



UNIVERSIDADE D
COIMBRA

FACULDADE
DE
MEDICINA

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA – TRABALHO FINAL

CARMINDA ISABEL DA MOTA PINHEIRO

Infeções do Sistema Nervoso Central por Enterovírus

ARTIGO CIENTÍFICO

ÁREA CIENTÍFICA DE PEDIATRIA

Trabalho realizado sob orientação de:

DOUTORA ANA CRISTINA DE OLIVEIRA BRETT

PROF. DOUTORA FERNANDA MARIA PEREIRA RODRIGUES

FEVEREIRO de 2020

FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Infeções do Sistema Nervoso Central por Enterovírus

CARMINDA ISABEL DA MOTA PINHEIRO¹

PROF. DOUTORA FERNANDA RODRIGUES^{1,2}

DRA. ANA BRETT^{1,2}

¹ Faculdade de Medicina, Universidade de Coimbra, Portugal

² Unidade de Infeciologia e Serviço de Urgência, Hospital Pediátrico, Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra, Portugal

Morada Institucional do Orientador:

Hospital Pediátrico, Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra,
Avenida Afonso Romão, Alto da Baleia.
3000-602, Coimbra

E-mail do Orientador:

anacbrett@gmail.com

Índice

Resumo.....	1
Abstract.....	3
Introdução.....	4
Material e métodos.....	5
Resultados.....	7
Demografia.....	7
Manifestações clínicas.....	8
Contexto epidemiológico.....	9
Exame objetivo.....	10
Exames complementares de diagnóstico.....	10
Tratamento.....	12
Diagnóstico.....	13
Internamento, complicações e reinternamento.....	13
Discussão.....	15
Conclusão.....	20
Agradecimentos.....	21
Referências bibliográficas.....	22

Resumo

Introdução: Os enterovírus são a principal causa de infeção do Sistema Nervoso Central, nomeadamente de meningite vírica, em idade pediátrica. O objetivo do estudo foi caracterizar as infeções do Sistema Nervoso Central por enterovírus, num hospital pediátrico durante 8,5 anos.

Material e métodos: Estudo observacional, transversal, analítico, com colheita retrospectiva de dados de processos clínicos dos casos diagnosticados com infeção do Sistema Nervoso Central, com identificação de enterovírus por *polymerase chain reaction* no líquido cefalorraquidiano, no Hospital Pediátrico do Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra, de 01/01/2011 a 30/06/2019. Foram avaliados fatores demográficos, manifestações clínicas, exames complementares de diagnóstico, tratamento, diagnóstico e evolução. A análise estatística foi realizada em SPSS 25®.

Resultados: Foram diagnosticados 82 casos, 61% do sexo masculino, com idade mediana de 6,7 anos (IQR 10,71). O maior número de casos foi em 2014 e 2018 (18 e 19 casos), com um mínimo de dois em 2013. Ocorreram mais casos no verão (40,2%). A febre (87,8%) foi a manifestação clínica mais comum. No grupo A (idade <um ano, n=21) destaca-se a irritabilidade (38,1%) e a clínica respiratória (28,6%). O grupo B (crianças e adolescentes, n=61) apresentou cefaleia (95%), vômitos (83,6%), fotofobia e/ou fonofobia (42,6%) e rigidez da nuca (93,4%). Dos 82, 90,2% apresentaram pleocitose no líquido cefalorraquidiano (mediana 91 células/mm³, IQR 155; cinco casos com >1000 células/mm³), 36,4% com predomínio de polimorfonucleares. A proteinorráquia foi elevada em 45,7% e a glicorráquia baixa em 10,9%. A média de leucócitos foi 10992±3652/μL e a mediana de proteína C-reativa 1,1mg/dL (IQR 1,99). Em 42,7% foi iniciada antibioticoterapia, com suspensão após identificação de enterovírus em 57,1%. A duração mediana de internamento foi de um dia (IQR 1). Foram diagnosticadas com meningite 76 crianças, cinco com encefalite/meningoencefalite e uma com meningite e polirradiculite aguda. Dois irmãos tiveram diagnóstico na mesma semana. A complicação mais frequente foi a síndrome pós-punção lombar.

