

Pesquisa de enterovírus em casos de síndrome de meningite asséptica de Belém, PA

Investigation of enterovirus in cases of aseptic meningitis syndrome of Belém, PA

Letícia Martins Lamarão¹, Maria de Lourdes Contente Gomes², Lauze Lee Alves Ferreira³, Cleide Mara Fonseca⁴, Lia C.B. Araújo⁴, Marquete B. Santana⁴ e José Tavares-Neto⁵

RESUMO

Com o objetivo de isolar e identificar os sorotipos de enterovírus, agentes etiológicos mais frequentes da síndrome de meningite asséptica, foram estudadas amostras de líquido de pacientes da unidade de saúde de referência da Cidade de Belém-PA, do período de março de 2002 a março de 2003. As amostras foram inoculadas em cultivos celulares RD e HEp-2, e as positivas identificadas por neutralização ou imunofluorescência indireta. De 249 amostras, 33 (13,2%) foram positivas sendo 57,6% (n=19) em pacientes menores de 11 anos ($p < 0,03$) e predominantemente (72,7%) naqueles do sexo masculino ($p < 0,008$). Os sorotipos isolados foram: Echovírus 30 (n=31), Coxsackievírus B5 (n=1) e Echovírus 30 e 4. Em conclusão, estudos deste tipo servem também para melhor compor o quadro nacional, ainda pouco definido, sobre os agentes enterovirais mais prevalentes em casos de SMA.

Palavras-chaves: Enterovírus. Meningite asséptica. Líquor.

ABSTRACT

With the objective of isolating and identifying enteroviral serotypes, which are the most frequent etiologic agents of aseptic meningitis syndrome, cerebrospinal fluid samples were studied from patients referred to the health unit in the City of Belém (State of Pará, Brazil), from March 2002 to March 2003. The samples were inoculated in RD and HEp-2 cells line, and the positive were identified by neutralization test or indirect immunofluorescence. Out of 249 samples, 33 (13.2%) were positive 57.6% (n = 19) in patients under 11 years of age ($p < 0.03$) and predominantly (72.7%) in males ($p < 0.008$). The serotypes isolated were: Echovirus 30 (n = 31), Coxsackievirus B5 (n = 1) and Echovirus 30 and 4. In conclusion, this type of study also serves to determine the national picture, which is still little defined, regarding the most prevalent viral agents in AMS cases.

Key-words: Enterovirus. Aseptic meningitis. Cerebrospinal fluid.

A síndrome de meningite asséptica (SMA) é definida pela inflamação do espaço subaracnóide, caracterizada por pleocitose de células mononucleares, e causada por agentes químicos, biológicos e farmacológicos¹². Todavia, a maioria dos casos tem etiologia viral, destacando-se os enterovírus (EV) que nos Estados Unidos são responsáveis por 80% dos casos de SMA com etiologia definida¹⁰.

Os enterovírus pertencem à família *Picornaviridae*, possuem de 28-30nm de diâmetro, genoma de RNA de fita

simples e polaridade positiva e replicam-se no citoplasma das células hospedeiras (em complexos associados à membrana)¹⁰. Esses vírus possuem como características favoráveis à transmissão, principalmente feco-oral, a estabilidade em ambientes ácidos (ausência do envelope lipídico) e a resistência aos desinfetantes comuns, além de persistirem viáveis por dias à temperatura ambiente²². Como causa de doença em humanos, já foram descritos os seguintes EV: poliovírus (3 sorotipos); coxsackievírus A (Cox A, 24 sorotipos); coxsackievírus B (Cox B, 6 sorotipos),

1. Curso de Pós-graduação em Medicina e Saúde da Faculdade de Medicina da Universidade Federal da Bahia, Salvador, BA. 2. Instituto Evandro Chagas, Belém, PA. 3. Universidade Federal do Pará, Belém, PA. 4. Unidade Básica de Saúde do bairro da Pedreira da Secretaria-executiva de Estado da Saúde do Pará, Belém, PA. 5. Faculdade de Medicina da Universidade Federal da Bahia, Salvador, BA.

