



Vigilância laboratorial da infeção a Enterovirus entre 2010 e 2013

Paula Palminha, Carlos Ribeiro, Carla Roque, Elsa Vinagre

paula.palminha@insa.min-saude.pt

Laboratório Nacional de Referência de Doenças Evitáveis pela Vacinação.
Departamento de Doenças Infecciosas, INSA.

Introdução

Os Enterovirus pertencem à família *Picornaviridae* e são vírus de ARN de cadeia simples e linear (1).

A sua transmissão é predominantemente por via fecal-oral, embora a via respiratória-oral, bem como o contacto com objetos contaminados também esteja descrito (1).

Estes vírus encontram-se divididos em 3 grupos, os vírus *Polio*, os *Coxsackievirus* (grupos A e B), e os *Echovirus*. Estão identificados 68 serotipos pertencendo, 3 serotipos aos vírus da Poliomielite, 23 aos *Coxsackievirus* do grupo A, 6 aos *Coxsackievirus* do grupo B e 29 aos *Echovirus*. Os Enterovirus identificados mais recentemente não são incluídos nesta classificação, sendo designados como Enterovirus 38, 68 e 71 (2).

As infeções a Enterovirus podem ser assintomáticas ou causar sintomatologia que pode variar de ligeira a grave. Os vírus da Poliomielite podem provocar infeções subclínicas, doença ligeira, meningite asséptica ou doença parálitica permanente e até mesmo fatal (poliomielite). Os *Coxsackievirus* são o agente etiológico mais comum na doença cardíaca viral e os *Echovirus* podem provocar desde febre, a meningite asséptica ou conjuntivite hemorrágica aguda (1).

Em 1988, a 41ª Assembleia Mundial de Saúde tomou a resolução de erradicar, a nível mundial, a poliomielite, tendo em 1995 Portugal iniciado o programa de erradicação (3). Em 1999, a OMS estabeleceu na região europeia uma rede de laboratórios de referência, em que participa o Laboratório Nacional de Referência da Poliomielite do Instituto Nacional de Saúde do Doutor Ricardo Jorge (INSA), que

passou a realizar a investigação laboratorial de todos os casos de paralisia flácida aguda (PFA) em crianças com menos de 15 anos e de todos os casos suspeitos de poliomielite em qualquer idade. Em 2002, a OMS declarou a Região Europeia livre de Poliomielite.

Em Portugal, em 2010, e como complemento ao sistema de vigilância da PFA (4) já existente, foi desenvolvido pelo Laboratório Nacional de Referência da Poliomielite do INSA, em colaboração com alguns hospitais, um sistema de vigilância laboratorial de Enterovirus, uma vez que o número de casos de PFA notificados anualmente foi sempre inferior ao preconizado pela OMS (≥ 1 caso PFA/100.000), sendo por isso, necessário complementar o sistema de vigilância da PFA vigente.

Objetivo

Analisar os resultados do diagnóstico laboratorial de casos suspeitos de infeção a Enterovirus recebidos no INSA ao abrigo do Programa de Erradicação da Poliomielite (Vigilância Laboratorial da PFA e de Enterovirus) entre 2010 e 2013.

Material e métodos

Para efeitos do presente trabalho, constituíram fonte de dados todos os hospitais que participaram na vigilância laboratorial da PFA e de Enterovirus, no âmbito do Programa de Erradicação da Poliomielite, e que no período em estudo enviaram ao INSA amostras clínicas de casos suspeitos de infeção a Enterovirus para confirmação laboratorial.

O diagnóstico laboratorial foi realizado por isolamento viral em cultura celular com posterior tipificação pela técnica de neutralização ou sequenciação genómica (5,6).

Preparação das amostras: as amostras fecais foram tratadas com clorofórmio de acordo com as indicações da OMS.

Isolamento viral: o isolamento viral foi realizado em tubo por inoculação de 200 μ l de fezes tratadas (extrato de fezes) em células Hep-2, RD, MRC-5 e L20B. A incubação processa-se a 37°C com 5% de CO₂. O efeito citopático (CPE) característico da multiplicação dos Enterovirus foi observado diariamente.



artigos breves_ n. 5

Identificação viral: a identificação viral foi efetuada por reação de neutralização. Para o efeito, utilizou-se *pools* de antissoros preparadas no *National Institute of Public Health and Environment (RIVM)*, em Bilthoven de acordo com os procedimentos da OMS (5). Nos casos em que não foi possível por reação de neutralização efectuar a identificação dos Enterovirus isolados esta foi realizada por sequenciação genómica.

