

Enterovírus não-polio e infeções do sistema nervoso central em crianças: avaliação laboratorial, 2023-2024

Non-polio enterovirus serotypes associated with central nervous system infections in children: evaluation of laboratory cases, 2023–2024

Paula Palminha¹, Raquel Neves¹, Carlos Ribeiro¹, Ana Margarida Garcia², Inês Sousa Fontes², Catarina Gouveia², Rita Corte-Real³

paula.palminha@insa.min-saude.pt

(1) Laboratório Nacional de Referência para as Doenças Evitáveis por Vacinação. Departamento de Doenças Infecciosas, Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, Lisboa, Portugal

(2) Unidade de Doenças Infecciosas. Serviço de Pediatria Médica, Unidade Local de Saúde de São José, Lisboa, Portugal

(3) Laboratório de Biologia Molecular. Patologia Clínica, Unidade Local de Saúde de São José, Lisboa, Portugal

_Resumo

Os enterovírus não-polio permanecem como os principais agentes patogénicos do sistema nervoso central (SNC) em todo o mundo, especialmente em crianças com idade inferior a 5 anos, causando desde doença ligeira a quadros graves que podem evoluir para desfechos fatais.

Entre 2023 e 2024 foram analisadas no INSA fezes de 327 crianças com suspeita de infeção por enterovírus. O diagnóstico laboratorial incluiu a deteção do RNA viral por RT-PCR em tempo real e o isolamento viral. A identificação viral foi realizada por sequenciação genómica.

Neste período foram identificados 109 (33,3%) casos de infeção a enterovírus, dos quais 26 casos (23,9%) corresponderam a infeções do SNC, maioritariamente em crianças com menos de 5 anos (88,5%), sem uma evidente distribuição temporal. Os enterovírus mais frequentes foram os echovírus (tipos 5, 6, 7, 9, 18, 21, 25, 30, 31 e 32), detetados em 13 casos (52,0%), seguidos pelos Coxsackievírus A (tipos 4, 6, 9, 10 e 16), em 7 casos (28,0%), ambos associados a meningite e meningoencefalite. O Enterovírus 71 (EV71) foi detetado em dois casos, um de romboencefalite e um de paralisia flácida aguda (PFA), e um caso de meningite esteve associado ao EV-C99. Não se observou nenhum padrão de surto nestes dois anos.

Estes resultados reforçam a relevância da identificação rápida e dirigida para enterovírus como agentes etiológicos de infeções do SNC, fundamental para uma intervenção clínica direcionada, evitando o uso desnecessário de antibióticos e de múltiplos exames complementares de diagnóstico.

_Abstract

Non-polio enteroviruses remain the major pathogens of the central nervous system (CNS) worldwide, especially in children under five years of age causing a range of diseases from mild to severe, which can lead to fatal outcomes.

Between 2023 and 2024, stool samples from 327 children with suspected enterovirus infection were analysed at INSA. Laboratory diagnosis included detection of viral RNA by real-time RT-PCR and viral isolation. Serotype identification was performed through genomic sequencing.

During this period, 109 (33.3%) cases of enterovirus infection were identified, of which 26 (23.9%) involved CNS infections, predominantly in children under 5 years of age (88.5%), without an evident temporal distribution. The most frequent enteroviruses were echoviruses (types 5,

6, 7, 9, 18, 21, 25, 30, 31, and 32), detected in 13 cases (52.0%), followed by Coxsackieviruses A (types 4, 6, 9, 10, and 16), in 7 cases (28.0%), both associated with meningitis and meningoencephalitis. Enterovirus 71 (EV71) was identified in two cases, one of rhombencephalitis and one of acute flaccid paralysis (AFP), while EV-C99 was associated with a case of meningitis. No outbreak pattern was observed.

These findings underscore the importance of rapid and targeted identification of enteroviruses as causative agents of CNS infections, which is crucial for guiding appropriate clinical management and preventing unnecessary use of antibiotics and multiple complementary diagnostic procedures.

_Introdução

Os enterovírus humanos são classificados em quatro grupos principais (enterovírus A, B, C e D), com mais de 110 serótipos humanos formalmente reconhecidos (1). A transmissão ocorre predominantemente por via fecal-oral, embora a transmissão respiratório-oral e o contacto com objetos contaminados também tenham sido descritos (1). Estes vírus replicam-se no trato intestinal, sendo excretados nas fezes, durante um período de 3 a 6 semanas (1).