Endereço para correspondência: Profª Maria de Lourdes Contente Gomes. Seção de Virologia/IEC. Av. Almirante Barroso 492, 66090-000 Belém, PA.

Tel: 55 91 214-2018

e-mail: llamarao@uol.com.br

Recebido para publicação em 30/9/2004

Aceito em 27/6/2005

echovírus (echo, 31 sorotipos); e os enterovírus (EV) 68-71²². Mais recentemente, a nova classificação para a família *Picornaviridae* propõe aquela divisão em cinco grupos: poliovírus (PV); e enterovírus humanos (EH) distribuídos em 4 tipos (A, B, C e D)¹⁹.

Os echovírus (Echo) têm sido descritos como o tipo de EV mais freqüentemente associado aos casos de SMA. Estudo realizado num período de 10 anos (1988-1997), por Trallero cols²⁷, mostrou que os Echo foram responsáveis por 90% dos 727 casos identificados como EV não-pólio, sendo os sorotipos mais prevalentes os Echo 30, 9, 6 e 4. Chomel cols⁹ encontraram 3 sorotipos de Echo (30, 13 e 6) durante surto ocorrido em 2000 na França. Atkinson cols², em Londres, destacaram como os mais prevalentes os Echo (19, 11, 9, 7) e o coxsackievírus (Cox) A9. Em Cuba, Bello cols⁴ identificaram o Cox B5 como responsável pelo surto ocorrido no ano de 1995. Nos Estados Unidos, segundo os dados publicados pelo Center for Disease Control and Prevention (CDC), há ocorrências de surtos atribuídos ao Echo 9 e 30, durante o ano de 2003, e também por outros sorotipos (Cox B1, B4, A9; Echo 9, 7, 5 e EV-71)⁷.

Embora a faixa etária mais atingida pelos EV seja até a idade de 15 anos^{1 20}, existem relatos de casos em pessoas na idade adulta^{18 23}. No Brasil, ainda são poucos os estudos sobre a etiologia viral em casos de SMA. Em 1967, a partir de 40 casos clínicos de SMA em hospital da Cidade de São Paulo, foi descrito o poliovírus como o agente etiológico¹¹. Na Cidade do Rio de Janeiro, Bedoya cols³ também descreveram a etiologia pelos EV em 21,8% das 188 amostras de líquido provenientes de pacientes com SMA do Hospital São Sebastião, no período de 1996 a 1997. Em 1998, ocorreram 2 surtos de SMA atribuídos ao Echo 30, um na Cidade de São Paulo²⁶ e outro em Londrina-PR¹⁴, sendo esse vírus isolado, respectivamente, em 57% e 43% das amostras de líquido dos pacientes. Na Cidade de Salvador-BA, Silva cols²⁵ relataram o provável envolvimento dos EV em 112 casos de SMA, com comprovação sorológica em 60% dos mesmos e pelos seguintes sorotipos: Echo (4 e 9), Cox B (2, 3 e 6) e EV-71.

Também, considerando-se a relevância para o sistema nacional de vigilância virológica em se obter mais informações sobre os EV no Brasil, especialmente na região Norte do País, este estudo teve por objetivo caracterizar quais os EV envolvidos em casos de SMA, provenientes de unidade de saúde de referência da Cidade de Belém, PA.

MATERIAL E MÉTODOS

Neste estudo transversal, foram utilizadas amostras de líquido de pacientes com suspeita clínica de SMA, atendidos no período de março de 2002 a março de 2003, na Unidade Básica de Saúde (UBS) do bairro da Pedreira, em Belém-PA, credenciada pela Secretaria de Estado da Saúde como referência para os casos suspeitos de infecção do sistema nervoso central (SNC), e procedentes de todos os municípios da região metropolitana de Belém. Os pacientes, ou seus responsáveis legais, receberam informações sobre a SMA, assim como do objetivo da pesquisa a ser realizada, sendo

incluídos no estudo somente aqueles que concordaram em participar e assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido.

