebidos pelo Laboratório de Enterovírus (Dezembro de 1998 – Dezembro de 2003).

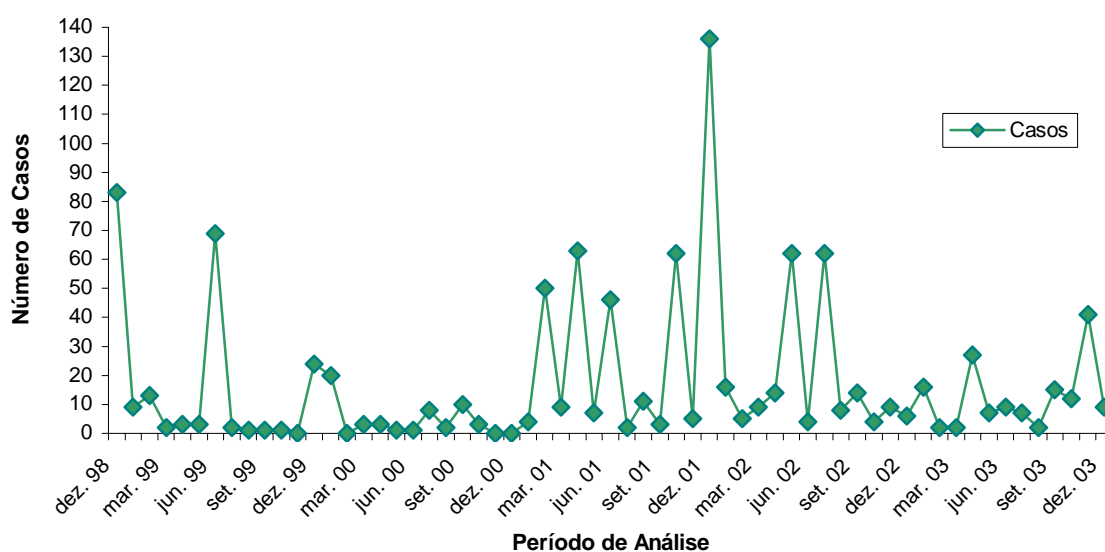


Tabela 03 - Frequência Anual de Casos de Meningite Viral no Brasil Recebidos pelo Laboratório de Enterovírus (Dezembro de 1998 – Dezembro de 2003).

Ano	Número total de casos
1998	83
1999	128
2000	52
2001	397
2002	213
2003	149
Total	1022

4.2 – Análise do Perfil dos Pacientes

Entre os 648 pacientes que tiveram a idade informada (648/1022 – 63,4%), esta variou de 28 dias a 68 anos. Quase metade destes pacientes (294/648 – 45,3%) tinha entre 2 e 6 anos. A idade média, considerando todos os pacientes com a idade informada, foi 7,9 anos.

Entre os pacientes com o sexo informado (830/1022 – 81,2%), haviam 488 indivíduos do sexo masculino (58,7%) e 342 do sexo feminino (41,2%). Informações clínicas de 561 (54,8%) dos 1022 pacientes puderam ser analisadas através das fichas que foram enviadas juntamente com as amostras ao laboratório. Os sintomas mais comuns foram febre (432/561 – 77,0% dos pacientes), cefaléia (390/561 – 69,5%), ânsia de vômito (400/561 – 71,3%) e rigidez na nuca (232/561 – 41,3%). Outros sintomas apresentados foram convulsão (40/561 – 7,1%), diarreia (21/561 – 3,7%), náuseas (12/561 – 2,1%) e coma (7/561 – 1,2%). Meningite viral e meningite não especificada foram os diagnósticos clínicos mais comuns. A duração média da doença, incluindo os casos em que houve hospitalização, foi de 4 dias (amplitude: 1 a 9 dias). A recuperação da maioria dos pacientes deu-se sem complicações. Entretanto, houve óbito de cinco pacientes. Estes pacientes tinham idade entre 10 meses e sete anos e não houve isolamento viral em seus materiais clínicos. A **Tabela 04** mostra mais detalhes destes dados.

Tabela 04 – Dados Clínico-Epidemiológicos dos Pacientes com Meningite Viral.

Aspectos analisados	Total de casos analisados (1022)		
	Número total de pacientes com dados informados	Nº	%*
Sexo			
Masculino	830	488	58,7
Feminino		342	41,2
Faixa etária			
< 1 ano		104	16,0
2 - 6 anos	648	294	45,3
7 - 12 anos		163	25,1
13 - 17 anos		39	6,0
18 - 25 anos		20	3,0
> 26 anos		28	4,3
Sintomas			
Cefaléia		390	69,5
Febre		432	77,0
Ânsia de vômito	561	400	71,3
Rigidez na nuca		232	41,3
Convulsão		40	7,1
Diarréia		21	3,7
Náuseas		12	2,1
Coma		7	1,2
Período de hospitalização			
Até 24 h	233	41	17,5
2 - 5 dias		167	71,6
6 - 9 dias		25	10,7

* - Estes percentuais são baseados no número de pacientes com dados informados.

4.3 - Isolamento Viral em Cultura Celular

Das 1022 amostras de LCR, 162 (15,8%) tiveram isolamento viral em cultura de células RD e / ou HEp2, apresentando efeito citopático característico de enterovírus. A **Tabela 05** mostra as taxas de isolamento em todos os casos envolvidos no estudo.

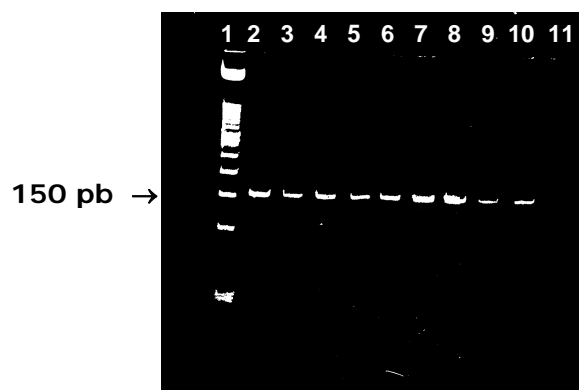
Tabela 05 - Taxas de Isolamento de Enterovírus (EV) nos LCRs de Todos os Casos de Meningite Viral Recebidos pelo Laboratório de Enterovírus (Dezembro de 1998 – Dezembro de 2003).

	Número de casos	Número de isolamentos de EV	Taxa de isolamento
Casos em surtos	288	103	35,7%
Casos esporádicos	734	59	8,0%
Total	1022	162	15,8%

4.4 - Identificação de Enterovírus entre os Isolados por RT-PCR

A reação de RT-PCR foi procedida para confirmar o resultado do isolamento viral, e para confirmar se o vírus isolado pertencia ao grupo enterovírus. Entre as 162 amostras que apresentaram efeito citopático característico de enterovírus, todas (162) foram também positivas por RT-PCR. Fragmentos de 153 pb, que é o esperado para o par de *primers* utilizado (EVR e EVF), foram obtidos. A **Figura 11** mostra o perfil eletroforético destes produtos amplificados.

Figura 11 – Perfil Eletroforético dos Produtos Amplificados por RT-PCR, para a Identificação do Grupo Enterovírus, Utilizando o Par de *Primers* EVR-EVF (153 pb).

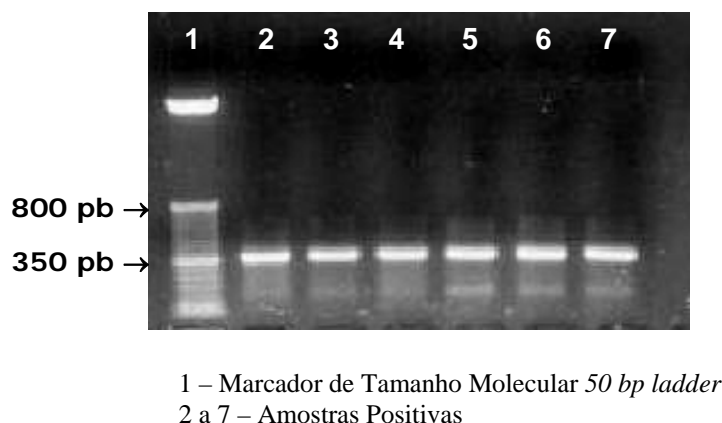


1 – Marcador de Tamanho Molecular 50 bp ladder
 2 a 9 – Amostras Positivas
 10 e 11 – Controles positivo (10) e Negativo (11)

4.5 - Identificação (Tipagem Molecular) dos Enterovírus Isolados

Para a determinação da identidade viral dos enterovírus envolvidos nos casos de meningite viral, foram procedidas reações de PCR com todas as amostras positivas para o RT-PCR, após extração do RNA viral e construção do c-DNA. O par de *primers* utilizado (222-292) flanqueia um fragmento de 357 pb, dentro do gene que codifica para a VP1. Na **Figura 12** pode ser observado o perfil eletroforético destes produtos amplificados.

Figura 12 – Perfil Eletroforético dos Produtos Amplificados, por PCR, para a Tipagem Molecular dos Enterovírus Envolvidos nos Casos de Meningite Viral, Utilizando o Par de *Primers* 222-292 (357 pb).



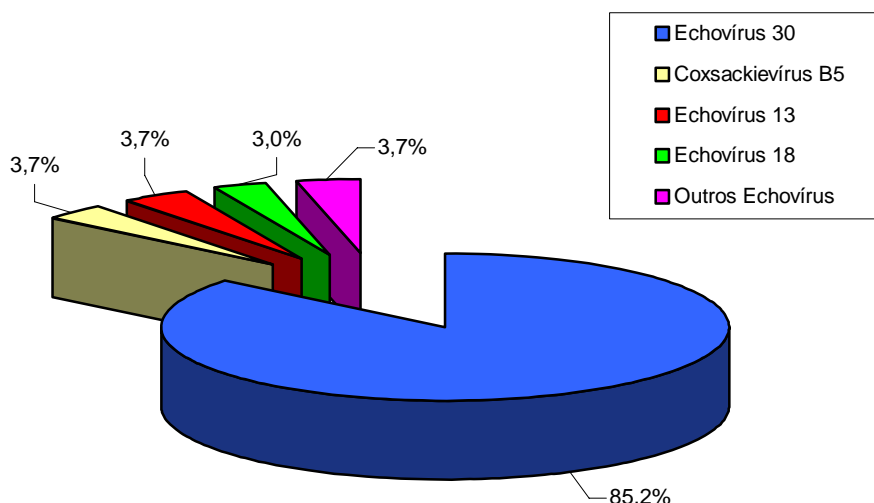
Com estes produtos amplificados, encontrados também em todas as 162 amostras, foram procedidas etapas de eluição do DNA a partir do gel de agarose, quantificação da concentração de DNA, *cycle-sequencing* e purificação com álcool isopropílico.

Após a análise das sequências e comparação com outras sequências depositadas no *GenBank*, através do programa Blast, as amostras foram identificadas e tiveram seus sorotipos conhecidos.

A incidência de echovírus 30, como o agente etiológico dos casos esporádicos e surtos de meningite analisados pelo laboratório foi de 13,6% (139/1022). Considerando os casos em que houve isolamento viral, echovírus 30 foi o agente identificado em 85,2% destes (139/162). Echovírus 13 foi identificado em seis amostras provenientes de surto

(6/162 - 3,7%). Além disso, coxsackievírus B5 foi identificado em seis amostras (3,7%), echovírus 18 em 5 amostras (5/162 - 3,0%), echovírus 25 em duas amostras (1,2%), echovírus 6 em duas amostras (1,2%), e echovírus sorotipos 1 e 4 em uma amostra cada (0,6%, cada), todas provenientes de casos esporádicos. Estes dados são ilustrados na **Figura 13**.

Figura 13 – Frequência de Enterovírus Isolados a Partir de LCR Provenientes de Casos de Meningite Viral Ocorridos no Brasil (Dezembro de 1998 – Dezembro de 2003).



4.6 – Identificação e Confirmação de Surtos e Casos Esporádicos

Ao longo do período do estudo, foram detectados cinco surtos no Brasil, através da identificação dos agentes envolvidos, por sequenciamento nucleotídico parcial do genoma viral. A confirmação destes surtos foi realizada em conjunto com as Secretarias Estaduais de Saúde e Secretarias de Vigilância Epidemiológica Estaduais.

Os surtos foram caracterizados por um aumento significativo no número de casos em agrupados em pequenos intervalos de tempo, e numa mesma localidade. Estes fatos foram observados pelas Secretarias de Vigilância Epidemiológica Estaduais, as quais

possuem os dados sobre todos os casos notificados de diversas doenças, além da meningite viral.

O primeiro surto ocorreu no estado do Paraná, na cidade de Londrina, (população em 1998: 426.609 habitantes), na região sul do Brasil, provavelmente entre os meses de novembro de 1998 e janeiro de 1999 (semanas epidemiológicas 44 de 1998 a 9 de 1999). Segundo a Vigilância Epidemiológica Estadual, foram notificados 325 casos neste surto. O Laboratório Central Estadual (LACEN-PR) enviou ao Laboratório de Enterovírus 101 amostras de LCR, cujos pacientes tinham idade entre quatro meses e 12 anos, em sua maioria. Destas 101 amostras, 35 tiveram o agente etiológico identificado, por sequenciamento nucleotídico parcial, como echovírus 30. Nas demais amostras não houve isolamento viral em culturas celulares RD e HEp2.