Quando não foi possível identificar os Enterovirus isolados pela técnica de neutralização ou por sequenciação genómica, estes foram designados por Enterovirus não Polio (EVNP).

_Resultados

Entre 2010 e 2013 foram analisadas 651 fezes de 625 casos suspeitos de infeção por Enterovirus, dos quais 28 eram casos de PFA. Foram igualmente analisadas fezes de 7 casos de meningite asséptica, provenientes de 3 surtos sem ligação epidemiológica no espaço, no tempo e entre indivíduos conhecida que ocorreram em Portugal.

Entre 2010 e 2013 foram identificados 143 (143/625; 22,9%) casos de infeção a Enterovirus com a seguinte distribuição temporal: 46 casos em 2010; 47 em 2011; 24 em 2012 e 26 casos em 2013 (tabela 1).

Tabela 1: Distribuição do número de casos de infeção a Enterovirus por ano de diagnóstico, 2010-2013.

Ano	Casos positivos		Casos negativos		Total	
	n	%	n	%	n	%
2010	46	29	108	71	154	100
2011	47	32	100	68	147	100
2012	24	16	124	84	148	100
2013	26	15	150	85	176	100
Total	143		482		625	

Em 2010, os Enterovirus mais frequentemente isolados no INSA foram o *Echovirus 6* (34,8%) e o *Echovirus 30* (23,9%). Em 2011, o *Echovirus 6* e o *Echovirus 11* constituíram respetivamente 14,9% e 19,1% do total de casos diagnosticados nesse ano. Em 2012, o *Echovirus 21* (29,2%) e em 2013 o *Echovirus 5* (11,5%) foram os mais frequentes. Em 2013 foram igualmente isolados 2 vírus da Poliomielite tipo 1 e tipo 3 *Sabin like* numa criança residente em Angola sem suspeita de poliomielite (tabela 2).

Dos 143 casos positivos para Enterovirus, a grande maioria (n=105; 73,4%) não referiu o diagnóstico clínico suspeito da infeção. Os restantes 38 casos positivos (26,6%) possuíam diagnóstico clínico de meningite.

_Discussão e conclusões

Em 2010, o *Echovirus 6* e o *Echovirus 30* foram os Enterovirus predominantemente identificados, correspondendo a cerca de 60% dos casos positivos diagnosticados no INSA.

Da análise da distribuição do número de casos de infeção por Enterovirus entre 2010 e 2013 verificou-se que o *Echovirus 6* foi o vírus mais frequente, seguido dos EVNPs. Acrescente-se que se verificou uma acentuada diminuição de casos de infeção por *Echovirus 30* entre 2010 e 2012 e que nenhum caso foi identificado no INSA em 2013. É igualmente de realçar que em 2012 foram isolados, pela primeira vez em Portugal, três vírus *Enterovirus 71* cujo genótipo (C2) é circulante na Europa.

Saliente-se que em 2013 os EVNPs corresponderam a 30,9% dos vírus isolados, sendo o *Echovirus 5* o segundo vírus mais frequente (11,5%). Neste mesmo ano foram igualmente isolados 2 vírus da Poliomielite tipo 1 e tipo 3 estirpe *Sabin like* numa criança residente em Angola sem quadro clínico de poliomielite.

Tabela 2: ↓ Distribuição do número de casos de infeção a Enterovirus por ano de diagnóstico, 2010-2013.