Os seguintes dados clínico-epidemiológicos foram extraídos da ficha de investigação do Sistema Nacional de Agravos de Notificação (SINAN): sexo; idade; cidade da residência e, se em Belém, o bairro; duração do quadro clínico que motivou a consulta na UBS-Pedreira; quadro clínico apresentado no primeiro atendimento na unidade de saúde (cefaléia, febre, vômito, convulsão, rigidez de nuca, sinais de irritação meníngea, abaulamento de fontanela e caracterização do exantema); e se houve hospitalização.

O líquido, após coletado por médico da UBS-Pedreira, foi separado em duas alíquotas, sendo uma delas encaminhada ao Laboratório da própria UBS-Pedreira para a realização dos exames: bioquímica (glicose e proteínas); celularidade (número de células/mm³ e a porcentagem de linfo-mononucleares e polimorfonucleares) e microbiológicos (Gram, tinta da China e culturas para bactérias piogênicas e o *Mycobacterium tuberculosis*). A segunda alíquota foi congelada, de imediato, em uma ampola de nitrogênio líquido e enviada, sob congelamento, para o laboratório da Seção de Virologia do Instituto Evandro Chagas (IEC) em Ananindeua-PA, onde foram conservadas a -70°C. Posteriormente, só foram utilizados os espécimes com todos aqueles exames microbiológicos negativos e o diagnóstico enteroviral foi realizado pelo método "padrão-ouro" (*gold-standard*), de isolamento viral em cultivo celular e identificação por neutralização com soros sorotipos-específicos¹³.

Isolamento viral. Para cada amostra, foi inoculado 0,1ml de líquido em tubo contendo cultivo celular de linhagem contínua e sensível aos EV¹³: RD (rabdomyosarcoma embrionário humano); e HEp-2 (carcinoma epidermóide de laringe humana). Ambos os meios de cultivos foram mantidos em meio enriquecido com 1,5g/l de bicarbonato de sódio, 2% de glutamina 200mM, 1% de hepes 1M, 10% de soro bovino fetal, 0,1% de penicilina (100.000u/ml) e estreptomomicina (100.000µg/ml). Esse meio, no momento da inoculação do espécime, foi trocado por outro de composição semelhante exceto pela concentração de soro bovino (2%) e o acréscimo de 0,06% de anfotericina B (Fungison®) na concentração de 5.000µg/ml. Após esse procedimento, os tubos foram mantidos em estufa (37°C) e o cultivo observado no microscópio de inversão durante nove dias, buscando alterações celulares morfológicas, e quando presentes, caracterizadas como efeito citopático (ECP) provocado por EV. As culturas positivas, foram congeladas antes da total destruição (aproximadamente 70% de ECP) da camada celular para a posterior etapa de titulação e identificação viral ou preparação de lâminas para a imunofluorescência indireta (IFI); quando negativas (sem ECP), foram congeladas e descongeladas três vezes para a destruição celular e liberação de possíveis partículas virais, sendo a suspensão inoculada novamente em cultivo celular (segunda passagem, seguindo os mesmos procedimentos anteriores).

Identificação viral. Os EV isolados foram inicialmente titulados (diluições seriadas de 10x) para conhecimento da

dose ideal ($\pm 100\text{TCD}_{50}/\text{ml}$) a ser utilizada no teste de neutralização em cultivo celular¹³. As amostras foram testadas com soros imunes para poliovírus e posteriormente com soros sorotipos-específicos para EV não-pólio. Para as amostras não-tipadas nesse teste, sugestivo da presença de mais de um sorotipo¹⁵, utilizou-se a imunofluorescência indireta (IFI; "kit" CHEMICON®), seguindo-se as orientações do fabricante.