Discussão: Ocorreu grande variabilidade do número de casos ao longo dos anos. Observou-se pleocitose ligeira na maioria, mas com valores muito elevados em alguns, e um terço dos casos teve predomínio de polimorfonucleares, o que mostra que a deteção rápida do vírus é importante para as decisões terapêuticas. A identificação do vírus levou à suspensão da antibioticoterapia em mais de metade dos casos.

Conclusão: A maioria das infecções por enterovírus apresenta evolução benigna. O seu diagnóstico pode diminuir a duração do internamento e da antibioticoterapia e evitar a realização de exames desnecessários.

Palavras-chave: Enterovírus; Meningite; Encefalite; Biologia Molecular

Abstract

Introduction: Enteroviruses are the main cause of Central Nervous System infection, namely viral meningitis, in paediatrics. The aim of this study was to characterise Central Nervous System infections by enterovirus, in a paediatric hospital during 8.5 years.

Material and Methods: Cross-sectional analytic study with retrospective data collection of all the clinical cases diagnosed with Central Nervous System infection and identification of enterovirus in the cerebrospinal fluid by polymerase chain reaction, in Hospital Pediátrico – Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra from 01/01/2011 to 30/06/2019. Demographic factors, clinical features, diagnostic tests, treatment and outcome were evaluated. Statistical analysis was done using SPSS 25®.

Results: Eighty-two cases were included, 61% male, with a median age of 6.7 years (IQR 10.71). The largest number of cases was observed in 2014 and 2018 (18 and 19 cases), with a minimum of two in 2013. There were more cases in the Summer (40.2%). Fever (87.8%) was the most common symptom. In group A (age <one year, n=21) irritability (38.1%) and respiratory symptoms (28.6%) were more common. In group B (children and adolescents, n=61) headache (95%), vomiting (83.6%) photophobia and/or phonophobia (42.6%) and neck stiffness (93.4%) were frequent. Of the 82 cases, 90.2% presented pleocytosis in the cerebrospinal fluid (median 91 cells/mm³, IQR 155; five cases with >1000 cells/mm³), with predominance of polymorphonuclear cells in 36.4%. Cerebrospinal fluid protein count was elevated in 45.7% and glucose count low in 10.9%. The average leucocyte count was 10992±3652/μL and median C-reactive protein 1.1mg/dL (IQR 1.99). In 42.7% antibiotics were started, with 57.1% stopped after identification of enterovirus. The median duration of admission was one day (IQR 1). Meningitis was diagnosed in 76 children, encephalitis/meningoencephalitis in five and one with meningitis and acute polyradiculitis. Two siblings had the diagnosis in the same week. The most frequent complication was post-lumbar puncture syndrome.

Discussion: There was great variability in the number of cases throughout the years. Most had slight pleocytosis, but with very high values in some, and one third had polymorphonuclear cell predominance, showing that rapid virus detection is important for therapeutic decisions. Identification of the virus lead to the suspension of antibiotics in more than half the cases.

Conclusion: Most enterovirus infections are benign. Their diagnosis can reduce the length of hospital stay and of antibiotic treatment and avoid unnecessary diagnostic tests.

Keywords: Enterovirus, Meningitis, Encephalitis, Molecular Biology

Introdução

Os enterovírus humanos (EV) são pequenos vírus de RNA que pertencem à família *Picornaviridae*.¹ Estão associados a uma grande variedade de manifestações clínicas, nomeadamente respiratórias e gastrointestinais² e representam uma causa importante de infecção do Sistema Nervoso Central (SNC) em crianças de todo o Mundo.³

Atualmente, há mais de 100 serótipos identificados, agrupados em quatro espécies, de A a D.⁴⁻⁶ Os EV caracterizam-se por serem vírus citopáticos e pela maioria da sintomatologia resultar de destruição celular específica. No entanto, algumas manifestações, como o exantema e a miocardite, podem advir da resposta imune do hospedeiro.⁷ As infeções podem ocorrer ao longo de todo o ano, mas em climas temperados estão descritas maiores taxas de infeção no verão e outono.^{8,9}