Em climas temperados, a incidência de infeções por enterovírus aumenta a partir do verão até ao outono (2).

Com a quase total interrupção global da transmissão das estirpes selvagens do vírus da poliomielite, os enterovírus não-pólio mantêm-se como os principais agentes patogénicos que afetam o sistema nervoso central (SNC) a nível mundial, particularmente em crianças com idade inferior a 5 anos (3). As principais síndromes neurológicas associadas à infeção por enterovírus incluem meningite, encefalite,

meningoencefalite crónica em indivíduos imunocomprometidos e paralisia flácida aguda (PFA) causada tanto por enterovírus não-pólio (NPEVs) como por vírus da poliomielite derivados de vacinas (VDPVs) (3).

Os echovírus (ECVs) e os vírus Coxsackie do grupo B (CVBs) — particularmente ECV4, ECV6, ECV9, ECV11, ECV16, ECV30, bem como CVB2 e CVB5 — são os principais enterovírus associados à meningite (4). Relativamente aos Coxsackievírus A, nomeadamente os serótipos A5 e A9, são igualmente reconhecidos como agentes causais de infeções agudas do SNC (5). A romboencefalite, um tipo distinto de encefalite do tronco cerebral, tem sido associada à infeção pelo vírus EV71 (6).

A maioria destas infeções é autolimitada e não requer terapêutica específica. No entanto, em grupos de alto risco e em doentes infetados com serótipos mais virulentos pode decorrer doença grave ou morte (5).

_Objetivos

Este estudo teve como objetivo avaliar os resultados do diagnóstico laboratorial obtidos nos últimos dois anos (2023-2024), no âmbito da Vigilância Laboratorial da Paralisia Flácida Aguda e de Enterovírus, sob a égide do Laboratório Nacional de Referência para as Doenças Evitáveis por Vacinação do Instituto Nacional de Saúde e conforme Circular Normativa nº 017/2014 de 27 de novembro de 2014.

_Materiais e métodos

População em estudo

Entre 2023 e 2024 foi realizado o diagnóstico laboratorial em amostras fecais provenientes de 327 crianças com idades compreendidas entre 1 mês e 17 anos de idade e com quadro clínico suspeito de infeção por enterovírus. A população estudada tinha uma idade média de 4 anos e uma mediana de 2 anos dos quais 53 (16,2%) eram lactantes (< 1 ano). Globalmente 43,1% (n=141) das crianças eram do sexo feminino e 56,9% (n=186) do sexo masculino.

Métodos

O diagnóstico laboratorial foi realizado por deteção do RNA viral por RT-PCR em tempo real, isolamento viral em cultura celular com posterior tipificação por sequenciação genómica.

Preparação das amostras: as amostras fecais foram tratadas com clorofórmio de acordo com as indicações da OMS (7).

Deteção do RNA viral: A deteção de RNA foi realizada por RT-PCR em tempo real, utilizando reagentes comerciais. Este ensaio foi executado segundo as instruções do fabricante e amplifica uma região altamente conservada do vírus, 5' UTR o que permite a deteção dos enterovírus humanos já identificados.

Isolamento viral: o isolamento viral foi realizado em tubo, por inoculação de 200 µl de fezes tratadas (extrato de fezes) em células Hep-2, RD e L20B.

As Hep-2 são sensíveis sobretudo aos Coxsackievírus B, as RD são altamente sensíveis aos enterovírus (polio e não-polio), produzindo um efeito citopático (CPE) característico. As L20B são específicas para os vírus da poliomielite, que produzem nesta linha o CPE característico dos enterovírus.

A incubação processou-se a 37°C com 5% de CO₂. Os tubos foram observados diariamente para avaliar o aparecimento do CPE característico da multiplicação dos enterovírus (7).

Identificação viral: a identificação viral foi realizada por sequenciação genómica, de acordo com o método descrito por Nix et al. (9,10). Para tal, foi analisada a sequência nucleotídica do gene que codifica a proteína VP1, dada a elevada correlação existente entre esta proteína e a identificação efetuada por métodos antigénicos (9).

_Resultados

Entre 2023 e 2024 foram identificados 109 (109/327; 33,3%) casos de infeção a enterovírus com a seguinte distribuição temporal: 57 casos em 2023 e 52 em 2024 (tabela 1).

Dos 109 casos de infeção a enterovírus identificados, 26 casos (26/109; 23,9%) estavam associados a infeções do SNC, sem uma evidente distribuição temporal específica (tabela 2).