Análise estatística. O banco de dados foi elaborado e analisado no programa SPSS (versão 9.0). Para as variáveis não-paramétricas utilizou-se o teste do qui-quadrado ou teste de Mann-Whitney, e nas variáveis quantitativas com distribuição normal, o teste t de Student. Nessas análises, estabeleceu-se o intervalo de confiança (IC) de 95% e os resultados foram considerados estatisticamente significativos quando o valor da probabilidade (p) de alfa (erro I) foi $\leq 0,05$ (5%).

RESULTADOS

No período do estudo, a UBS-Pedreira investigou 1.046 pacientes com suspeita de infecção do SNC, dos quais 23,6% tiveram o agente etiológico identificado (bactérias ou fungos). Dos 799 (76,4%) pacientes com exames microbiológicos negativos, foram excluídos aqueles com residência em municípios não pertencentes à região metropolitana de Belém (37,2%); e dados clínicos incompletos ou amostra de líquido com quantidade insuficiente (31,7%). Foram incluídos no estudo 249 (31,1%) amostras de pacientes, com limites de idade de 1 mês e 75 anos (média de $15,3 \pm 14,4$ e mediana de 10,5 anos) e proporção sexual de 49% (n=122) do sexo feminino e 51% (n=127) do masculino. Nos 249 casos, a duração do quadro clínico que justificou o exame do líquido variou de 1 a 20 dias (média de $\cong 3$ e mediana de 1 dia), e 25 casos (10%) foram hospitalizados. Em relação ao local de residência: 172 (69,1%) moravam em bairros centrais de Belém; 66 (25,5%) em bairros periféricos e 11 (4,4%) em outros municípios da região metropolitana de Belém. Os dados clínicos mais freqüentemente observados ou referidos foram: cefaléia (96,5%; n=201), febre (89,2%), vômito (71,5%), rigidez de nuca (49,4%) e, nos menores de 12 meses de idade (n=17), o abaulamento da fontanela (47%).

Na análise dos dados líquóricos, foram excluídos 2 pacientes por falta de informações conclusivas. De 247 pacientes, foi constatado que 126 (50,6%) apresentavam alguma anormalidade no líquido, na bioquímica e/ou na celularidade: a glicose variou de 10 a 110mg/dl (média de $54,5 \pm 20,8$); proteínas de 4 a 127mg/dl (média de $29,7 \pm 20,8$); média de celularidade de 109,7 células por mm^3 , com limites de 1 e 2.133 e ampla variação em torno da média (desvio padrão de $\pm 243,4$); e só 9 (3,6%) pacientes tiveram percentual de polimorfonucleares acima de 50%, mas em 96,4% (n=238) houve predominância (>50%) de linfo-mononucleares.

A pesquisa de EV foi positiva em 33 (13,2%) amostras, sendo os sorotipos identificados: Echo 30 (n=31); Cox B5 (n=1); e uma amostra com dois sorotipos de Echo (30 e 4, pelo método da imunofluorescência indireta). A maioria (78,8%; n=26) dos Echo 30 provocou ECP nas duas linhagens celulares; os outros 5 casos de Echo 30, em 3 ocorreu ECP

só na HEp-2 e em 2 na RD. Também, a amostra com Echo 30 e 4 provocou ECP em ambas as linhagens, enquanto o caso com Cox B5 só na HEp-2.

Quanto ao isolamento de EV, os pacientes foram divididos em dois grupos: positivo (se presente o EV) e negativo. Na Tabela 1, observa-se que houve significativamente mais casos ($p < 0,008$) positivos nas pessoas do sexo masculino (72,7%) e em menor proporção ($p < 0,03$) na faixa etária de 22 a 75 anos (9,1%). Foi semelhante ($p > 0,08$) a distribuição espacial dos EV-positivos e negativos, mas ao comparar aqueles residentes nos bairros centrais *versus* bairros periféricos mais o de outros municípios, houve predominância de EV-positivo entre os primeiros ($p < 0,04$). A duração da doença, relatada no primeiro atendimento na UBS-Pedreira, dos casos positivos foi semelhante a dos negativos ($p > 0,24$), apesar dos EV-positivos (66,7%) serem mais freqüentes entre aqueles com duração de até 24 horas, mas sem significado estatístico ($p > 0,09$). A hospitalização foi significativamente ($p < 0,05$) mais freqüente entre os casos EV-positivos (21,2%) do que nos EV-negativos (8,3%).