O EV é o agente etiológico identificado em 80-90% dos casos de meningite vírica.^{7,9} A transmissão ocorre por via fecal-oral, transplacentar ou através de gotículas respiratórias.⁷ Além da febre, na meningite a EV pode ocorrer cefaleia, náusea, exantema e sintomas respiratórios. Em crianças mais velhas pode estar presente rigidez da nuca e fotofobia, enquanto que nos recém-nascidos a irritabilidade, letargia e o abaulamento da fontanela podem ser os únicos sintomas.⁴

Os métodos moleculares, nomeadamente a *polymerase chain reaction* (PCR), são o *gold standard* para o diagnóstico desta infeção, dado serem métodos rápidos e sensíveis, cada vez mais disponíveis nos hospitais. A maioria dos laboratórios ainda não identifica o serótipo. O EV pode ser identificado em secreções respiratórias, urina, fezes, sangue e líquido cefalorraquidiano (LCR),¹⁰ sendo nestes últimos três onde a deteção é realizada com maior sensibilidade.⁷ A deteção de EV em amostras biológicas pode contribuir para a redução do tratamento com antibióticos.¹¹

Atualmente, não está disponível nenhum tratamento específico com benefício comprovado. Contudo, a maioria das infeções por EV são autolimitadas e não requerem nenhuma terapêutica específica, necessitando apenas de tratamento sintomático e de suporte.¹¹

O objetivo deste estudo foi caracterizar os fatores demográficos, manifestações clínicas, exames complementares de diagnóstico, tratamento e evolução dos casos clínicos de crianças com infeção do SNC com identificação de EV por PCR no LCR.

Material e métodos

Foi realizado um estudo observacional, transversal, analítico, com colheita retrospectiva de dados, recorrendo aos registos informáticos dos processos clínicos de todas as crianças e adolescentes diagnosticados com infeção do SNC com identificação de EV no LCR, observadas no Hospital Pediátrico (HP) do Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra (CHUC), durante um período de 8,5 anos (janeiro de 2011 a junho de 2019).

O HP-CHUC é um hospital de nível III da região Centro de Portugal, com uma área de influência que abrange cerca de 2 800 000 habitantes, dos quais cerca de 330 000 são crianças e adolescentes com idade inferior a 18 anos. Apresenta uma média anual de mais de 60 000 observações no Serviço de Urgência (SU) e cerca de 4000 internamentos. Até 2011, a faixa etária abrangida era até aos 13 anos. Desde fevereiro desse mesmo ano, a faixa etária foi alargada até aos 18 anos.

A identificação dos casos clínicos foi realizada a partir dos resultados de biologia molecular fornecidos pelo Laboratório de Patologia Clínica do HP-CHUC. O laboratório tem a técnica de PCR disponível desde 2011, inicialmente através da PCR clássica, realizada apenas durante os dias úteis. Em 2014, a pesquisa e identificação de EV passou a integrar um painel sindrómico de biologia molecular e a partir de janeiro de 2017 o mesmo passou a estar disponível 24 horas por dia, todos os dias da semana. O painel sindrómico de biologia molecular específico para meningite/encefalite (teste comercial Biofire® Filmarray® *Meningitis/Encephalitis Panel*) permite a pesquisa simultânea de 14 microrganismos, englobando vírus, bactérias e fungos. Apenas necessita de um volume de LCR de 200 µL, sendo o processamento das amostras simples e rápido, com os resultados disponíveis em menos de duas horas.¹²

Para cada doente foram analisadas as seguintes variáveis: sexo, idade, dia de doença à data de observação e de realização da punção lombar (PL), sintomatologia, alterações no exame objetivo (incluindo fontanela anterior abaulada, presença de rigidez da nuca, sinal de Brudzinski, sinal de Kernig, prostração, irritabilidade e exantema) e o contexto epidemiológico. Foram também analisados os exames complementares de diagnóstico, tratamento e evolução.