Tabela 1: Distribuição do número de casos de infeção por enterovírus por ano de diagnóstico, 2023-2024.

Ano	Casos Positivos		Casos Negativos		Total	
	n	%	n	%	n	%
2023	57	36,8	98	63,2	155	100,0
2024	52	30,2	120	69,8	172	100,0
Total	109	33,3	218	66,7	327	100,0

Tabela 2: Distribuição do número de casos de infeção por Enterovirus por patologia, 2023-2024.

Ano	Infeções do SNC		Outras Patologias		Total	
	n	%	n	%	n	%
2023	15	26,3	42	73,7	57	100,0
2024	11	21,2	41	78,8	52	100,0
Total	26	23,9	83	76,1	109	100,0

A maioria das infeções do SNC ocorreram em crianças com idade compreendida entre 1 e 4 anos (14/26; 53,8%), seguida pelos lactentes (<1 ano) com 9 casos diagnosticados (tabela 3).

Tabela 3: Distribuição por grupo etário dos casos de infeções do SNC, 2023-2024.

Idade (anos)	Infeções do SNC	
	n	%
<1	9	34,6
1-4	14	53,8
≥5	3	11,5
Total	26	100,0

Dos 26 vírus associados a casos de infeção do SNC, não foi possível identificar o serótipo em um caso, tendo sido o vírus isolado classificado como EVNP, uma vez que não foi observado CPE nas células L20B. Dos restantes vírus identificados, nove (34,6%) pertenciam à espécie A, 15 (57,7%) à espécie B e um (3,8%) à espécie C (tabela 4). Não foram identificados vírus da espécie D.

Tabela 4: Distribuição do número de enterovírus isolados por espécie.

Espécie	n	%	Total
EV-A	9	34,6	
EV-B	15	57,7	96,2
EV-C	1	3,8	
EVNP	1	3,8	3,8
Total	26		100,0

Dos 25 vírus serotipados, os echovírus foram os mais frequentes representando 52,0% dos casos (13 em 25). Os tipos de echovírus identificados incluíram o E5, E6, E7, E9, E18, E21, E25, E30, E31 e E32, associados a meningite e meningoencefalite. Os Coxsackievírus A (tipos A4, A6, A9, A10 e A16) foram o segundo grupo mais frequente, detetado em 28,0% dos casos (7 em 25) e igualmente associados a casos de meningite e meningoencefalite. O Enterovírus A71 (EV-A71) foi identificado em dois casos, uma romboencefalite e uma paralisia flácida aguda (PFA). Um único caso de meningite foi atribuído ao Enterovírus C99 (EV-C99) (tabela 5).

Tabela 5: ↓ Distribuição dos serótipos de enterovírus de acordo com o diagnóstico clínico, 2023-2024.

Espécie	Serotipo	Encefalite	Meningoencefalite	Meningite	Romboencefalite	Ataxia aguda	PFA	Total	%
EV-A	CoxA4	1	-	-	-	-	-	9	36,0
	CoxA6	-	1	-	-	-	-		
	CoxA9	-	-	2	-	-	-		
	CoxA10	1	-	-	-	-	-		
	CoxA16	-	-	1	-	1	-		
	EV71	-	-	-	1	-	1		
EV-B	CoxB3	-	1	-	-	-	-	15	60,0
	CoxB5	-	1	-	-	-	-		
	Echo5	-	-	1	-	-	-		
	Echo6	-	-	2	-	-	-		
	Echo7	-	1	1	-	-	-		
	Echo9	-	2	1	-	-	-		
	Echo18	-	-	1	-	-	-		
	Echo21	-	-	-	1	-	-		
	Echo25	-	-	1	-	-	-		
	Echo30	-	-	1	-	-	-		
	Echo32	-	-	-	-	-	1		
	EV-C	EV C99	-	-	-	-	-		
Total								25	100,0

Discussão e conclusões

Entre 2023 e 2024, as infeções do sistema nervoso central representaram 23,9% (n=26) do total de casos confirmados de infeção por enterovírus, afetando predominantemente crianças com menos de cinco anos sem uma evidente distribuição temporal.