O segundo surto, na cidade de Ponta Grossa, também no Paraná (população em 2000: 273.616 habitantes), provavelmente ocorreu entre dezembro de 2000 e janeiro de 2001 (semanas epidemiológicas 49 de 2000 a 5 de 2001), com 48 amostras analisadas (dos 90 casos notificados) no laboratório, dentre as quais 15 tiveram echovírus 30 identificado. A idade da maioria dos pacientes envolvidos neste surto oscilou entre um e 12 anos.

O terceiro surto identificado e confirmado também ocorreu no estado do Paraná, na cidade de Ibiporã (população em 2001: 43.045 habitantes), em pacientes com idade entre dois meses e 14 anos. Ele provavelmente ocorreu entre os meses de outubro e novembro de 2001 (semanas epidemiológicas 40 a 48), e, das 56 amostras enviadas ao Laboratório de Enterovírus, em 21 foi identificado echovírus 30 como agente viral.

O quarto surto ocorreu na cidade de Recife (população em 2002: 1.449.136 habitantes), capital do estado de Pernambuco, no nordeste do país, provavelmente entre abril e junho de 2002 (semanas epidemiológicas 14 a 26). Segundo a Vigilância Epidemiológica Estadual, 80 casos foram notificados neste surto. O Laboratório de Enterovírus recebeu 70 amostras do LACEN-PE, provenientes de pacientes com idade entre 1 e 11 anos. Destas amostras, 26 tiveram o agente etiológico identificado, por sequenciamento nucleotídico parcial, como sendo echovírus 30.

O quinto surto, na cidade de Horizontina, estado do Rio Grande do Sul (população em 2003: 17.907 habitantes), provavelmente ocorreu em março de 2003 (semanas epidemiológicas 10 a 13), acometendo principalmente crianças de 3 a 12 anos. Segundo a Vigilância Epidemiológica Estadual, foram notificados 13 casos neste surto. Das 13 amostras recebidas pelo Laboratório de Enterovírus, echovírus 30 foi o agente viral identificado em seis delas.

A taxa de isolamento viral observada nos diferentes surtos ocorridos durante o período de estudo foi de 35,7% (103/288).

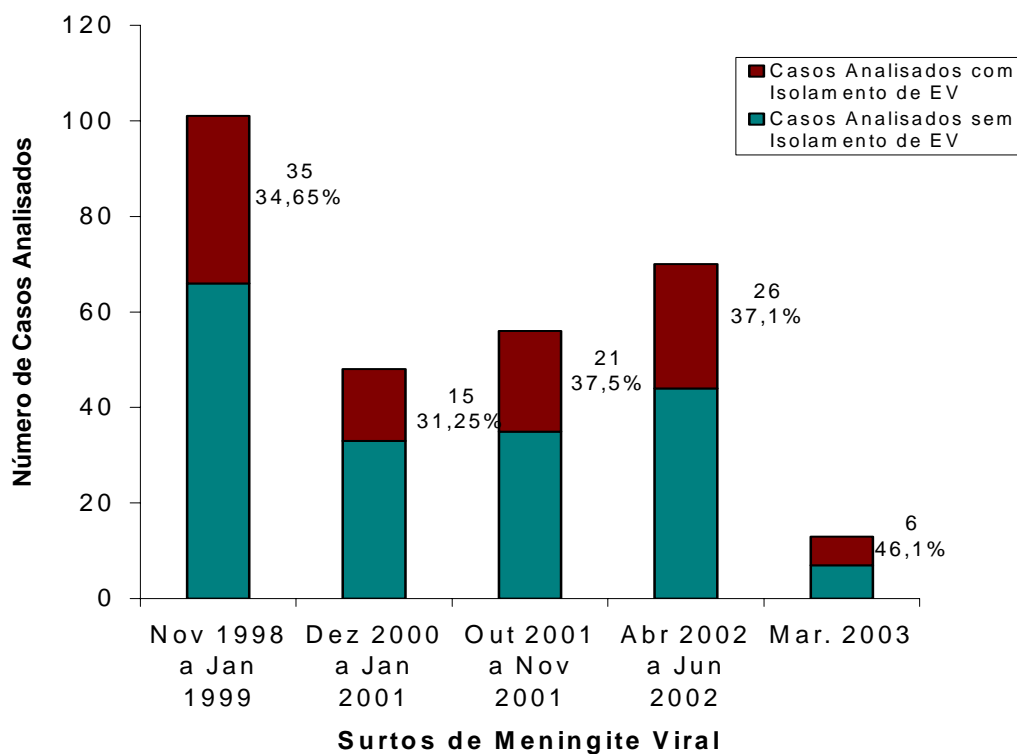
O número de surtos de meningite viral, suas localizações, período provável de ocorrência, número de amostras analisadas e enterovírus associados são mostrados na **Tabela 06**. A **Figura 14** consiste numa curva epidêmica destes cinco surtos e sua associação com enterovírus.

Devido à falta de informações essenciais, as causas e o modo de transmissão dos enterovírus nos surtos não foram definidos. O único aspecto observado foi o período do aparecimento dos casos, que foram notificados no verão e outono, demonstrando o padrão sazonal de circulação característico de enterovírus.

Tabela 06 – Resumo das Características Geográficas, Temporais e os Diagnósticos Associados aos Cinco Surtos de Meningite Viral no Brasil, entre Dezembro de 1998 e Dezembro de 2003.

	Localização geográfica	Período provável de ocorrência	Número de amostras analisadas		EV associado
			Total	Amostras com isolamento de EV (%)	
Surto 1	Londrina, Paraná	novembro 1998 a janeiro 1999	101	35 (34,6%)	echovírus 30
Surto 2	Ponta Grossa, Paraná	dezembro 2000 a janeiro 2001	48	15 (31,2%)	echovírus 30
Surto 3	Ibiporã, Paraná	outubro a novembro 2001	56	21 (37,5%)	echovírus 30
Surto 4	Recife, Pernambuco	abril 2002 a junho 2002	70	26 (37,1%)	echovírus 30
Surto 5	Horizontina, Rio Grande do Sul	março 2003	13	6 (46,1%)	echovírus 13

Figura 14 – Curva Epidêmica dos Cinco Surtos de Meningite Viral Ocorridos no Brasil, no Período entre Dezembro de 1998 e Dezembro de 2003.



Além dos surtos, 734 casos esporádicos de meningite viral foram identificados no período do estudo, nos estados do Paraná, Rio de Janeiro, Rio Grande do Sul, Mato Grosso do Sul, Mato Grosso, Espírito Santo, Alagoas, Minas Gerais, Distrito Federal, Goiás e Ceará. Entre estes casos esporádicos, 59 apresentaram isolamento viral, os quais foram confirmados por RT-PCR. A taxa de isolamento viral nos casos esporádicos foi de 8,0% (59/734). Echovírus 30 foi o agente etiológico da maioria destes casos, tendo sido identificado em 42 amostras (42/59 – 71,1%). Coxsackievírus B5, echovírus sorotipos 25, 18, 6, 4 e 1 também foram responsáveis por alguns casos esporádicos de meningite viral. Dados mais detalhados estão na **Tabela 07**.

Tabela 07 – Distribuição Anual de Casos Esporádicos de Meningite Viral, Recebidos e Analisados pelo Laboratório de Enterovírus (Dezembro de 1998 – Dezembro de 2003).

Ano	Número de casos analisados	Resultado /Agente etiológico	Taxa de isolamento (%)	Localidade
1998	1	1 Negativo	0/1 (0%)	RJ
1999	109	2 echovírus 30 107 Negativos	2/109 (1,8%)	PR PR, RJ, MT e MS
2000	52	3 echovírus 30 2 coxsackievírus B5 47 Negativos	5/52 (9,6%)	PR e RS PR e RJ PR, RJ e RS
2001	306	16 echovírus 30 3 coxsackievírus B5 2 echovírus 25 1 echovírus 18 1 echovírus 6 283 Negativos	23/306 (7,5%)	PR e RJ PR e RJ PR e RJ PR RJ PR, RJ, RS e ES
2002	130	18 echovírus 30 1 coxsackievírus B5 3 echovírus 18 1 echovírus 6 1 echovírus 4 1 echovírus 1 105 Negativos	25/130 (19,2%)	PR, RJ e RS PR PR e RJ RJ RJ RJ PR, RJ, RS, DF, AL e MG
2003	136	3 echovírus 30 1 echovírus 18 132 Negativos	4/136 (2,9%)	PR e RJ RJ PR, RJ, GO e CE
Total	734		59/734 (8,0%)	

Legenda: RJ – estado do Rio de Janeiro; PR – estado do Paraná; MT - Mato Grosso; MS – Mato Grosso do Sul; RS - Rio Grande do Sul; ES – Espírito Santo; DF – Distrito Federal; AL – Alagoas; MG – Minas Gerais; GO – Goiás; CE – Ceará.

5 - DISCUSSÃO

5 – DISCUSSÃO

O objetivo principal deste trabalho foi o estudo dos enterovírus associados a casos esporádicos e a surtos de meningite viral ocorridos no Brasil no período de dezembro de 1998 a dezembro de 2003, e a análise do perfil dos pacientes acometidos pela doença.

Não são encontrados, na literatura, estudos sistemáticos sobre os agentes etiológicos envolvidos nos casos de meningite viral no Brasil. TRALLERO e colaboradores (2000), MCINTYRE e KEEN (1993) e BAHRI e colaboradores (2005) desenvolveram estudos semelhantes a este, na Espanha, África do Sul e Tunísia, respectivamente, sendo que MCINTYRE e KEEN (1993) trataram apenas da meningite viral, enquanto que os outros grupos analisaram também outras doenças causadas por enterovírus. A maioria das publicações referentes a meningite viral descrevem casos ou surtos (BAILY et al., 2002; SOMEKH et al., 2003; BERNIT et al., 2004), ou apresentam o desenvolvimento ou aprimoramento de técnicas de diagnóstico para a doença (ROTBART, 1995; CHESKY et al., 2000; JACQUES et al., 2003).

A análise do perfil dos pacientes acometidos pela doença foi desenvolvida observando alguns dados que constavam na ficha de cada paciente. Características epidemiológicas, como idade e sexo, e características clínicas, como sintomas, duração da doença e período de hospitalização foram levados em consideração.

A idade dos pacientes apresentando quadros de meningite viral, durante o período analisado, variou de 28 dias a 68 anos, com uma idade média de 7,9 anos, e uma morbidade significativa (45,37%) em crianças pertencentes à faixa etária de dois a seis anos. Estes dados são coincidentes com os encontrados na literatura (TRALLERO et al., 2003) e sugerem que a maioria dos casos de meningite por enterovírus ocorrem em faixas etárias baixas.

Como mostram os resultados percentuais da análise do sexo dos pacientes (58,79% eram do sexo masculino e 41,20% do sexo feminino), houve uma leve predominância na ocorrência de casos em indivíduos do sexo masculino, demonstrando que a meningite viral acomete indivíduos de ambos os sexos. HUANG e colaboradores (2003) encontraram uma proporção semelhante entre indivíduos do sexo masculino e feminino (57% e 43%, respectivamente) em um surto causado por echovírus 33 na Nova Zelândia.

Os enterovírus isolados e identificados neste estudo eram provenientes de pacientes sintomáticos. Os sintomas predominantemente relatados foram febre (77,00%), cefaléia

(69,51%), ânsia de vômito (71,30%), rigidez na nuca (41,35%), convulsão (7,13%) e diarreia (3,74%). De modo geral, tanto os pacientes com LCR apresentando isolamento viral positivo, quanto aqueles com LCR negativo relataram os mesmos sintomas. A presença de sintomatologia clínica típica em pacientes com meningite viral está em concordância com outros autores (RICE et al., 1995; MAGUIRE et al., 1999).

A evolução clínica dos pacientes, sem sequelas ou complicações, que consistiram na maior parte dos casos, concorda com a maioria dos estudos sobre meningite de etiologia viral (NELSEN et al., 1993; MEROVITZ et al., 2000). Entretanto, alguns pacientes apresentaram complicações, como convulsão e coma, e cinco óbitos decorrentes da doença foram observados. Estes tipos de complicações também já foram descritos (MODLIN et al., 1991).

A duração média do período de hospitalização foi de quatro dias (oscilando entre 1 e 9 dias), estando de acordo com os dados reportados por MEQDAM e colaboradores, em estudo de meningites causadas por enterovírus na Jordânia (2002).

O estudo dos agentes responsáveis pelos casos de meningite viral ocorridos no Brasil entre dezembro de 1998 e dezembro de 2003 compreendeu algumas etapas, como o isolamento e a identificação molecular dos agentes etiológicos, e etapas de identificação e confirmação de surtos, além do estudo da frequência de ocorrência dos enterovírus nestes surtos e em casos esporádicos de meningite viral. Pelo fato de o Laboratório de Enterovírus ser Referência para Paralisia Flácida Aguda (poliomielite) e Meningite Viral, ele recebe materiais clínicos para esclarecimento diagnóstico provenientes de diversas regiões do país.