Definiram-se cinco grupos etários: recém-nascido dos 0 aos 28 dias, lactente dos 29 dias aos 12 meses de vida; criança em idade pré-escolar, entre 1 e 5 anos; criança em idade escolar, dos 6 aos 11 anos; e adolescente, dos 12 aos 18 anos de idade. A análise das manifestações clínicas e exame objetivo foi realizada com o pressuposto de

que sintomas como cefaleia, dor abdominal, fotofobia e/ou fonofobia bem como a presença de sinais meníngeos não se aplicam a recém-nascidos e lactentes. Assim, dado as diferentes características, foram criados dois grupos: o grupo A que inclui os recém-nascidos e lactentes, e o grupo B que inclui as crianças com mais de um ano.

Relativamente aos exames complementares de diagnóstico laboratoriais, foram avaliados os resultados dos parâmetros analíticos do LCR, análises sanguíneas, incluindo proteína C-reativa (pCr), procalcitonina (PCT), hemocultura, sumária de urina e urocultura. Valores de pCr e de PCT inferiores a 1 mg/dL e 0,5 ng/mL, respetivamente, foram aceites como normais.¹³ Dado a diferente interpretação, alguns parâmetros do LCR foram analisados separadamente em recém-nascidos e nas restantes idades. No grupo de recém-nascidos, valores inferiores a 20 células/mm³ e valores de proteinorráquia entre 20 e 120 mg/dL foram considerados normais, enquanto que nas restantes idades se considerou entre 0 a 5 células/mm³ e proteinorráquia entre 5-40 mg/dL como normais. A glicose no LCR foi considerada normal se entre 2,2-4,4 mmol/L e a relação da glicose LCR/plasma foi descrita como normal se superior a 50%.¹³

Foram também analisados os resultados de outros exames complementares de diagnóstico, nomeadamente radiografia torácica, eletroencefalograma, ecografia transfontanelar, tomografia computadorizada crânio-encefálica (TC-CE) e ressonância magnética crânio-encefálica (RM-CE).

Foi avaliada a prescrição de antibiótico e/ou antivírico e o motivo para a respetiva suspensão. Para avaliar a evolução do doente foi analisada a duração do internamento, possíveis complicações, assim como os reinternamentos e seus motivos.

Para efetuar a análise estatística foi usado o programa *IBM SPSS Statistics for Windows, Version 25.0 Armonk*. O teste de normalidade usado foi o teste de Kolmogorov-Smirnov ($p=0,05$). Para analisar as variáveis quantitativas foram utilizadas medidas de tendência central e de dispersão. As variáveis qualitativas foram analisadas através de frequências absolutas e relativas. Recorreu-se ao teste qui-quadrado de ajuste para analisar a distribuição do número de casos ao longo dos meses do ano. As diferenças de distribuição entre variáveis categóricas foram analisadas com o teste qui-quadrado de Pearson ou teste Exacto de Fisher, de acordo com o tamanho da amostra. Foi utilizado o teste T-Student para a comparação de variáveis quantitativas com distribuição normal e o teste U de Mann-Whitney para comparar variáveis quantitativas sem distribuição normal. O nível de significância estatística considerado foi $p<0,05$.

Resultados

Demografia

Ao longo dos 8,5 anos do estudo foram identificados 82 casos de infeção do SNC por EV através da PCR no LCR. Verificou-se variabilidade no número anual de casos, com o maior número em 2018 e 2014, com 19 e 18 casos respetivamente. Em 2013 apenas foram diagnosticadas duas crianças (figura 1).