Os enterovírus da espécie B (EV-B) foram os mais frequentes, tendo sido detetados em 60,0% dos casos, seguidos pelos Enterovírus da espécie A (EV-A), responsáveis por 36,0% dos casos. Este padrão coincide com o descrito na literatura sobre a epidemiologia destes vírus, na qual os EV-B constituem o grupo mais frequentemente associado a manifestações neurotrópicas, como meningite e meningoencefalite, enquanto os EV-A apresentam menor envolvimento em infeções do SNC.

A maioria das infeções por EV-B teve como agentes etiológicos os echovírus, com identificação de vários serótipos, todos associados a casos de meningite e meningoencefalite. Os Coxsackievírus A constituíram o segundo grupo mais frequente,

também associados ao envolvimento do SNC, particularmente em casos de meningite asséptica e meningoencefalite.

O Enterovírus A71 (EV-A71) foi identificado em dois casos clínicos—romboencefalite e paralisia flácida aguda (PFA) — em concordância com o reconhecido potencial neurovirulento deste serótipo. Num único caso de meningite foi identificado o Enterovírus C99 (EV-C99), serótipo raramente associado a infeções do SNC, o que por si só justifica uma investigação futura mais aprofundada.

Os vírus identificados neste período em estudo são consistentes com o descrito na literatura (2) e sugerem que, entre 2023 e 2024, as infeções do SNC não estiveram associadas a surto resultante da circulação de um serótipo. Este estudo reforça a importância da identificação atempada dos enterovírus como agentes etiológicos das infeções virais do SNC, particularmente em crianças com idades inferiores a 5 anos, uma vez que esta precisão diagnóstica permitirá uma gestão clínica direcionada, reduzindo o uso desnecessário de antibióticos e minimizando a necessidade de múltiplos exames complementares de diagnóstico.

artigos breves_ n. 7

Agradecimentos:

À equipa do Laboratório de Biologia Molecular do CHLC (Olga Costa, Helena Matias, Lídia Santos, Lurdes Gavancho, Patrícia Miguel, Paula Afonso, Paula Soares, Sara Gomes, Sofia Santos, Susana Silva) por enviarem as amostras que em grande parte permitiram este trabalho, bem como a todos os hospitais que colaboraram nesta vigilância.

Referências bibliográficas:

- (1) Pallansch MA, Roos R. Enteroviruses: polioviruses, coxsackieviruses, echoviruses, and newer enteroviruses. In: Knipe DM, Howley PM (eds). *Fields virology*. Volume 1. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2006, pp. 840-867.
- (2) Romero JR. Diagnosis and Management of Enteroviral Infections of the Central Nervous System. *Curr Infect Dis Rep*. 2002 Aug;4(4):309-16. <https://doi.org/10.1007/s11908-002-0023-1>
- (3) Romero JR, Newland JG. Viral meningitis and encephalitis: traditional and emerging viral agents. *Semin Pediatr Infect Dis*. 2003 Apr;14(2):72-82. <https://doi.org/10.1053/spid.2003.127223>
- (4) Jmii H, Fisson S, Aouni M, et al. Type B coxsackieviruses and central nervous system disorders: critical review of reported associations. *Rev Med Virol*. 2021 Jul;31(4):e2191. Epub 2020 Nov 7. <https://doi.org/10.1002/rmv.2191>
- (5) Rudolph H, Schroten H, Tenenbaum T. Enterovirus Infections of the Central Nervous System in Children: An Update. *Pediatr Infect Dis J*. 2016 May;35(5):567-69. <https://doi.org/10.1097/INF.0000000000001090>
- (6) Huang CC, Liu CC, Chang YC, et al. Neurologic complications in children with enterovirus 71 infection. *N Engl J Med*. 1999 Sep 23;341(13):936-42. <https://doi.org/10.1056/NEJM199909233411302>
- (7) World Health Organization. *Polio laboratory manual*, 4th ed. Geneva: WHO, 2004. <https://iris.who.int/handle/10665/68762>
- (8) <http://www.who.int/vaccines/en/poliolab/webhelp/>
- (9) Centers for Disease Control and Prevention (US), World Health Organization. Regional Office for Europe. *Enterovirus surveillance guidelines : guidelines for enterovirus surveillance in support of the Polio Eradication Initiative*. 2015. <https://stacks.cdc.gov/view/cdc/82809>
- (10) Nix WA, Oberste MS, Pallansch MA. Sensitive, seminested PCR amplification of VP1 sequences for direct identification of all enterovirus serotypes from original clinical specimens. *J Clin Microbiol*. 2006 Aug;44(8):2698-704 <https://doi.org/10.1128/JCM.00542-06>