A rotina do Laboratório de Enterovirus consiste em isolar e identificar vírus provenientes de amostras de fezes e LCR, de casos de poliomielite e meningite viral, entre outras infecções, através de culturas de células, e das técnicas de soroneutralização (somente para poliovírus), PCR, RT-PCR e sequenciamento nucleotídico. Nos casos de meningite, o isolamento viral desta última origem (LCR) tem uma grande significância e é considerado o melhor e mais confiável material clínico para o diagnóstico (ROTBART, 1995).

As técnicas utilizadas neste trabalho, como o isolamento viral em cultura celular, RT-PCR para identificação de enterovírus nestes isolados, e o sequenciamento nucleotídico para a identificação do tipo molecular dos enterovírus responsáveis pelos casos de meningite, mostraram-se bastante eficientes. O sequenciamento nucleotídico tem sido utilizado, recentemente, em diversos estudos de diagnóstico envolvendo inúmeros

agentes etiológicos, como enterovírus (THOELLEN et al., 2003; HUANG et al., 2003) e outros vírus, como adenovírus (DE AZEVEDO et al., 2004) e HTLV (BONI et al., 2004), que não são visualizados ou detectados com facilidade e, por isso, requerem técnicas de identificação altamente específicas e sensíveis.

O uso do sequenciamento nucleotídico com fins de tipagem molecular viral é favorecido quando comparado com a sorologia devido à dificuldade de obtenção de soros imunes específicos para os mais de 60 sorotipos de enterovírus humanos. E, devido às altas taxas de mutação nos genomas destes vírus, os soros imunes disponíveis (MELNICK; WINBERLY, 1985) não neutralizam ou neutralizam fracamente alguns sorotipos de enterovírus. Além disso vários novos sorotipos de enterovírus tem sido recentemente descritos (OBERSTE et al., 2005) e soros imunes contra estes novos agentes não estão disponíveis.

Neste trabalho, foi realizado o sequenciamento parcial do gene que codifica para a proteína VP1 para a identificação dos sorotipos de enterovírus responsáveis pelos casos de meningite. Esta região genômica foi escolhida porque a VP1 é a maior proteína do capsídeo viral, que compreende o principal epitopo dos enterovírus, possuindo vários sítios antigênicos e determinantes de neutralização específicos (HOGLE; CHOW; FILMAN, 1985). OBERSTE e colaboradores (1999) demonstraram que a análise das sequências nucleotídicas contidas neste fragmento do gene VP1 presta-se de maneira confiável à identificação dos diferentes sorotipos de enterovírus.

Os resultados da identificação dos tipos moleculares de enterovírus causadores de meningite realizada neste estudo, demonstrou que echovírus 30 foi o vírus mais frequentemente isolado (139 amostras das 162 com isolamento viral positivo – 85,27%). Outros enterovírus também foram identificados neste estudo, em menor frequência, como coxsackievírus B5 (6/162 - 3,70%), echovírus 1 (1/162 - 0,61%), echovírus 4 (0,61%), echovírus 6 (1,22%), echovírus 13 (3,70%), echovírus 18 (3,08%) e echovírus 25 (1,23%).

Durante os últimos anos, echovírus 30 foi o agente viral predominante implicado em meningites virais na Espanha, com 16 surtos e numerosos casos esporádicos (TRALLERO et al., 2000) e em outros locais, como Bélgica (DRUYTS-VOETS, 1997), Suíça (GIORGIEVSKI-HRISOHO et al., 1998), Taiwan (HSU et al., 1995) e Austrália (GOSBELL et al., 2000), indicando uma circulação mundial ativa deste sorotipo.

Também há relatos de diversos outros sorotipos de enterovírus identificados como causa de meningite. Na Bélgica, THOELLEN e colaboradores (2003) identificaram além de Echovirus 30, os seguintes sorotipos de enterovírus: echovírus 13, echovírus 6 e

Coxsackievirus B5. TRALLERO e colaboradores (2000), na Espanha, também identificaram echovírus 6 e coxsackievírus B5, e além destes, echovírus 9 e echovírus 4.

Na identificação de surtos de meningite viral no período do estudo, realizada em colaboração com as Secretarias de Vigilância Epidemiológica dos estados do Paraná, Pernambuco e Rio Grande do Sul, foram identificados e confirmados cinco surtos de meningite viral. Os três primeiros surtos ocorreram no estado do Paraná, o quarto no estado de Pernambuco e o quinto no Rio Grande do Sul. O primeiro ocorreu na cidade de Londrina, provavelmente entre dezembro de 1998 e fevereiro de 1999, acometendo 325 indivíduos, e teve 101 amostras analisadas pelo Laboratório de Enterovírus. O segundo surto, na cidade de Ponta Grossa, teve 48 amostras recebidas e analisadas pelo laboratório, e ocorreu entre dezembro de 2000 e janeiro de 2001. O terceiro ocorreu na cidade de Ibiporã, provavelmente entre outubro de 2001 e novembro de 2001, tendo 56 amostras analisadas. Já o quarto surto, ocorreu na cidade de Recife, entre abril e junho de 2002, e acometeu 80 indivíduos, e teve 70 amostras analisadas no laboratório. O quinto surto, na cidade de Horizontina, ocorreu em março de 2003, acometendo 13 indivíduos. Todos os surtos acometeram, na grande maioria dos casos, crianças (de 2 meses a 12 anos de idade).

Os resultados da identificação molecular dos enterovírus possibilitaram o estudo da frequência de ocorrência destes agentes nos surtos e nos casos esporádicos de meningite. Esses estudos evidenciaram que os quatro primeiros surtos foram causados por echovírus 30 e o último, ocorrido no Rio Grande do Sul, em 2003, foi causado por echovírus 13. Outros surtos de meningite devidos a echovírus 30 já foram descritos na Espanha (TRALLERO et al., 2000), Bélgica (THOELLEN et al., 2003) e França (BAILY et al., 2002; BERNIT et al., 2004). Echovírus 13, apesar de ser considerado raro em casos de meningite, foi descrito recentemente como agente etiológico de surtos de meningite em outros países, como Alemanha (DIEDRICH; SCHREIER, 2001), Israel (SOMEKH et al., 2003) e Espanha (PÉREZ et al., 2003).

As causas e o modo de transmissão dos enterovírus nos surtos não foram definidos devido à falta de informações essenciais, como fatores de risco de fonte comum. O único aspecto observado foi o período do aparecimento dos casos, que foram notificados, em sua maioria, no verão e outono, demonstrando o padrão sazonal de circulação característico de enterovírus.

Echovírus 30 foi também identificado na maioria dos casos esporádicos nos estados do Paraná, Rio de Janeiro, Rio Grande do Sul, Mato Grosso do Sul, Mato Grosso, Espírito Santo, Alagoas, Minas Gerais, Distrito Federal, Goiás e Ceará, durante o período do

estudo. Esta identificação viral, tanto nos surtos como em muitos casos esporádicos, confirma o potencial de echovírus 30 em causar uma substancial morbidade em crianças, como já observado por REINTJES e colaboradores (1999).

Com exceção do echovírus 13, que foi responsável apenas pelos casos do surto ocorrido no Rio Grande do Sul, em 2003, os outros sorotipos de enterovírus identificados neste estudo, causaram somente casos esporádicos. Echovírus 30, como observado, causou tanto surtos quanto casos esporádicos. A taxa de isolamento viral em casos esporádicos por ano ao longo do período de estudo variou de 0,0%, no ano de 1998 (que só teve o mês de dezembro analisado) a 19,23% em 2002.

A baixa taxa de isolamento viral em todos os casos esporádicos (8,03%), comparada à taxa observada nos surtos (35,76%), pode ser reflexo de alguns fatores: o primeiro diz respeito a possíveis problemas na armazenagem e transporte dos materiais clínicos (LCRs); outro aspecto a ser levado em consideração diz respeito à sensibilidade das culturas celulares utilizadas, que podem não ser adequadas para o isolamento de alguns agentes virais diferentes dos enterovírus e mesmo para alguns sorotipos de enterovírus. Entretanto estes fatores não foram investigados.

A rápida detecção e identificação de enterovírus em casos de meningite possibilitam alertar as autoridades de saúde sobre o surgimento de um surto ainda em estágio inicial, havendo então a possibilidade de evitar seu aumento ou gravidade, assim como permite colaborar com um diagnóstico seguro e rápido, eliminando ou reduzindo o uso de medicamentos inespecíficos ou desnecessários para debelar a infecção (DREBOT et al., 1994).

A meningite viral ainda é sub-notificada no Brasil. Isto significa que os resultados encontrados neste estudo refletem apenas parte da realidade, podendo estar subestimando o real número de meningites por enterovírus, uma vez que somente os casos com amostras clínicas analisadas pelo laboratório foram considerados. A aplicação de metodologias mais sensíveis, como RT-PCR e sequenciamento nucleotídico, colabora com o diagnóstico seguro desta e de outras infecções por enterovírus no país.

Com os resultados obtidos na análise dos dados clínico-epidemiológicos, foi possível observar os principais aspectos relacionados à meningite viral no país. Os dados disponíveis em países onde a vigilância virológica dos casos de meningite viral existe efetivamente apontam para os enterovírus como os principais agentes etiológicos envolvidos (MORENS; PALLANSCH, 1995; TRALLERO et al., 2000). No nosso estudo as culturas celulares utilizadas possibilitariam o isolamento de outros vírus, tais como

adenovírus e herpesvírus, além dos enterovírus. Entretanto, os enterovírus foram os únicos agentes virais isolados, tanto nos surtos quanto nos casos esporádicos.

Baseados nestes resultados, que mostram a circulação de enterovírus como agentes etiológicos de meningite no Brasil, chamamos a atenção para a frequência de ocorrência de echovírus 30 no país, sendo este responsável por uma elevada morbidade em crianças no Brasil, causando tanto surtos como casos esporádicos de meningite viral. Neste sentido, esperamos colaborar com a Coordenação de Vigilância de Doenças de Transmissão Respiratória e Imunopreveníveis, da Secretaria de Vigilância em Saúde, com esses dados, que podem fundamentar e incentivar a efetiva implantação do Programa de Vigilância de Surtos e Casos de Meningites Virais, pelo Ministério da Saúde.

Outros estudos são necessários para avaliar alguns fatores epidemiológicos, incluindo fatores de risco, responsáveis pela frequência de meningite viral no país, e para elucidar o relacionamento filogenético, dispersão e circulação de echovírus 30.

6 - CONCLUSÕES

6 - CONCLUSÕES

- A incidência da meningite viral se deu principalmente em crianças, com idades entre 2 meses a 12 anos;
- Os sinais apresentados pelos pacientes foram, em geral, os sinais clínicos mais comumente associados a casos de meningite viral, não levando a seqüelas. Apesar disso, foram relatados cinco óbitos, entre os 1022 casos estudados;
- As técnicas virológicas clássicas (isolamento em culturas celulares) e moleculares (RT-PCR e sequenciamento nucleotídico) utilizadas para isolamento e identificação viral neste trabalho, possibilitaram a caracterização dos enterovírus provenientes de surtos e casos esporádicos de meningite viral ocorridos no Brasil;
- Enterovírus foram os únicos agentes virais identificados neste estudo;
- Outros enterovírus identificados nos casos de meningite viral foram: coxsackievírus B5, echovírus 1, echovírus 4, echovírus 6, echovírus 13, echovírus 18 e echovírus 25;
- Echovirus 30 foi o mais frequente enterovírus identificado nos casos esporádicos e surtos de meningite viral;
- Foram identificados 288 casos provenientes de surtos, com isolamento viral em 103 casos (35,76%) e 734 casos esporádicos de meningite viral, com 59 (8,03%) isolamentos positivos;
- Foram identificados cinco surtos de meningite viral no Brasil entre dezembro de 1998 e dezembro de 2003. Destes, quatro ocorreram na região sul, e um na região nordeste do país; quatro surtos foram causados por echovírus 30, enquanto um foi por echovírus 13;

- Os surtos de meningite viral por enterovírus apresentaram um padrão de sazonalidade bem definido, ocorrendo no verão e outono. Os demais casos ocorreram ao longo de todos os anos; e

- Esses resultados foram notificados à Coordenação de Vigilância de Doenças de Transmissão Respiratória e Imunopreveníveis, da Secretaria de Vigilância em Saúde, do Ministério da Saúde, para colaborar com a implantação efetiva da vigilância da meningite viral no país.

ANEXO

Artigo submetido ao periódico Journal of Medical Virology

**Frequency of Viral Meningitis Outbreaks and Sporadic Cases due to Enterovirus in
Brazil during the period of December 1998 to December 2003 and analysis of
patient's clinical findings.**

Gina P. L. dos Santos ¹, Irene Skraba ², Denise Oliveira ³, Ana A. F. Lima ³, Maria Mabel
M. de Melo ⁴ M.Sc, Claudete I. Kmetzsch ⁵ Eliane V. da Costa ¹, M.Sc. & Edson E. da
Silva ¹, Ph.D

1 – Laboratório de Enterovirus, Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, Brasil.

2 – Laboratório Central de Saúde Pública (LACEN), estado do Paraná.

3 – Secretaria Municipal de Saúde – Recife, Estado de Pernambuco.

4 – Laboratório Central de Saúde Pública (LACEN), Estado de Pernambuco.

5 – Secretaria Estadual de Saúde - estado do Rio Grande do Sul.