As freqüências dos dados clínicos (cefaléia, febre, rigidez de nuca, etc), mostradas na Tabela 2, foram semelhantes em

Tabela 1 - Distribuição das variáveis estudadas nos pacientes com líquido positivo e negativo para enterovírus, na Cidade de Belém, PA.

Variáveis	EV-positivo (n=33)		EV-negativo (n=216)		p
	n°	%	n°	%	
Sexo					
masculino	24	72,7	103	47,7	<0,008
feminino	9	27,3	113	52,3	
Idade (anos)					
0 H 4	7	21,2	57	26,4	<0,03
5 H 10	12	36,4	49	22,7	
11 H 21	11	33,3	44	20,4	
22 H 75	3	9,1	66	30,5	
Média \pm DP	11,4 \pm 10,9		15,9 \pm 14,8		<0,05*
Tempo de doença (dias)					
1	22	66,7	110	50,9	>0,24
2H4	7	21,2	67	31,0	
5 H 20	4	12,1	39	18,1	
Logradouro					
periférico	5	15,2	61	28,2	>0,08
central	28	84,8	144	66,7	
outros municípios	0	-	11	5,1	
Hospitalização					
não	26	78,8	198	91,7	<0,05
sim	7	21,2	18	8,3	

* teste t de Student. EV= enterovírus

ambos os grupos, exceto a história de vômitos que foi mais freqüente ($p < 0,03$) nos pacientes EV-positivos.

No líquido, o número de células > 5 células/ mm^3 ocorreu mais significativamente ($p < 0,00005$) nos casos EV-positivos (75,8% vs. 37,9%), sendo mais predominante ($p < 0,0002$) a proporção $> 50\%$ de linfo-mononucleares nos casos EV-negativos (98,6% vs. 81,8%), como mostra a Tabela 3, e a maior freqüência (18,2%; n=6) daqueles com polimorfonucleares $> 50\%$ entre os EV-positivos. A concentração de proteínas ($p > 0,57$) e glicose ($p > 0,26$) não diferiu entre os casos de SMA com EV-positivo e negativo.

Tabela 2 - Sintomas e sinais presentes entre pacientes com líquor positivo e negativo para enterovírus.

Sinais e sintomas	EV-positivo			EV-negativo			p
	n°	total	%	n°	total	%	
Cefaléia ^a	27	29	93,1	167	172	97,0	=1
Febre	30	33	90,9	192	216	88,8	>0,96
Vômitos	29	33	87,8	149	216	68,9	<0,03
Rigidez de nuca	14	33	42,4	109	216	50,4	>0,40
Convulsão	2	33	6,0	29	216	13,4	>0,23
Abaulamento de Fontanela ^b	2	2	100,0	6	15	40,0	>0,18
Kerning/Brudzinski	0	33	-	8	216	3,7	>0,55
Coma	0	33	-	1	216	0,4	=1
Petéquias ou sufusões hemorrágicas	0	33	-	1	216	0,4	=1

^apacientes com idade \geq 4 anos. ^bpacientes até 11 meses de idade. EV= enterovírus

Tabela 3 - Achados líquóricos em pacientes com síndrome de meningite asséptica, segundo o isolamento para enterovírus.