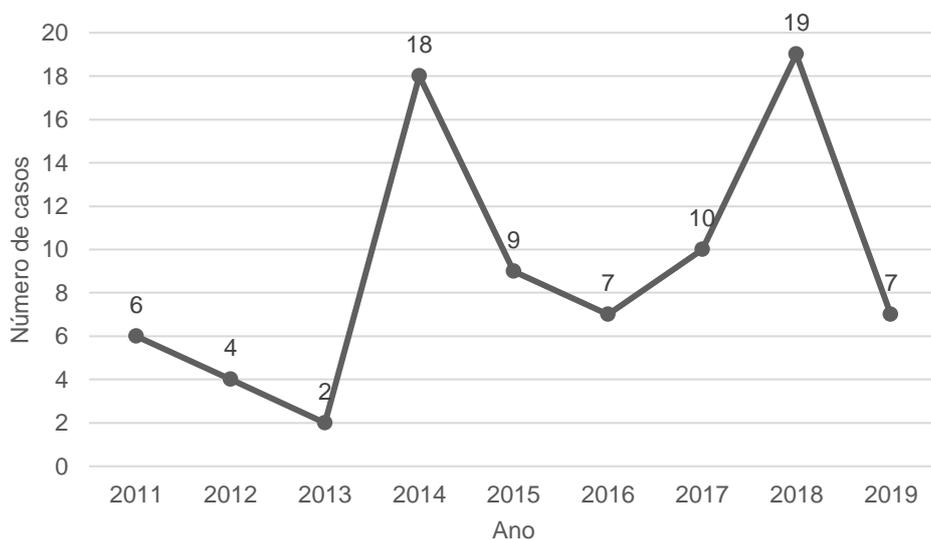


Figura 1. Distribuição anual dos casos de infeção do SNC por EV confirmados por PCR no LCR, entre 2011 e 2019 (n=82).

O verão foi a estação do ano onde foram identificados mais casos (n=33), com oito casos diagnosticados no inverno. O número de casos diagnosticados na primavera e no outono foi semelhante, com 20 e 21 casos, respetivamente.

Verificou-se que o número de casos ao longo dos meses do ano não foi homogéneo ($p=0,001$), observando-se um maior número nos meses de julho e agosto. No mês de setembro não foi observado nenhum caso (figura 2).

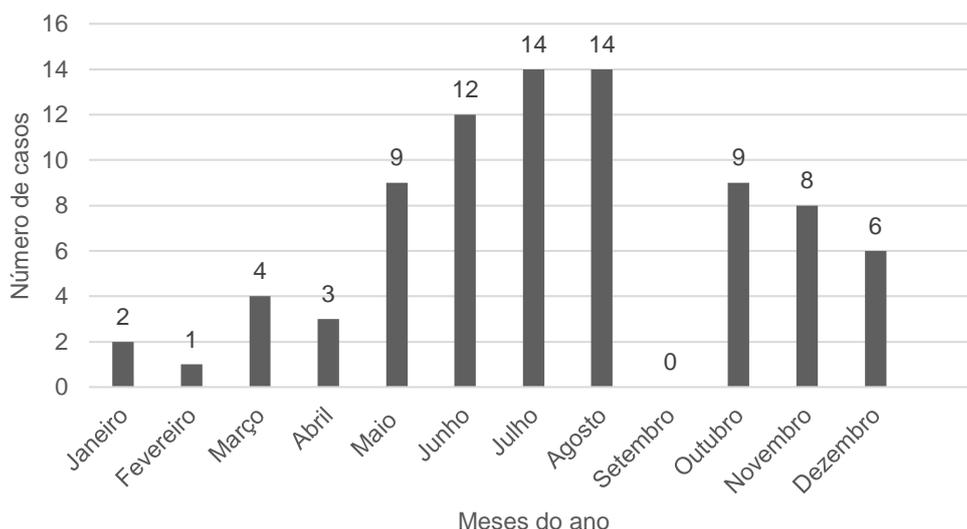


Figura 2. Distribuição ao longo dos meses do ano dos casos de infecção do SNC por EV confirmados por PCR no LCR, entre 2011 e 2019 (n=82).

Do total, 50 casos (61%) eram do sexo masculino. A mediana de idades foi de 6,7 anos (IQR 10,71), com um mínimo de nove dias e um máximo de 16,8 anos. Quanto à distribuição por faixa etária, 11 (13,4%) foram diagnosticados em recém-nascidos, 10 (12,2%) em lactentes, 16 (19,5%) em crianças de idade pré-escolar, 27 (32,9%) em crianças de idade escolar e 18 (22%) em adolescentes.

A maioria (68,3%) dos doentes recorreu ao SU nas primeiras 48 horas de doença, 20,7% dos quais nas primeiras 24 horas. Duas crianças recorreram ao SU numa fase mais tardia, no décimo e décimo primeiro dias de doença.