Work developed at Enterovirus Laboratory - Instituto Oswaldo Cruz / FIOCRUZ

Shortened Title: Viral Meningitis due to Enterovirus in Brazil

Address for correspondence:

To: Dr. Edson Elias da Silva

Enterovirus Laboratory - Instituto Oswaldo Cruz / FIOCRUZ

Av. Brasil, 4365 – Pavilhão Cardoso Fontes

Manguinhos – Rio de Janeiro – Brazil.

CEP: 21045-900

Tel.: 55 - 21 2598-4469 / Fax Number: 55 – 21 2564-7638

E-mail for correspondence: edson@ioc.fiocruz.br

Abstract

Acute viral infections of the central nervous system, as of meningitis and encephalitis, are responsible for a high morbidity, particularly in children. Non-Polio Enteroviruses (NPEV) are responsible for over 80% of viral meningitis in which the etiologic agent is identified. In the present study we show the frequency of occurrence of Enterovirus in outbreaks and sporadic cases of viral meningitis in Brazil during the period of December 1998 to December 2003. From 1022 samples of Cerebrospinal Fluid (CSF) received by the Enterovirus Laboratory at FIOCRUZ, 162 (162/1022 - 15,85%) were positive regarding viral isolation in RD and 139 of these (139/162 - 85,27%) were identified by partial genome sequencing as being Echovirus 30. Other identified Enteroviruses were: Coxsackievirus B5 (6 samples – 3,70% of the isolations), Echovirus 13 (3,70%), Echovirus 18 (3,08%), Echovirus 6 (1,23%), Echovirus 25 (1,23%), Echovirus 1 (0,61%) and Echovirus 4 (0,61%). The age among the patients ranged from 28 days to 68 years old. The most frequent symptoms were fever (77,00%), headache (69,51%), vomiting (71,30%), neck stiffness (41,35%), convulsion (7,13%) and diarrhea (3,74%). Throughout the surveillance period, five viral meningitis outbreaks were identified and confirmed: three at Paraná State (Southern Brazil), one at Pernambuco State (Northeast Brazil) and one at Rio Grande do Sul State (Southern Brazil). Echovirus 30 was responsible for four of the five outbreaks while Echovirus 13 caused the fifth one. Besides the outbreaks, 734 sporadic cases were also identified during the study period and 59 of these were positive with regard viral isolation (8,03%). Echovirus 30 accounted for 70% (42/59) of the isolates. Based on these results, we call the attention to the Echovirus 30 as the most prevalent agent in the viral meningitis etiology in Brazil, causing both sporadic cases and outbreaks.

Key words

Echovirus 30, RT-PCR, Sequencing, Surveillance.

Virus Nomenclature

Family *Picornaviridae*

Genus Enterovirus

Introduction

Acute viral infections of the central nervous system are the source of a group of wide world-distributed diseases affecting the population in a sporadic, endemic and/or epidemic way. These infections cause a high morbidity, particularly in children, and may result in serious sequels. The vast majority of these cases are constituted of meningitis and encephalitis, besides of acute flaccid paralysis (poliomyelitis), mononeuritis, polyneuritis and Reye's Syndrome [Alexander et al., 1994]. Viral meningitis is the name given to the set of clinical manifestations established after meningeal infection caused by viruses. This is the most ordinary kind of meningitis. Although the low mortality and lethality rates, compared to the meningococcal meningitis, viral meningitis has a high morbidity rate and presents cosmopolitan characteristics, mainly in children. Besides, neurologic sequels are also possible to occur and, in more severe cases, these infections can be fatal [Melnick, 1996]. The way of transmission is usually by the fecal-oral route, besides of respiratory secretions. The most common clinical manifestations of viral meningitis are: fever, intense headache, photophobia, nausea, vomiting, neck stiffness, sleepiness and mental confusion. Non-Polio Enteroviruses (NPEV), *Picornaviridae* Family, are responsible for over 80% of viral meningitis in which the etiologic agent is identified [Morens and Pallansch, 1995]. Some of the Enterovirus serotypes are: Poliovirus (3 serotypes), Coxsackievirus A (23 serotypes), Coxsackievirus B (6 serotypes), Echovirus (28 serotypes) and other Enterovirus recently classified (Enteroviruses serotypes 68-71, 73-78, 89-91) [Pringle, 1999; King et al., 2000; Oberste et al., 2001; Norder et al., 2003; Oberste et al., 2004; Oberste et al., 2005].

In order to determine Enterovirus activity and circulation in the population, the isolates obtained from clinically apparent cases should be serotyped. Continuous

circulation of some Enterovirus serotypes has been observed, for example Echovirus 4, 6, 7, 13, 18 and 30, Coxsackievirus B2, B3, B5 and B6, and Enterovirus 71, recently involved in outbreaks and sporadic cases of viral meningitis in the world [Kirschke et al., 2002; Wang et al., 2002; Thoelen et al., 2003].

Most surveillance studies about Enteroviral infections have been conducted in developed countries [Lina, 1996]. In Brazil, established studies about these agents are restricted to the acute flaccid paralysis (AFP) surveillance, while the investigations about viral meningitis epidemiology are still at the beginning of implantation by the Program of Surveillance of outbreaks and cases of viral meningitis of the Brazilian Ministry of Health.

Epidemiological surveillance plays a crucial role in understanding the changing patterns of EV infection and disease association. Such knowledge may help in the control of diseases [Mcintyre and Keen, 1993; Hovi et al., 1996; Muir, 1998]. Although complete identification of EV does not contribute significantly to patient management, it is essential for epidemiological purposes, establishing the prevailing virus each year or in each outbreak [Mcintyre and Keen, 1993]. The ability to detect rapidly and distinguish enteroviral-associated illness from that due to bacteria and other viruses is an essential goal for prognostic, therapeutic, and epidemiological purposes [Casas et al., 1999]. Based on these facts, we think that the development of this study will contribute to the knowledge about the viral meningitis epidemiology in Brazil.

In the present study we show the frequency of occurrence of Enterovirus in four identified outbreaks and sporadic cases of viral meningitis that occurred in Brazil between December 1998 and December 2002. Virological, molecular and epidemiological results are also presented.

Patients and Methods

Patients and Clinical Specimens

Cerebrospinal Fluid (CSF) specimens were analyzed in this study. All the 1022 samples were originated from the same number of patients presenting meningitis symptoms in several regions of Brazil. Specimens were originally received by the regional State Government Central Laboratories (LACENs) between December 1998 and December 2003 and sent to the Enterovirus Laboratory (National Reference Laboratory).

Patient's Epidemiological Data

Aspects related to the age, sex, and clinical features, as symptoms, illness duration and hospitalization period of all patients were analyzed in order to map out the viral meningitis patient's profile.

Virus Isolation

All CSF specimens were inoculated directly onto cell cultures for the purpose of virus isolation. Continuous cell lineage RD (human rhabdomyosarcoma) was selected for its ability to support most of Enterovirus serotypes replication [Dagan and Menegus, 1986]. Cell cultures demonstrating cytopathic effect (CPE) were kept at -20°C until further identification.

Identification (serotyping) of the Enterovirus Isolates

Specimens showing Enterovirus characteristic CPE were submitted to RNA extraction using Trizol LS[®] (Life Technologies), according to the manufacturer protocol. Specific Enterovirus group-RT-Polymerase Chain Reaction was performed using a primer

pair (R – 222 and F – 292) that amplifies a 357 bp fragment inside the gene codifying for the main capsid protein, VP1, as described by Oberste and cols. [1999]. After a step of reverse transcription of 42°C / 30', 30 cycles of denaturation at 95°C / 20'', annealing at 42°C / 45'' and extension at 60°C / 30'', in a GeneAmp® PCR System 9700 thermocycler (Applied Biosystems), the products were analyzed by electrophoresis in a 1% agarose gel containing ethidium bromide (0,5 µg/ml), using *50 bp ladder* (Invitrogen), as molecular weight marker and then, visualized in a transilluminator (UV light). Specific products were gel purified using the *QIAquick® Gel Extraction* (Qiagen) kit and then quantified by comparison, in 1% agarose gel, with *Low DNA Mass Ladder* (Invitrogen) molecular mass marker.

Cycle-Sequencing Reactions and Sequence Analysis

Cycle-Sequencing reactions were performed using the ABI BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction (PE Applied-Biosystems) in a GeneAmp® thermocycler, with cycles of 15'' at 95°C, 30'' at 42°C and 3' at 60°C. Products were purified by Isopropyl alcohol precipitation.

Sequencing reactions, using both primers (222 and 292), were analyzed using the ABI PRISM 310 Genetic Analyser (Applied Biosystems). After edition, sequences were compared with those located at GenBank using the Program Blast [Altschul et al., 1990], for confirmation of the viral identity and serotype determination.

Outbreaks and Sporadic Cases Identification and Confirmation

During the surveillance period (December 1998 to December 2003), we identified the viral agents responsible for both sporadic cases and outbreaks of viral meningitis occurred in Brazil. The confirmation of the outbreaks was done in cooperation with the

state epidemiological surveillance offices, which observed a rise in the frequency of viral meningitis notification in specific locations in Brazil.

Cases that were not geographically nor temporally related to the outbreaks were considered as sporadic cases of viral meningitis.

Results

Patients and Clinical Specimens

During the period between December 1998 and December 2003, the Enterovirus Laboratory (EV-Lab) received 1022 CSF specimens originating from cases of viral meningitis, with a mean of 198 cases/year.

During the surveillance period, the number of CSF specimens collected from cases of viral meningitis oscillated from one to 136 per month. These data are shown in the **Figure 01**. The annual frequency of specimens received for analysis during the surveillance period is in **Table 01**.

Patient's Epidemiological Findings

Among the 648 patients who had the age informed (648/1022 - 63,40%), it ranged from 28 days to 68 years old. Almost half of these patients (294/648 - 45,37%) had between 2 and 6 years old. The majority of the viral isolation cases were also in this age group (64/169 - 55,17%). The mean age considering all the age informed-patients was 7,9 years old.

From the 1022 patients under study, 830 had the sex informed (830/1022 - 81,21%). Among them there were 488 males (58,79%) and 342 females (41,20%).

Clinical information could be gathered from 561 (54,89%) of the 1022 cases received for virological diagnosis. The most common symptoms reported by the patients were fever (432/561 – 77,00% of the patients) and headache (390/561 – 69,51%). Other presenting symptoms included vomiting (400/561 – 71,30%), neck stiffness (232/561 – 41,35%), convulsion (40/561 – 7,13%), diarrhea (21/561 – 3,74%), nausea (12/561 – 2,13%), and coma (7/561 – 1,24%). Viral meningitis and non-specified meningitis were the most common clinical diagnoses. The duration of the illness, including the cases requiring hospitalization was around 4 days (range: 1 to 9 days). The majority of the patients recovered without any complication although 5 patients died. Their age varied from 10 months to 7 years old. **Table 02** shows more details of these data.

Virus isolation

During the surveillance period, from the 1022 CSF specimens received, 162 (15,85%) were positive regarding viral isolation in RD and / or HEp2 cell cultures, presenting characteristic Enterovirus CPE. **Table 03** shows the viral isolating taxes in all meningitis cases involved in the study.

Identification (serotyping) of the Enterovirus isolates

All the 162 positive CSF specimens regarding viral isolation were also positive by RT-PCR using a broad reactive Enterovirus set of primers, amplifying a 357 bp fragment. **Figure 02** shows the eletrophoretic profile of these fragments. Sequencing of the RT-PCR products obtained identified the etiologic agent of these cases. Echovirus 30 was identified as the viral agent in 139 (139/162 - 85,27%) of these cases. Besides, Coxsackievirus B5 was identified in five specimens (5/162 - 3,70%). Other Echoviruses were also identified, as Echovirus 13 (6 specimens – 3,70% of the isolates), Echovirus 18 (5 specimens – 3,08%

of the isolates), Echovirus 6 (2 specimens – 1,23%), Echovirus 25 (2 specimens – 1,23%), Echovirus 1 (1 specimen – 0,61%) and Echovirus 4 (1 specimen – 0,61%). These data are shown in **Figure 03**.

Outbreaks and Sporadic Cases Identification and Confirmation

Five viral meningitis outbreaks were identified and confirmed in Brazil along the surveillance period.

The first outbreak occurred in Londrina (1998 population: 426.609 habitants), Paraná State, Southern Brazil, probably between December 1998 and February 1999 (since the 44th epidemiological week of 1998 to 9th 1999). According to State Epidemiological Surveillance, were notified 325 cases in this outbreak. State Government Central Laboratory (LACEN-PR) sent to the Enterovirus Laboratory 101 CSF specimens, and 35 of these had the viral agent identified as Echovirus 30.

The second outbreak occurred in Ponta Grossa (2000 population: 273.616 habitants), also in Paraná, between December 2000 and January 2001 (since the 49th epidemiological week of 2000 to 5th 2001), and 48 CSF were analyzed. Echovirus 30 was identified in 15 of these cases.

The third outbreak, in Ibiporã (2001 population: 43.045 habitants), Paraná State, occurred between October and November 2001 (40th to 48th epidemiological week) and Echovirus 30 was identified in 21 out of 56 CSF specimens analyzed.

The fourth outbreak occurred in the city of Recife (Pernambuco State) (2002 population: 1.449.136 habitants), Northeastern Brazil, between April and June 2002 (14th to 26th epidemiological week). Seventy CSF specimens collected during the outbreak, which had 80 notified cases (State Epidemiological Surveillance data), were analyzed and 26 of these cases had the viral agent identified as Echovirus 30.