Líquor	EV-positivo (n=33)		EV-negativo (n=214)		p
	n°	%	n°	%	
Cellularidade (mm ³)					
1 H5	8	24,2	133	62,1	<0,00005
>5	25	75,8	81	37,9	
Cellularidade (%)					
Linfomononucleares (>50)	27	81,8	211	98,6	<0,00002
Polimorfonucleares (>50)	6	18,2	3	1,4	
Proteína (mg/dl)					
4 H 36	23	69,7	159	74,3	>0,57
>37	10	30,3	55	25,7	
Glicose (mg/dl)					
10 H 53	22	66,7	162	75,7	>0,26
54 H 110	11	33,3	52	24,3	

EV= enterovírus

DISCUSSÃO

A frequência de positividade de EV, observada neste estudo, de 13,3%, e em período não-epidêmico, foi inferior à frequência encontrada por Silva cols²⁵ na Cidade de Salvador (BA), onde o envolvimento dos EV foi comprovado em 26,7% dos casos de SMA, sendo 30,7% identificados pelo método da RT-PCR, enquanto pelo método de isolamento em cultivo celular, utilizado no presente estudo, apenas 7,5% das amostras virais foram identificadas. Aqueles dados²⁵ indicaram a maior sensibilidade da RT-PCR como método de identificação viral, também mencionada em outros estudos^{8,24}, atualmente bastante utilizado no diagnóstico das enterovirose. Não obstante, na amostra de Salvador o congelamento e as condições de transporte dos espécimes podem não ter sido satisfatórios, o que possa melhor explicar a baixa frequência de isolamento viral (J Tavares-Neto: comunicação pessoal).

Os sorotipos de EV encontrados no presente estudo (Echo 30, 4 e Cox B5) são semelhantes aos descritos em casos de SMA^{2,4,25,27}. A predominância encontrada de Echo 30 (78,8%) reforça as observações de outros estudos como sendo um dos sorotipos etiológicos principais da SMA^{7,8,17,20}. No Brasil, o Echo

30 foi responsável pela ocorrência de 2 surtos: um na Cidade de São Paulo e outro em Londrina-PR, de acordo com os achados, respectivamente, de Timenetsky cols²⁶ e Jóia cols¹⁴.

Quanto à predominância observada (72,7%), de pacientes do sexo masculino entre os EV-positivos, Bernit cols⁵ também constataram resultado semelhante (64,4%) em um surto de SMA atribuído ao Echo 30, assim como Ozkaya cols¹⁷ (66%). Isso pode ser em decorrência da maior exposição das crianças do sexo masculino a fatores ambientais que favorecem a infecção por EV. Não obstante, esse achado necessita ser mais adequadamente investigado.

A predominância observada (90,9%) de pacientes EV-positivos com idade até 21 anos é concordante com outros relatos da literatura^{6,10,12,22}. Apesar da mais baixa frequência de EV (9,1%) nas pessoas com mais de 21 anos, Nowak cols¹⁶ verificaram em 43 pacientes adultos com SMA a proporção de 44% tendo como agente etiológico algum EV.

Gomes cols¹² também assinalaram a inespecificidade do quadro clínico da SMA, como também observado neste estudo. O encontro da maior frequência de relato de vômitos nos pacientes EV-positivos (87,8%) pode ser um resultado casual em decorrência do maior número de crianças menores de 11 anos, grupo sabidamente com mais relatos de queixas gastrointestinais no curso de síndrome febril.

Em relação aos dados líquóricos, embora a proporção >50% de linfo-mononucleares apresentar-se em maior predominância nos casos EV-negativos (98,6% vs 81,8%), constatou-se que dentre os pacientes EV-positivos houve maior proporção daqueles com polimorfonucleares >50% (18,2% vs 1,4%). No entanto, outros estudos^{10,12} descrevem a pleocitose da meningite enteroviral constituída pela maior proporção de células linfomononucleares. Porém, como a maioria (66,7%) dos pacientes EV-positivos, deste estudo, estava entre aqueles com a amostra de líquor coletada durante as primeiras 24 horas da doença, a celularidade na fase inicial do processo patológico pode ter sofrido a influência de alguma característica não investigada. Nesse sentido, Sawyer cols²⁴ e Rice cols²¹ descrevem que a maior porcentagem de polimorfonucleares no líquor de pacientes com SMA é inversamente proporcional ao tempo de doença antes da punção lombar.