Vírus	Ano de diagnóstico							
	2010		2011		2012		2013	
	n	%	n	%	n	%	n	%
Coxsackie B2	1	2,2	3	6,4	-	-	-	-
Coxsackie B3	2	4,3	1	2,1	-	-	-	-
Coxsackie B4	-	-	-	-	1	4,2	-	-
Coxsackie B5	1	2,2	1	2,1	1	4,2	2	7,7
Coxsackie A2	-	-	-	-	1	4,2	-	-
Coxsackie A4	-	-	2	4,3	1	4,2	-	-
Coxsackie A6	1	2,2	-	-	-	-	1	3,8
Coxsackie A8	-	-	1	2,1	-	-	1	3,8
Coxsackie A9	3	6,5	4	8,5	-	-	-	-
Coxsackie A11	2	4,3	-	-	-	-	-	-
Coxsackie A16	-	-	2	4,3	-	-	-	-
Echovirus 3	-	-	-	-	-	-	1	3,8
Echovirus 4	-	-	-	-	-	-	1	3,8
Echovirus 5	-	-	-	-	1	4,2	3	11,5
Echovirus 6	16	34,8	7	14,9	3	12,5	2	7,7
Echovirus 7	2	4,3	4	8,5	-	-	-	-
Echovirus 9	-	-	-	-	-	-	-	-
Echovirus 11	2	4,3	9	19,1	-	-	-	-
Echovirus 13	-	-	-	-	-	-	2	7,7
Echovirus 18	-	-	1	2,1	4	16,7	-	-
Echovirus 21	-	-	-	-	7	29,2	1	3,8
Echovirus 25	4	8,8	1	2,1	1	4,2	2	7,7
Echovirus 30	11	23,9	4	8,5	1	4,2	-	-
Enterovirus 71	-	-	3	6,4	1	4,2	-	-
Poliovirus tipo 1	-	-	0	-	-	-	1	7,7
Poliovirus tipo 3	-	-	0	-	-	-	1	7,7
EVNP *	1	2,2	4	8,5	2	8,3	8	30,9
Total	46	100	47	100	24	100	26	100

* Enterovirus não Polio

A distribuição dos casos positivos por diagnóstico clínico carece de apreciação, uma vez que a maior parte dos instrumentos de notação que acompanharam os produtos biológicos não mencionavam esta informação.

Apesar dos 3 surtos de meningite asséptica não terem ligação epidemiológica no espaço, no tempo e entre indivíduos conhecida, o *Echovirus 6* foi o agente etiológico responsável por estes surtos.

Por último, saliente-se que a vigilância laboratorial de Enterovirus parece ser um instrumento útil ao sistema de vigilância da PFA, pois não só possibilita conhecer os Enterovirus em circulação em Portugal como permite identificar vírus da poliomielite, demonstrando assim a sua sensibilidade na identificação destes vírus importados.

Agradecimento

À Doutora Cristina Furtado pela revisão científica do artigo.

Referências bibliográficas:

- (1) Pallansch MA, Roos RP. Enteroviruses: polioviruses, coxsackieviruses, echoviruses, and newer enteroviruses. In: Edited by Knippe DM, Howley PM Fields Virology. 4th ed. Philadelphia, PA: Lippincott Williams and Wilkins; 2001:723-75.
- (2) Stanway G, Brown F, Christian P, et al. Picornaviridae. In: Fauquet CM, Mayo MA, Maniloff J, et al. (eds). Virus taxonomy-classification and nomenclature of viroses: eight report of the International Committee on the Taxonomy of Viruses. Amsterdam, The Netherlands: Elsevier Academic Press, 2005, pp. 757-78.
- (3) Direção-Geral da Saúde. Circular Normativa nº15/DSSP de 03/10/1995. Programa de erradicação da poliomielite: vigilância clínica, epidemiológica e laboratorial da paralisia flácida aguda. (Revogada pela Circular Normativa nº 7/DSPS, de 08/06/1999, que reforçou a operacionalidade do Programa de vigilância clínica, epidemiológica e laboratorial da Paralisia Flácida Aguda (PFA).
- (4) Direção-Geral da Saúde. Circular Normativa nº 08/DSPS de 04/05/2004 - Programa Nacional de Erradicação da Poliomielite - Plano de Acção Pós-Eliminação. [LINK](#)
- (5) World Health Organization. Polio laboratory manual. 4th ed. Geneva: WHO, 2004. [LINK](#)
- (6) Oberste MS, Maher K, Kilpatrick DR et al. Typing of human enteroviruses by partial sequencing of VP1. J Clin Microbiol. 1999;37(5):1288-93. [LINK](#)