The fifth outbreak occurred in Horizontina (2003 population: 17.907 habitants), at Rio Grande do Sul State, Southern Brazil, probably in March 2003 (10th to 13th epidemiological week). State Government Central Laboratory (LACEN-PR) sent to the Laboratory 13 CSF samples, from the 13 notified cases, and 6 of these had the viral agent identified as Echovirus 13.

The number of viral meningitis outbreaks, their location and the duration period as well as the number of cases and associated EV are shown in **Table 04**. The number of cases of each outbreak was informed by the local epidemiology services. **Figure 04** shows the epidemic curve for the 5 outbreaks and its association with Enterovirus isolation and identification.

Besides the outbreaks, 734 sporadic cases of viral meningitis were also identified during the surveillance period in the following States of Brazil: Paraná, Rio de Janeiro, Rio Grande do Sul, Mato Grosso do Sul, Mato Grosso, Espírito Santo, Alagoas, Minas Gerais, Ceará, Distrito Federal and Goiás. From the specimens originating from these sporadic cases, 59 specimens regarded viral isolation (59/734 - 8,03%), and were mainly due to Echovirus 30 (42/59 – 71,18%). Detailed data about these sporadic cases are shown in **Table 05**.

Discussion

The present study describes the frequency of occurrence of Enterovirus in several identified outbreaks and sporadic cases of viral meningitis in Brazil during the period of December 1998 to December 2003. This study is the foundation of a systematic surveillance concerning the viral etiology of viral meningitis in Brazil.

The purpose of our laboratory is primarily conduct the diagnosis of the Central Nervous System syndromes as poliomyelitis, viral meningitis and encephalitis throughout the isolation and molecular identification of viruses from feces and CSF specimens. In the case of meningitis, virus isolation from this last source has a high significance and is considered the best specimen for diagnosis [Rotbart, 1995].

The age of the patients with viral meningitis during the surveillance period ranged from 28 days to 68 years old with a mean of 7,9 years. These data are consistent with those in the literature [Trallero et al., 2003] and suggests that Enteroviral infections, such as meningitis, occur early in life in Brazil.

Among all patients who had the sex informed 58,75% were males and 41,25% females.

Echovirus 30 was the most frequent viral agent identified from CSF specimens of patients with viral meningitis between December 1998 and December 2003 (139 cases, from the 162 with positive Enterovirus isolation – 85,27% of all isolates). This serotype of Enterovirus was also observed in four outbreaks as well as in sporadic cases, which occurred in several Brazilian States (Paraná, Rio de Janeiro, Rio Grande do Sul, Mato Grosso do Sul, Mato Grosso, Espírito Santo, Alagoas, Minas Gerais, Ceará, Distrito Federal and Goiás). In these sporadic cases, Echovirus serotypes 1, 4, 6, 9, 18 and 25, and Coxsackievirus B5 were also identified. In other countries [Berlin et al., 1993; Trallero et al., 2000], various Enterovirus serotypes were also identified as the cause of viral meningitis.

Outbreaks of viral meningitis due to Echovirus 30 have been reported [Trallero et al., 2000; Baily et al., 2002; Thoelen et al., 2003; Bernit et al., 2004]. The identification of this Enterovirus as etiological agent responsible for these outbreaks confirms the potential

of Echovirus 30 to cause substantial morbidity among children, as suggested by Reintjes and cols. [1999].

During the last decades, Echovirus 30 was the predominant viral agent implicated in viral meningitis in several countries as Spain, with 16 outbreaks and numerous sporadic cases [Trallero et al., 2000], Taiwan [Hsu et al., 1995], Cuba [Belo, 1997], Belgium [Druyts-Voets, 1997], Switzerland [Giorgievski-Hrisoho et al., 1998], Brazil [Jóia et al., 1999] and Australia [Gosbell et al., 2000], indicating an active worldwide circulation of this serotype in recent years.

The first notified Echovirus 13-related meningitis outbreak in Brazil occurred in Horizontina, in March 2003. There are recent reports of outbreaks in which Echovirus 13 was the etiologic agent in other countries, as Germany [Diedrich and Schreier, 2001], Israel [Somekh et al., 2003] and Spain [Pérez et al., 2003].

The rapid detection and identification of Enterovirus provide a means of alerting health officials at the early stage of an outbreak. This is also important to help to increase the accuracy of clinical diagnosis, eliminating unnecessary laboratory tests [Drebot et al., 1994].

We have found, in agreement to other authors, that Echoviruses are frequently isolated from symptomatic patients [Maguire et al., 1999]. Most patients under analysis presented with symptoms and typical signs of viral meningitis. The predominant symptoms in the study cases were fever (77,20%), headache (69,78%), vomiting (71,37%), neck stiffness (41,51%), convulsion (7,21%) and diarrhea (3,91%). Similar results were also previously reported [Rice et al., 1995].

The patient's clinical evolution with no sequel or complications, which were the majority of the cases, agrees with many studies about viral meningitis of Enteroviral etiology [Nelsen et al., 1993; Merovitz et al., 2000]. Regardless, there were 47 patients

with complications, such as convulsion and coma, and 5 obits. These complications were already reported [Modlin et al., 1991].

The mean of hospitalization duration was 4 days (range, 1 to 9 days). Meqdam and cols. [2002] found the same results, studying clinical findings related to enteroviral meningitis.

The way of transmission of the Enteroviruses during the outbreaks described here remains speculative due to the lack of information about common source risk factors.

Viral meningitis is still underreported in Brazil. This support the view that the surveillance data presented in this study only reflects part of reality, underestimating the real number of enteroviral meningitis, given that only cases which had clinical specimens analyzed by the laboratory were considered in this study. On the other hand, the application of sensitive methodologies, such as PCR and sequencing, underscores the significance of our results concerning the circulation of Enteroviruses as etiological agents of CNS infections in Brazilian communities.

Our results demonstrate that Echovirus 30 has been the main etiological agent causing outbreaks of viral meningitis and an important cause of hospitalization of children with viral meningitis in Brazil.

Further studies are needed to evaluate all the epidemiologic factors responsible for the frequency of viral meningitis besides to elucidate the phylogenetic relationship, spread and circulation of Enteroviruses in Brazil.

Acknowledgements

We thank the excellent technical assistance provided by the staff of the Enterovirus Laboratory (IOC-FIOCRUZ); we also thank the CNPQ, CAPES, FUNASA and FIOCRUZ for the financial support. This study is part of the Master thesis of Gina Peres (Post-Graduation Program in Sanitary Surveillance, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, FIOCRUZ, Brazil).

Figure 01 – Temporal distribution of cases of viral meningitis in Brazil (December 1998 – December 2003).

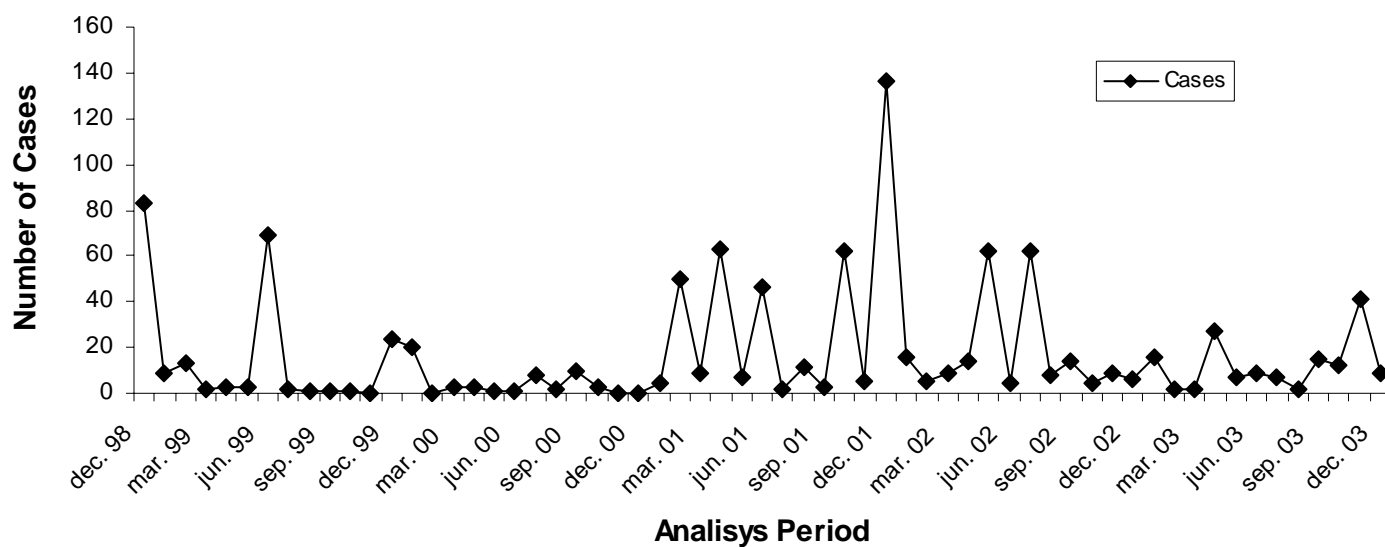


Table 01 – Annual frequency of cases of viral meningitis in Brazil (December 1998 – December 2003).

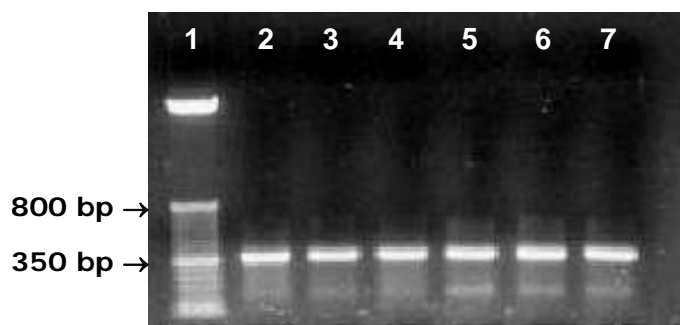
Year	Total Number of Cases
1998	83
1999	128
2000	52
2001	397
2002	213
2003	149

Table 02 – Clinical-Epidemiological data of patients with viral meningitis.

		All cases (1022)		
		Total Number of Patients with data-informed	Nº	%*
Sex	Male	830	488	58,79
	Female		342	41,20
Age Group	< 1 year old	648	104	16,04
	2 - 6 years		294	45,37
	7 - 12 years		163	25,15
	13 - 17 years		39	6,01
	18 - 25 years		20	3,08
	> 26 years		28	4,32
Symptoms	Headache	561	390	69,51
	Fever		432	77,00
	Vomiting		400	71,30
	Neck Stiffness		232	41,35
	Convulsion		40	7,13
	Diarrhea		21	3,74
	Nausea		12	2,13
	Coma		7	1,24
Hospitalization Period	Until 24 h	233	41	17,59
	2 – 5 days		167	71,67
	6 – 9 days		25	10,72

* - These percentages are based on the number of data-informed patients.

Figure 02 - Eletrophoretic profile of the RT-PCR products using 222-292 primer pair (357 bp).



1 - Molecular weight marker 50 bp ladder
2 to 7 - Positive samples

Figure 03 – Frequency of Enterovirus serotypes isolated from viral meningitis cases in Brazil (December 1998 – December 2003).

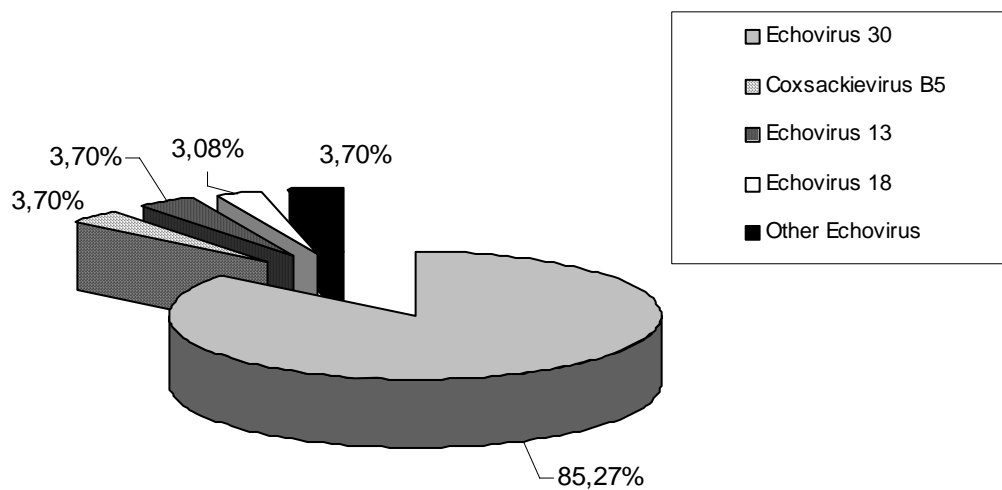


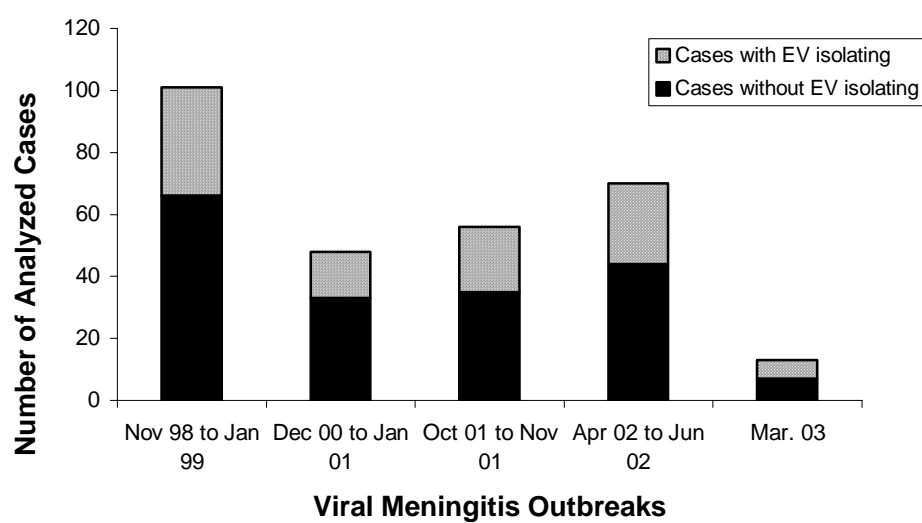
Table 03 – Enterovirus isolating taxes in all viral meningitis cases received by Enterovirus Laboratory (December 1998 – December 2003).