A maior taxa de hospitalização entre os pacientes EV-positivos pode evidenciar a presença de indicadores clínicos de maior gravidade nestes casos, mesmo considerando ser a meningite enteroviral tipicamente benigna, de curso clínico autolimitado e raramente associada ao pior prognóstico^{12,18}.

A identificação de EV em amostras de pacientes com SMA e os sorotipos isolados (Echo 30, 4 e Cox B5), são achados relevantes não só por confirmar a circulação dos mesmos na região Norte do País, como ao constatar que o sorotipo Echo 30 é o mais freqüente, agente etiológico da SMA, à semelhança das observações em outras regiões do País^{14,26}.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ashwell MJ, Smith DW, Phillips PA, Rouse IL. Viral meningitis due to echovirus types 6 and 9: epidemiological data from Western Australia. *Epidemiology and Infection* 117: 507-512, 1996.
- Atkinson PJ, Sharland M, Maguire H. Predominant enteroviral serotypes causing meningitis. *Archives of Disease in Childhood* 78: 373-374, 1998.
- Bedoya SP, Trocoli MGC, Silva EE, Leite JPG. Detection of virus by polymerase chain reaction in cases of acute meningitis. *In: Resumos do IX Encontro Nacional de Virologia, São Lourenço, p. 98, 1998.*
- Bello M, Lago PM, Palomera R, Gonzalez Z. Outbreak of Coxsackievirus B5 meningoencephalitis in Cuba, 1995. *Revista Cubana de Medicina Tropical* 49: 69-70, 1997.
- Bernit E, de Lamballerie X, Zandotti C, Berger P, Veit V, Schleinitz N, de Micco P, Harle JR, Charrel RN. Prospective investigation of a large outbreak of meningitis due to echovirus 30 during summer 2000 in Marseilles, France. *Medicine (Baltimore)* 83: 245-253, 2004.
- Bottner A, Daneschnejad S, Handrick W, Schuster V, Liebert UG, Kiess W. A season of aseptic meningitis in Germany: epidemiologic, clinical and diagnostic aspects. *Pediatric Infectious Disease Journal* 21: 1126-1132, 2002.
- Center for Disease Control and Prevention (CDC). Outbreaks of aseptic meningitis associated with echoviruses 9 and 30 and preliminary surveillance reports on enterovirus activity-United States, 2003. *Morbidity & Mortality Weekly Report* 52: 761-764, 2003.
- Chambon M, Bailly JL, Beguet A, Henquell C, Archimbaud C, Gaulme J, Labbe A, Malpuech G, Peigue-Lafeuille H. An outbreak due to echovirus type 30 in a neonatal unit in France in 1997: usefulness of PCR diagnosis. *Journal of Hospital Infection* 43: 63-68, 1999.
- Chomel JJ, Antona D, Thouvenot D, Lina B. Three ECHOvirus serotypes responsible for outbreak of aseptic meningitis in Rhone-Alpes region, France. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 22: 191-193, 2003.
- Glimaker M. Enteroviral meningitis. Diagnostic methods and aspects on the distinction from bacterial meningitis. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases* 85 (suppl): 1-64, 1992.
- Godoy CVE, Carvalho RPS, Kirchner E, Pereira OAC, Pupo AA. Síndrome de meningite asséptica. Esclarecimento etiológico de alguns casos na cidade de São Paulo. *Considerações clínico-laboratoriais. Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* 9: 213-221, 1967.
- Gomes MCO. Como diagnosticar e tratar. Meningite. *Revista Brasileira de Medicina* 48: 9-27, 1991.