	Number of Cases	Number of EV Isolations	Isolation Tax
Outbreaks Cases	288	103	35,76%
Sporadic Cases	734	59	8,03%
Total	1022	162	15,85%

Table 04 – Summary of geographical, temporal and viral data associated with five outbreaks of viral meningitis in Brazil during the period of December 1998 to December 2003.

	Geographic localization	Probable Period	Number of Analyzed Specimens		Associated EV
			Total	Specimens with EV isolating (%)	
Outbreak 1	Paraná State	December 1998 and February 1999	101	35 (34,65%)	Echovirus 30
Outbreak 2	Paraná State	December 2000 and January 2001	48	15 (31,25%)	Echovirus 30
Outbreak 3	Paraná State	October and November 2001	56	21 (37,50%)	Echovirus 30
Outbreak 4	Pernambuco State	April 2002 and June 2002	70	26 (37,14%)	Echovirus 30
Outbreak 5	Rio Grande do Sul State	March 2003	13	6 (46,15%)	Echovirus 13

Figure 04 - Epidemic curve relative to the 5 outbreaks of viral meningitis in Brazil during the study period.



**Table 05 – Annual distribution of Sporadic Cases of viral meningitis in Brazil
(December 1998 – December 2003).**

Year	Number of Cases	Results / Etiologic Agent	Isolation Tax (%)	Locality*
1998	1	1 Negative	0/1 (0%)	RJ
1999	109	2 Echovirus 30 107 Negatives	2/109 (1,83%)	PR PR, RJ, MT and MS
2000	52	3 Echovirus 30 2 Coxsackievirus B5 47 Negatives	5/52 (9,61%)	PR and RS PR and RJ PR, RJ and RS
2001	306	16 Echovirus 30 3 Coxsackievirus B5 2 Echovirus 25 1 Echovirus 18 1 Echovirus 6 283 Negatives	23/306 (7,51%)	PR and RJ PR and RJ PR and RJ PR RJ PR, RJ, RS and ES
2002	130	18 Echovirus 30 1 Coxsackievirus B5 3 Echovirus 18 1 Echovirus 6 1 Echovirus 4 1 Echovirus 1 105 Negatives	25/130 (19,23%)	PR, RJ and RS PR PR and RJ RJ RJ RJ PR, RJ, RS, DF, AL and MG
2003	136	3 Echovirus 30 1 Echovirus 18 132 Negatives	4/136 (2,94%)	PR and RJ RJ PR, RJ, GO and CE
Total	734		59/734 (8,03%)	

*: RJ – Rio de Janeiro State; PR – Paraná State; MT - Mato Grosso State; MS – Mato Grosso do Sul; RS - Rio Grande do Sul; ES – Espírito Santo; DF – Distrito Federal; AL – Alagoas; MG – Minas Gerais; GO – Goiás; CE – Ceará.

Figure and Tables Legends:

Figure 01 – Temporal distribution of cases of viral meningitis in Brazil (December 1998 – December 2003).

Figure 02 - Eletrophoretic profile of the RT-PCR products using 222-292 primer pair (357 bp).

Figure 03 – Frequency of Enterovirus serotypes isolated from viral meningitis cases in Brazil (December 1998 – December 2003).

Figure 04 - Epidemic curve relative to the 5 outbreaks of viral meningitis in Brazil during the study period.

Table 01 – Annual frequency of cases of viral meningitis in Brazil (December 1998 – December 2003).

Table 02 – Clinical-Epidemiological data of patients with viral meningitis.

Table 03 – Enterovirus isolating taxes in all viral meningitis cases received by Enterovirus Laboratory (December 1998 – December 2003).

Table 04 – Summary of geographical, temporal and viral data associated with five outbreaks of viral meningitis in Brazil during the period of December 1998 to December 2003.

Table 05 – Annual distribution of Sporadic Cases of viral meningitis in Brazil (December 1998 – December 2003).

References

- 1- Alexander JP, Baden L, Pallansch MA, Anderson LJ. 1994. Enterovirus 71 infections and neurologic disease – United States, 1977-1991. *J Infect Dis* 169(4):905-908.
- 2- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. 1990. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* 215:403 – 410.
- 3- Baily JL, Brosson D, Archimbaud C, Chambon M, Henquell C, Peigue-Lafeuille H. 2002. Genetic diversity of Echovirus 30 during a meningitis outbreak, demonstrated by direct molecular typing from cerebrospinal fluid. *J Med Virol* 68:558-567.
- 4- Belo M. 1997. Viral meningoencephalitis caused by Enterovirus in Cuba from 1990-1995. *Rev Argent Microb* 29:176-183.
- 5- Berlin LE, Rorabaugh ML, Heldrich F, Roberts K, Doran T, Modlin JF. 1993. Aseptic meningitis in infants < 2 years of age: diagnosis and aetiology. *J Infect Dis* 168:888-892.
- 6- Bernit E, de Lamballerie X, Zandotti C, Berger P, Veit V, Schleinitz N, de Micco P, Harlé JR, Charrel RN. 2004. Prospective investigation of a large outbreak of meningitis due to Echovirus 30 during summer 2000 in Marseilles, France. *Medicine* 83:245-253.
- 7- Casas I, Pozo F, Trallero G, Echevarria JM, Tenorio A. 1999. A viral diagnosis of neurological infection by RT multiplex PCR: a search for Entero- and Herpesviruses in a prospective study. *J Med Virol* 57:145-151.

8- Dagan R, Menegus MA. 1986. A combination of four cell types for rapid detection of Enterovirus in clinical specimens. *J Med Virol* 19:219-28.

9- Diedrich S, Schreier E. 2001. Aseptic meningitis in Germany associated with Echovirus type 13. *BMC Inf Dis* 1:14. (<http://www.biomedcentral.com/1471-2334/1/14>)

10- Drebot MA, Nguan CY, Campbell JJ, Lee SHS, Forward KR. 1994. Molecular epidemiology of Enterovirus outbreaks in Canada during 1991-1992. Identification of Echovirus 30 and Coxsackievirus B1 Strains by Amplicon Sequencing. *J Med Virol* 44:340-347.

11- Druyts-Voets E. 1997. Epidemiological features of Enterovirus non-Poliovirus isolations in Belgium 1980-94. *Epidemiol Infect* 119:71-77.

12- Giorgievski-Hrisoho M, Schumacher JD, Vilimonovic N, Germann D, Matter L. 1998. Detection by PCR of Enteroviruses in cerebrospinal fluid during a summer outbreak of aseptic meningitis in Switzerland. *J Clin Microbiol* 36:2408-2412.

13- Gosbell I, Robinson D, Chant K, Crone S. 2000. Outbreak of Echovirus 30 meningitis in Wingecarribee Shire, New South Wales. *Commun Dis Intell* 24:121-124.

14- Hovi T, Stenvik M & Rosenlew M. 1996. Relative abundance of Enterovirus serotypes in sewage differs from that in patients: clinical and epidemiological implications. *Epidemiol Inf* 116:91-97.

15- Hsu CM, Chen JM, Huang LM, Lee PI, Kao CL, Lee CY. 1995. Outbreak of aseptic meningitis in Taipei in spring 1993. *J Formos Med Assoc* 94:14-18.

16- J6ia AEB, Figueiredo MH, Skraba I, Ribeiro MF, Ribeirette MR, Takemura NS, Melo VO, Costa EV, da Silva EE. 1999. A large outbreak of aseptic meningitis caused by Echovirus 30 in Paran6, Brazil. *J Braz Soc Virol* 04 (01):141.

17- King AMQ, Brown F, Christian P, Hovi T, Hyypia T, Knowles NJ, Lemon SM, Minor PD, Palmenberg AC, Skern T, Stanway G. 2000. Family *Picornaviridae*. In: Van Regenmortel, M. H. V., Fauquet, C. M., Bishop, D.H. L., Carstens, E. B., Estes, M. K., Lemon, S.M., McGeoch, Maniloff, J., Mayo, M. A., Pringle, C.R. & Wickner, R. B., editors. *Virus Taxonomy: Classification and Nomenclature of Viruses. Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. San Diego, Academic Press, p 657-683.

18- Kirschke DL, Jones TF, Buckingham SC, Craig AS, Schaffner W. 2002. Outbreak of aseptic meningitis associated with Echovirus 13. *Pediatr Infect Dis J* 21(11):1034-1038.

19- Lina B, Valette M, Foray S, Luciani J, Stagnara J, See DM, Aymard M. 1996. Surveillance of community-acquired viral infections due to respiratory viruses in Rhone Alpes (France) during winter 1994 to 1995. *J Clin Microbiol* 34:3007-3011.

- 20- Maguire HC, Atkinson P, Sharland M, Bending J. 1999. Enterovirus infection in England and Wales: laboratory surveillance data: 1975 to 1994. *Common Dis Public Health* 2:122-125.
- 21- McIntyre JP, Keen GA. 1993. Laboratory surveillance of viral meningitis by aseptic meningitis of cerebrospinal fluid in Cape Town, 1981-9. *Epidemiol Inf* 111:357-371.
- 22- Meqdam MM, Khalousi MM, Al-Shurman A. 2002. Enteroviral meningitis in Northern Jordan: Prevalence and association with clinical findings. *J Med Virol* 66:224-228.
- 23- Merovitz BSCL, Demers AM, Newby DMD, McDonald JMD. 2000. The Enterovirus 71 infections at Canadian Center. *Ped Inf Dis J* 19:755-757.
- 24- Melnick JL. 1996. Enterovirus: polioviruses, Coxsackievirus, Echoviruses and newer Enteroviruses. In: Fields, B.N., Knipe, D.M., Howley, P.M., Chanock, R.M., Melnick, J.L. Monath, T.P., Roizman, B., Straus, S.E., editors. *Fields Virology*, third edition. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers. p 655-712.
- 25- Modlin JF, Dagan R, Berlin LE, Virshup DM, Yolken RH, Menegus M. 1991. Focal encephalitis with Enterovirus infections. *Pediatr* 88:841-845.
- 26- Morens DM, Pallansch MA. 1995. Epidemiology. In: Rotbart HA, editor. *Human Enterovirus Infections*. Washington, D.C., ASM Press. p 03-23.

27- Muir P. 1998. Molecular typing of Enteroviruses: current status and future requirements. *Clin Microbiol Rev* 11:202-277.

28- Nelsen S, Sealy DP, Schneider EF. 1993. The aseptic meningitis syndrome. *Am Fam Phys* 48:809-815.

29- Norder H, Bjerregaard L, Magnius LO, Lina B, Aymard M, Chomel JJ. 2003. Sequencing of “untypable” Enteroviruses reveals two new types, EV-77 and EV-78, within human Enterovirus type B and substitutions in the BC loop of the VP1 protein for known types. *J Gen Virol* 84:827-836.

30- Oberste MS, Maher K, Kilpatrick DR, Flemister MR, Brown BA, Pallansch MA. 1999. Typing of human Enteroviruses by partial sequencing of VP1. *J Clin Microbiol* 37(5):1288-1293.

31- Oberste MS, Schnurr D, Maher K, Al-Busaidy S, Pallansch MA. 2001. Molecular identification of new picornaviruses and characterization of a proposed Enterovirus 73 serotype. *J Gen Virol* 82(2):409-416.

32- Oberste MS, Maher K, Michele SM, Belliot G, Uddin M, Pallansch MA. 2005. Enteroviruses 76, 89, 90 and 91 represent a novel group within the species Human Enterovirus A. *J Gen Virol* 86(2):445-51.

33- Oberste MS, Michele SM, Maher K, Schnurr D, Cisterna D, Junttila N, Uddin M, Chomel JJ, Lau CS, Ridha W, Al-Busaidy S, Norder H, Magnius LO, Pallansch MA. 2004.

Molecular identification and characterization of two proposed new Enterovirus serotypes, EV73 and EV 74. *J Gen Virol* 85(11):3205-3212.

34- Pérez C, Pena MJ, Molina L, Trallero G, García A, Álamo F, Lafarga B. 2003. Epidemic outbreak of meningitis due to Echovirus type 13 on the Island of Gran Canaria (Spain). *Enferm Infecc Microbiol Clin* 21(7):340-345.

35- Pringle CR. 1999. Virus taxonomy at the XIth International Congress of Virology, Sydney, Australia. *Arch Virol* 144:2065-2070.

36- Reintjes R, Pohle M, Vieth U, Lyytikainen O, Timm H, Schreier E, Petersen L. 1999. Community-wide outbreak of enteroviral illness caused by Echovirus 30: a cross-sectional survey and a case-control study. *Pediatr Inf Dis J* 18(2):104-108.

37- Rice SK, Heintz RE, Thornton LL, Opal SM. 1995. Clinical characteristics, management strategies, and cost implications of a statewide outbreak of Enterovirus meningitis. *Clin Infect Dis* 20:931-937.

38- Rotbart HA. 1995. Diagnosis of Enteroviral meningitis with the polymerase chain reaction. *J Pediatr* 117:85-89.

39- Somekh E, Cesar K, Handsher R, Hanukoglu A, Dalal I, Ballin A, Shohat T. 2003. An outbreak of Echovirus 13 meningitis in central Israel. *Epidemiol Infect* 130 (2):257-262.

40- Thoelen I, Lemey P, Van der Donck I, Beuselinck K, Lindberg AM, Van Ranst M. 2003. Molecular typing and epidemiology of Enteroviruses identified from an outbreak of aseptic meningitis in Belgium during the summer of 2000. *J Med Virol* 70:420-429.

41- Trallero G, Casas I, Avellón A, Pérez C, Tenorio A, De La Loma A. 2003. First epidemic of aseptic meningitis due to Echovirus type 13 among Spanish children. *Epidemiol Infect* 130:251-256.

42- Trallero G, Casas I, Tenório A, Echevarria JE, Castellanos A, Lozano A, Brena PP. 2000. Enterovirus in Spain: virological and epidemiological studies over 10 years (1988-97). *Epidem Inf* 124:497-506.

43- Wang JR, Tsai HP, Huang SW, Kuo PH, Kiang D, Liu CC. 2002. Laboratory diagnosis and genetic analysis of an Echovirus 30-associated outbreak of aseptic meningitis in Taiwan in 2001. *J Clin Microb* 40(12):4439-44.

7 – REFERÊNCIAS

7 - REFERÊNCIAS

ALEXANDER, J.P.; BADEN, L.; PALLANSCH, M.A.; ANDERSON, L.J. Enterovirus 71 infections and neurologic disease – United States, 1977-1991. **J. Infect. Dis.**, 169 (4): 905-8. 1994.

ALTSCHUL, S. F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E. W.; LIPMAN, D. J. Basic local alignment search tool. **J. Mol. Biol.**, 215: 403 – 410. 1990.

BAILY, J.L.; BORMAN, A.M.; PEIGUE-LAFEUILLE, H.; KEAN, K.M. Natural isolates of Echovirus type 25 with extensive variations in IRES sequences and different translational efficiencies. **Virology**, 215: 83-96. 1996.

BAILY, J.L.; BROSSON, D.; ARCHIMBAUD, C.; CHAMBON, M.; HENQUELL, C.; PEIGUE-LAFEUILLE, H. Genetic diversity of Echovirus 30 during a meningitis outbreak, demonstrated by direct molecular typing from cerebrospinal fluid. **J. Med. Virol.**, 68: 558-67. 2002.

BAHRI, O.; REZIG, D.; BEN NEJMA-OUESLATI, B.; BEN YAHIA, A.; BEN SASSI, J.; HOGGA, N.; SADRAOUI, A.; TRIKI, H. Enterovirus in Tunisia: virological surveillance over 12 years (1992-2003). **J. Med. Microbiol.**, 54: 63-9. 2005.

BERNIT, E.; DE LAMBALLERIE, X.; ZANDOTTI, C.; BERGER, P.; VEIT, V.; SCHLEINITZ, N.; DE MICCO, P.; HARLÉ, J.R.; CHARREL, R.N. Prospective investigation of a large outbreak of meningitis due to Echovirus 30 during summer 2000 in Marseilles, France. **Medicine**, 83: 245-53. 2004.

BONI, J.; BISSET, L.R.; BURCKHARDT, J.J.; JOLLER-JEMELKA, H.I.; BURGISSER, P.; PERRIN, L.; GORGIEVSKI, M.; ERB, P.; FIERZ, W.; PIFFARETTI, J.C.; SCHUPBACH, J. Prevalence of Human T-Cell Leukemia Virus Types I and II in Switzerland. **J. Med. Virol.**, 72: 328-37. 2004.

BRASIL Lei nº 8.080, de 19 de Setembro de 1990. Dispõe sobre as condições para a promoção, proteção e recuperação da saúde, a organização e o funcionamento dos serviços correspondentes e dá outras providências. Brasília, DF. 1990.

BRASIL Portaria nº 1.943, de 18 de Outubro de 2001. Define a relação de doenças de notificação compulsória para todo território nacional. Brasília, DF. 2001.

BRASIL. Guia de Vigilância Epidemiológica. Fundação Nacional de Saúde. 5ª Ed., Vols. 1 e 2. Brasília, DF. 2002. 842p.

BUXBAUM, S.; BERGER, A.; PREISER, W.; RABENAU, H.F.; DOERR, H.W. Enterovirus infections in Germany: comparative evaluation of different laboratory diagnostic methods. **Infection**, 29 (03): 138-42. 2001.

CASAS, I.; POZO, F.; TRALLERO, G.; ECHEVARRIA, J.M.; TENORIO, A. A viral diagnosis of neurological infection by RT multiplex PCR: a search for Entero- and Herpesviruses in a prospective study. **J. Med. Virol.**, 57: 145-51. 1999.

CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION HOME PAGE. Disponível no endereço eletrônico: <http://www.cdc.gov/ncidod/dvrd/virmen.htm> (Acesso em 07/10/03).

CHESKY M.; SCALCO R.; FAILACE L.; READ S.; JOBIM L.F. Polymerase chain reaction for the laboratory diagnosis of aseptic meningitis and encephalitis. **Arq. Neuropsiquiatr.**, 58 (3B): 836-42. 2000.

CHONMAITREE, T.; BALDWIN, C.D.; LUCIA, H.L. Role of the virology laboratory in the diagnosis and management of patients with central nervous system disease. **Clin. Microbiol. Rev.**, 02: 01-14. 1989.

CHONMAITREE, T.; FORD C.; SANDERS, C.; LUCIA, H.L. Comparison of cell cultures for rapid isolation of Enterovirus. **J. Clin. Microbiol.**, 26: 2576-80. 1988.

COSTA, E.V. Sequenciamento e análise genômica do Poliovirus tipo 1, cepa LS-c, precursora imediata da vacina Sabin 1. Rio de Janeiro: IOC / FIOCRUZ, 1999. 72p.

Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular). Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Oswaldo Cruz.

DAGAN, R.; MENEGUS, M.A. A combination of four cell types for rapid detection of Enterovirus in clinical specimens. **J. Med. Virol.**, 19: 219-28. 1986.

DE AZEVEDO, J.P.; NASCIMENTO, L.R.; CORTINOVIS, M.C.; OLIVEIRA, S.S.; DA COSTA E.V.; DA SILVA, E.E. Characterization of Species B Adenoviruses isolated from fecal specimens taken from poliomyelitis-suspected cases. **J. Clin. Virol.**, 31 (4): 248-52. 2004.

DIEDRICH, S.; SCHREIER, E. Aseptic meningitis in Germany associated with Echovirus type 13. **BMC Inf. Dis.**, 1:14. 2001 (<http://www.biomedcentral.com/1471-2334/1/14>).

DIRECTORS OF HEALTH PROMOTION AND EDUCATION HOME PAGE. Disponível no endereço eletrônico: <http://www.astdhphe.org/infect/vmenin.html> (Acesso em 14/06/04).

DREBOT, M.A.; NGUAN, C.Y.; CAMPBELL, J.J.; LEE, S.H.S.; FORWARD, K.R. Molecular epidemiology of Enterovirus outbreaks in Canada during 1991-1992. Identification of Echovirus 30 and Coxsackievirus B1 Strains by Amplicon Sequencing. **J. Med. Virol.**, 44: 340-7. 1994.

DRUYTS-VOETS, E. Epidemiological features of Enterovirus non-Poliiovirus isolations in Belgium 1980-94. **Epidemiol. Inf.**, 119: 71-7. 1997.

GEENOR'S HOME PAGE. Disponível no endereço eletrônico: <http://www.geneticengineering.org/evolution/virus.html> (Acesso em 19/04/05)

GIORGIEVSKI-HRISOHO, M.; SCHUMACHER, J.D.; VILIMONOVIC, N.; GERMANN, D.; MATTER, L. Detection by PCR of Enteroviruses in cerebrospinal fluid during a summer outbreak of aseptic meningitis in Switzerland. **J. Clin. Microbiol.**, 36: 2408-12. 1998.

GOSBELL, I.; ROBINSON, D.; CHANT, K.; CRONE, S. Outbreak of Echovirus 30 meningitis in Wingecarribee Shire, New South Wales. **Commun. Dis. Intell.**, 24: 121-4. 2000.

HALL, T. A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucl. Acids. Symp. Ser.**, 41: 95– 8. 1999.

HEIM, A.; SCHUMANN, J. Development and evaluation of a nucleic acid sequence based amplification (NASBA) protocol for the detection of Enterovirus RNA in cerebrospinal fluid samples. **J. Virol. Methods**, 103 (1): 101-7. 2002.

HOGLE, J.M.; CHOW, M.; FILMAN, D.J. Three-Dimensional structure of Poliovirus at 29 Å resolution. **Science**, 229: 1358-65. 1985.

HOVI, T.; STENVIK, M.; ROSENLEW, M. Relative abundance of Enterovirus serotypes in sewage differs from that in patients: clinical and epidemiological implications. **Epidemiol. Inf.**, 116: 91-7. 1996.

HSU, C.M.; CHEN, J.M.; HUANG, L.M.; LEE, P.I.; KAO, C.L.; LEE, C.Y. Outbreak of aseptic meningitis in Taipei in spring 1993. **J. Formos. Med. Assoc.**, 94: 14-18. 1995.

HUANG, O.S.; CARR, J.M.; NIX, W.A.; OBERSTE, M.S.; KILPATRICK, D.R.; PALLANSCH, M.A.; CROXSON, M.C.; LINDEMAN, J.A.; BAKER, M.G.; GRIMWOOD, K. An Echovirus Type 33 winter outbreak in New Zealand. **Clin. Inf. Dis.**, 37: 650-7. 2003.

JACQUES, J.; CARQUIN, J.; BRODARD, V.; MORET, H.; LEBRUN, D.; BOUSCAMBERT, M.; MOTTE, J.; REMY, G.; ANDREOLETTI, L. New reverse transcription-PCR assay for rapid and sensitive detection of enterovirus genomes in

cerebrospinal fluid specimens of patients with aseptic meningitis. **J. Clin. Microbiol.**, 41(12): 5726-8. 2003.

KEINO, M.; KANNO, M.; HIRASAWA, K.; WATARI, T.; MIKAWA, M.; SAITO, K.; KATO, K.; KATAYOSE, M.; YOSHIDA, H. Isolation of Echovirus type 13 from patients of aseptic meningitis. **Jpn. J. Infect. Dis.**, 54 (6): 249-50. 2001.

KILPATRICK, D.R.; QUAY, J.; PALLANSCH, M.A.; OBERSTE, M.S. Type-specific detection of Echovirus 30 isolates using degenerate reverse transcriptase PCR primers. **J. Clin. Microb.**, 39: 1299-302. 2001.

KING, A.M.Q.; BROWN, F.; CHRISTIAN, P.; HOVI, T.; HYYPIA, T.; KNOWLES, N.J.; LEMON, S.M.; MINOR, P.D.; PALMENBERG, A.C.; SKERN, T.; STANWAY, G. Family *Picornaviridae*. In: VAN REGENMORTEL, M. H. V., FAUQUET, C. M., BISHOP, D.H. L., CARSTENS, E. B., ESTES, M. K., LEMON, S.M., MCGEOCH, MANILOFF, J., MAYO, M. A., PRINGLE, C.R. & WICKNER, R. B. **Virus Taxonomy: Classification and Nomenclature of Viruses**. Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. San Diego: Academic Press. 2000. p. 657-683.

KIRSCHKE, D.L.; JONES, T.F.; BUCKINGHAM, S.C.; CRAIG, A.S.; SCHAFFNER, W. Outbreak of aseptic meningitis associated with Echovirus 13. **Pediatr. Infect. Dis. J.**, 21 (11): 1034-8. 2002.

KUBO, H.; IRITANI, N.; SETO, Y. Molecular classification of Enteroviruses not identified by neutralization tests. **Emerg. Infect. Dis.**, 8 (3): 298-304. 2002.

LASSMAN, H.; ZIMPRICH, F.; ROSSLER, K. Inflammation in the nervous system – Basic mechanisms and immunological concepts. **Rev. Neurol.**, 147: 763-81. 1991.