- Gradien M, Forsgren M, Ehrnst A. Enteroviruses. *In: Lennete EH, Lennete DA, Lennete ET (eds) Diagnostic Procedures for Viral, Rickettsial and Chlamydial Infections, 7th edition, Washington, American Public Health Association, p.279-297, 1995.*
- Jóia AEB, Figueiredo MH, Skraba I, Ribeiro MF, Ribeirette MR, Takemura NS, Melo VO, Costa EV, Da Silva EE. A large outbreak of aseptic meningitis caused by echovirus 30 in Paraná, Brazil. *In: Resumos do Virologia 99: 10^o Encontro Nacional de Virologia e 2^o Encontro de Virologia do Mercosul, Curitiba, p. 141, 1999.*
- Muir P, Kammerer U, Korn K, Mulders MN, Poyry T, Weissbrich B, Kandolf R, Cleator GM, Loon AM. Molecular typing of enteroviruses: current status and future requirements. *Clinical Microbiology Reviews* 11: 202-227, 1998.
- Nowak DA, Boehmer R, Fuchs H-H. A retrospective clinical, laboratory and outcome analysis in 43 cases of acute aseptic meningitis. *European Journal of Neurology* 10: 271-280, 2003.
- Ozkaya E, Hizel K, Uysal G, Akman S, Terzioğlu S, Kuyucu N. An outbreak of Aseptic Meningitis due to echovirus type 30 in two cities of Turkey. *European Journal of Epidemiology* 18: 823-826, 2003.
- Peigue H, Archimbaud C, De Champs C, Croquez N, Laurichesse H, Clavelou P, Aumaitre O, Schmidt J, Henquell C, Bailly JL, Chambon M. Enteroviral meningitis in adults, underestimated illness: description of 30 observations from 1999 to 2000, and evolution of clinical practices during 2001. *Pathologie Biologie* 50: 516-524, 2002.
- Pringle CR. Virus taxonomy at the XIth International Congress of Virology, Sydney, Australia, 1999. *Archives of Virology* 144: 2065-2070, 1999.
- Reintjes R, Pohle M, Vieth U, Lyytikäinen 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. *Pediatric Infectious Disease Journal* 18: 104-108, 1999.
- Rice SK, Heintz RE, Thornton LL, Opal SM. Clinical Characteristics, Management Strategies, and Cost Implications of a Statewide Outbreak of Enterovirus Meningitis. *Clinical Infectious Diseases* 20: 931-937, 1995.
- Romero JR. Reverse-Transcription Polymerase Chain Reaction: Detection of the Enteroviruses. *Pediatric Infectious Disease Journal* 123: 1161-1169, 1999.
- Rotbart HA, Brennan PJ, Fife KH, Romero JR, Griffin JA, McKinlay MA, Hayden FG. Enterovirus meningitis in adults. *Clinical Infectious Diseases* 27: 896-898, 1998.
- Sawyer MH. Enterovirus infections: diagnosis and treatment. *Pediatric Infectious Disease Journal* 18: 1033-1040, 1999.
- Silva HR, Tanajura GM, Tavares-Neto J, Gomes MLC, Linhares AC, Vasconcelos PFC, Ko AI. Aseptic meningitis syndrome due to enterovirus and *Leptospira sp* in children of Salvador, Bahia. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 35: 159-165, 2002.
- Timenetsky MCST, Carmona RCC, Machado BC, Santana RAF, Fernandes KC. Aseptic meningitis by echovirus 30 in São Paulo State. *In: Resumos do Virologia 99: 10^o Encontro Nacional de Virologia e 2^o Encontro de Virologia do Mercosul, Curitiba, p. 118, 1999.*
- Trallero G, Casas I, Tenorio A, Echevarria JE, Castellanos A, Lozano A, Brena PP. Enteroviruses in Spain: virological and epidemiological studies over 10 years (1988-97). *Epidemiology and Infection* 124: 497-506, 2000.