LEE, Y.S.; KIM, K.S.; CHUNG, Y.S.; CHEON, D.S.; JUNG, S.K.; PARK, K.S.; NA, B.K.; JEE, Y.M.; KIM, D.S.; YOON, J.D.; SONG, C.Y.; LEE, K.H. PCR-RFLP based molecular typing of Enteroviruses isolated from patients with aseptic meningitis in Korea. **Arch. Virol.**, 147 (9): 1711-20. 2002.

LINA, B.; VALETTE, M.; FORAY, S.; LUCIANI, J.; STAGNARA, J.; SEE, D.M.; AYMARD, M. Surveillance of community-acquired viral infections due to respiratory viruses in Rhone Alpes (France) during winter 1994 to 1995. **J. Clin. Microbiol.**, 34: 3007-11. 1996.

LIU, C.C.; TSENG, H.W.; WANG, S.M.; WANG, J.R.; SU, I.J. An outbreak of Enterovirus 71 infection in Taiwan, 1998: epidemiologic and clinical manifestations. **J. Clin. Virol.**, 17 (1): 23-30. 2000.

MAGUIRE, H.C.; ATKINSON, P.; SHARLAND, M.; BENDING, J. Enterovirus infection in England and Wales: laboratory surveillance data: 1975 to 1994. **Common. Dis. Public Health.**, 02: 122-5. 1999.

MCINTYRE, J.P.; KEEN, G.A. Laboratory surveillance of viral meningitis by examination of cerebrospinal fluid in Cape Town, 1981-9. **Epidemiol. Inf.**, 111: 357-71. 1993.

MELNICK, J.L. Enterovirus: polioviruses, Coxsackievirus, Echoviruses and newer Enteroviruses. In: FIELDS, B.N.; KNIPE, D.M.; HOWLEY, P.M.; CHANOCK, R.M.; MELNICK, J.L.; MONATH, T.P.; ROIZMAN, B.; STRAUS, S.E. **Fields Virology**, third edition. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers. 1996. p. 655-712.

MELNICK, J.L.; WIMBERLY, I.L. Lyophilized combination pools of enterovirus equine antisera: new LBM pools prepared from reserves of antisera stored frozen for two decades. **Bull World Health Organ.** 63 (3): 543-50. 1985.

MEQDAM, M.M.; KHALOUSI, M.M.; AL-SHURMAN, A. Enteroviral meningitis in Northern Jordan: Prevalence and association with clinical findings. **J. Med. Virol.**, 66: 224-8. 2002.

MEROVITZ, B.S.C.L.; DEMERS, A.M.; NEWBY, D.M.D.; MCDONALD, J.M.D. The Enterovirus 71 infections at Canadian Center. **Ped. Inf. Dis. J.**, 19: 755-7. 2000.

MEYER, H.M.; JOHNSON, R.T.; CRAWFORD, I.P.; DASCOMB, H.E.; ROGERS, N.G. Central nervous system syndromes of “viral” etiology. **Am. J. Medicine**, 29: 334-47. 1960.

MODLIN, J.F.; DAGAN, R.; BERLIN, L.E.; VIRSHUP, D.M.; YOLKEN, R.H.; MENEGUS, M. Focal encephalitis with Enterovirus infections. **Pediatr.**, 88: 841-5. 1991.

MOORE, M.; MORENS, D.M. Enteroviruses, including Polioviruses. In: BELSHE, R.B. **Human Virology**. Academic Press. 1984. p. 407-83.

MORENS, D.M.; PALLANSCH, M.A. Epidemiology, In: ROTBART, H.A. **Human Enterovirus Infections**. Washington, D.C.: ASM Press. 1995. p. 03-23.

MUIR, P. Molecular typing of Enteroviruses: current status and future requirements. **Clin. Microbiol. Rev.**, 11: 202-77. 1998.

NELSEN, S.; SEALY, D.P.; SCHNEIDER, E.F. The aseptic meningitis syndrome. **Am. Fam. Phys.**, 48: 809-15. 1993.

NORDER, H.; BJERREGAARD, L.; MAGNIUS, L.O.; LINA, B.; AYMARD, M.; CHOMEL, J.J. Sequencing of “untypable” Enteroviruses reveals two news types, EV-77 and EV-78, within human Enterovirus type B and substitutions in the BC loop of the VP1 protein for known types. **J. Gen. Virol.**, 84: 827-36. 2003.

NOWAK, D.A.; BOEHMER, R.; FUCHS, H.H. A retrospective clinical, laboratory and outcome analysis in 43 cases of acute aseptic meningitis. **Eur. J. Neurol.**, 10 (3): 271-80. 2003.

OBERSTE, M.S.; MAHER, K.; FLEMISTER, M.R.; MARCHETTI, G.; KILPATRICK, D.R.; PALLANSCH, M.A. Comparison of classic and molecular approaches for the identification of untypeable Enteroviruses. **J. Clin. Microbiol.**, 38: 1170-4. 2000.

OBERSTE M.S.; MAHER K.; KILPATRICK D.R.; FLEMISTER M.R.; BROWN B.A.; PALLANSCH M.A. Typing of human Enteroviruses by partial sequencing of VP1. **J. Clin. Microbiol.**, 37 (5): 1288-93. 1999.

OBERSTE, M.S.; MAHER, K.; MICHELE, S.M.; BELLLOT, G.; UDDIN, M.; PALLANSCH, M.A. Enteroviruses 76, 89, 90 and 91 represent a novel group within the species Human Enterovirus A. **J. Gen. Virol.**, 86 (2): 445-51. 2005.

OBERSTE, M.S.; MICHELE, S.M.; MAHER, K.; SCHNURR, D.; CISTERNA, D.; JUNTILA, N.; UDDIN, M.; CHOMEL, J.J.; LAU, C.S.; RIDHA, W.; AL-BUSAIDY, S.; NORDER, H.; MAGNIUS, L.O.; PALLANSCH, M.A. Molecular identification and characterization of two proposed new Enterovirus serotypes, EV73 and EV 74. **J. Gen. Virol.**, 85 (11): 3205-12. 2004.

OBERSTE, M.S.; NIX, N.A.; MAHER, K.; PALLANSCH, M.A. Improved molecular identification of enteroviruses by RT-PCR and amplicon sequencing, **J. Clin. Virol.**, 26: 375-7. 2003.

OBERSTE, M.S.; SCHNURR, D.; MAHER, K.; AL-BUSAIDY, S.; PALLANSCH, M.A. Molecular identification of new picornaviruses and characterization of a proposed Enterovirus 73 serotype. **J. Gen. Virol.**, 82 (2): 409-16. 2001.

OFFICE OF COLLEGE COMMUNICATIONS HOME PAGE. Disponível no endereço eletrônico: <http://www.people.cornellcollege.edu/jcardon/courses/viruses.html> (Acesso em 19/04/05).

OXMAN, M. Enterovirus. In: OXMAN, M. **Tratado de Medicina Interna**, vol.1. 20^a Ed. Bennett & Plum. 1999. p. 1968-78.

PALMEIRA, G. Epidemiologia. In: ROZENFELD, S. **Fundamentos da Vigilância Sanitária**. Rio de Janeiro: Ed. FIOCRUZ. 2003. p. 135-194.

PÉREZ, C.; PENA, M.J.; MOLINA, L.; TRALLERO, G.; GARCÍA, A.; ÁLAMO, F.; LAFARGA, B. Epidemic outbreak of meningitis due to Echovirus type 13 on the Island of Gran Canaria (Spain). **Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.**, 21 (7): 340-5. 2003.

POZO F.; CASAS I.; TENORIO A.; TRALLERO G.; ECHEVARRIA J.M. Evaluation of a commercially available reverse transcription-PCR assay for diagnosis of enteroviral infection in archival and prospectively collected cerebrospinal fluid specimens. **J. Clin. Microbiol.**, 36 (6): 1741-5. 1998.

PRINGLE, C.R. Virus taxonomy at the XIth International Congress of Virology, Sydney, Australia. **Arch. Virol.**, 144: 2065-70. 1999.

RACANIELLO, V.R. Poliovirus neurovirulence. **Adv. Virus Res.**, 34: 217-46. 1988.

RACANIELLO, V.R. *Picornaviridae*: the viruses and their replication. In: FIELDS, B.N.; KNIPE, D.M.; HOWLEY, P.M.; CHANOCK, R.M.; MELNICK, J.L.; MONATH, T.P.; ROIZMAN, B.; STRAUS, S.E. **Fields Virology**, fourth edition. Philadelphia: Lippincott-Williams & Wilkins, 2001; v.1, 685-722.

REINTJES, R.; POHLE, M.; VIETH, U.; LYYTIKAINEN, O.; TIMM, H.; SCHREIER, E.; PETERSEN, L. Community-wide outbreak of enteroviral illness caused by Echovirus 30: a cross-sectional survey and a case-control study. **Pediatr. Inf. Dis. J.**, 18 (2): 104-8. 1999.

REN, R.; RACANIELLO, V.R. Poliovirus spreads from muscle to the central nervous system by neural pathways. **J. Infect. Dis.**, 166 (4): 747-52. 1992

RICE, S.K.; HEINL, R.E.; THORNTON, L.L.; OPAL, S.M. Clinical characteristics, management strategies, and cot implications of a statewide outbreak of Enterovirus meningitis. **Clin. Infect. Dis.**, 20: 931-7. 1995.

ROMERO, J.R. Reverse-transcription polymerase chain reaction detection of the Enteroviruses. **Arch. Pathol. Lab. Med.**, 123: 1161-9. 1999.

ROTBART, H.A. Diagnosis of Enteroviral meningitis with the polymerase chain reaction. **J. Pediatr.**, 117: 85-9. 1995.

RUECKERT, R.R. *Picornaviridae*: The virus and their replication. In: FIELDS, B.N.; KNIPE, D.M.; HOWLEY, P.M.; CHANOCK, R.M.; MELNICK, J.L.; MONATH, T.P.; ROIZMAN, B.; STRAUS, S.E. **Fields Virology**. Third edition. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers. 1996. p. 2231-95.

SAWYER, M.H. Enterovirus infections: diagnosis and treatment. **Pediatr. Infect. Dis. J.**, 18: 1033-39. 1999.

SHIMIZU, H.; UTAMA, A.; YOSHII, K.; YOSHIDA, H.; YONEYAMA, T.; SINNIAH, M. Enterovirus 71 from fatal case and nonfatal cases of hand, foot and mouth disease epidemics in Malasia, Japan and Taiwan in 1997-1998. **Jpn. J. Infect. Dis.**, 52: 12-5. 1999.

SILVA, H.R.; TANAJURA, G.M.; TAVARES-NETO, J.; GOMES, M.D.; MDE, L.; LINHARES, A.D.; ADA, C.; VASCONCELOS, P.F.; KO, A.I. Aseptic meningitis syndrome due to Enterovirus and *Leptospira* sp in children of Salvador, Bahia. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, 35 (2): 159-65. 2002.

SOMEKH, E.; CESAR, K.; HANDSHER, R.; HANUKOGLU, A.; DALAL, I.; BALLIN, A.; SHOHAT, T. An outbreak of Echovirus 13 meningitis in central Israel. **Epidemiol. Inf.**, 130 (2): 257-62. 2003.

TEIXEIRA, C.F.; PAIM, J.S.; VILLASBÔAS, A.L. SUS, modelos assistenciais e vigilância da saúde. In: ROZENFELD, S. **Fundamentos da Vigilância Sanitária**. Rio de Janeiro: Ed. FIOCRUZ. 2003. p. 49-60.

THOELLEN, I.; LEMEY, P.; VAN DER DONCK, I.; BEUSELINCK, K.; LINDBERG, A.M.; VAN RANST, M. Molecular typing and epidemiology of Enteroviruses identified from an outbreak of aseptic meningitis in Belgium during the summer of 2000. **J. Med. Virol.**, Jul; 70 (3): 420-9. 2003.

TRALLERO, G.; CASAS, I.; AVELLÓN, A.; PÉREZ, C.; TENORIO, A.; DE LA LOMA, A. First epidemic of aseptic meningitis due to Echovirus type 13 among Spanish children. **Epidemiol. Inf.**, 130: 251-6. 2003.

TRALLERO, G.; CASAS, I.; TENÓRIO, A.; ECHEVARRIA, J.E.; CASTELLANOS, A.; LOZANO, A.; BRENA, P.P. Enterovirus in Spain: virological and epidemiological studies over 10 years (1988-97). **Epidem. Inf.**, 124: 497-506. 2000.

UNIVERSITY OF SOUTH CAROLINA HOME PAGE. Disponível no endereço eletrônico: <http://www.med.sc.edu> (Acesso em 01/06/04).

VERSTREPEN, W.A.; BRUYNSEELS, P.; MERTENS, A.H. Evaluation of a rapid real-time RT-PCR assay for detection of Enterovirus RNA in cerebrospinal fluid specimens. **J. Clin. Virol.**, 25 (1): S39-43. 2002.

WANG, J.R.; TSAI, H.P.; HUANG, S.W.; KUO, P.H.; KIANG, D.; LIU, C.C. Laboratory diagnosis and genetic analysis of an Echovirus 30-associated outbreak of aseptic meningitis in Taiwan in 2001. **J. Clin. Microb.**, 40 (12): 4439-44. 2002.

WHO. **Polio Laboratory Manual**. World Health Organization. Fourth edition. Geneva: WHO Document Production Services. 2004. 129p.