Manifestações clínicas

A febre, presente em 72 (87,8%), foi a manifestação clínica mais comum. A mediana de temperatura foi de 38,2°C (IQR 1,0), com um mínimo de 36°C e máximo de 39,8°C. No grupo A (recém-nascidos e lactentes, n=21) a média da temperatura foi de 38,1°C, enquanto que no grupo B (crianças com mais de um ano, n=61) foi de 38,4°C, sem significado estatístico ($p=0,84$).

No grupo A, todos tiveram febre, sendo a irritabilidade o segundo sintoma mais descrito pelos pais. Seis crianças apresentaram clínica respiratória. Como sintomas menos frequentes salientam-se as convulsões, diarreia e exantema, tal como se pode constatar na tabela 1. No grupo B destacam-se a cefaleia, presente em 95%, os vômitos e a febre em 83,6% e a fotofobia e/ou fonofobia em 42,6%.

Tabela 1. Manifestações clínicas dos casos de infecção do SNC por EV confirmada por PCR no LCR, entre 2011 e 2019, no grupo A (n=21) e no grupo B (n=61).

Manifestações clínicas	Grupo A (n=21) n (%)	Grupo B (n=61) n (%)	Total (n=82) n (%)	Valor p
Febre	21 (100%)	51 (83,6%)	72 (87,8%)	0,058
Cefaleias	Não aplicável	58 (95,1%)	58 (70,7%)	--
Vómitos	4 (19%)	51 (83,6%)	55 (67,1%)	<0,001
Fotofobia e/ou fonofobia	Não aplicável	26 (42,6%)	26 (31,7%)	--
Clínica respiratória	6 (28,6%)	10 (16,4%)	16 (19,5%)	0,337
Prostração	4 (19%)	11 (18%)	15 (18,3%)	1,0
Dor abdominal	Não aplicável	13 (21,7%)	13 (16%)	--
Irritabilidade	8 (38,1%)	0	8 (9,8%)	<0,001
Diarreia	1 (4,8%)	3 (4,9%)	4 (4,9%)	1,0
Convulsões	2 (9,5%)	0	2 (2,4%)	0,063
Exantema	1 (4,8%)	1 (1,6%)	2 (2,4%)	0,449
Outros sintomas*	8 (38,1%)	3 (4,9%)	11 (13,4%)	--

*Outros: pele marmoreada, palidez, recusa alimentar, gemido, tonturas, icterícia, claudicação, sialorreia, hemiparésia.

Contexto epidemiológico

Em 24 de 79 casos (30,4%) foi mencionada a presença de contexto familiar, sendo os sintomas respiratórios (10 casos) os mais frequentemente referidos (figura 3). O caso em que foi descrito contexto familiar de meningite refere-se a uma criança com um irmão que tinha estado internado, quatro dias antes, por meningite vírica, também a EV.

Apenas 2 crianças (2,5%) tinham descrito contexto escolar de doença: rinfaringite aguda e febre.

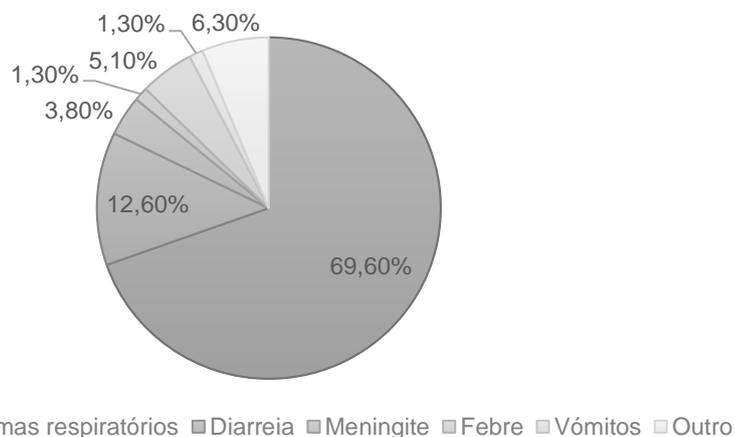


Figura 3. Contexto familiar dos casos de infecção do SNC por EV confirmada por PCR no LCR entre 2011 e 2019 (n=79).

Exame objetivo

A figura 4 descreve as características dos doentes descritas no exame objetivo.

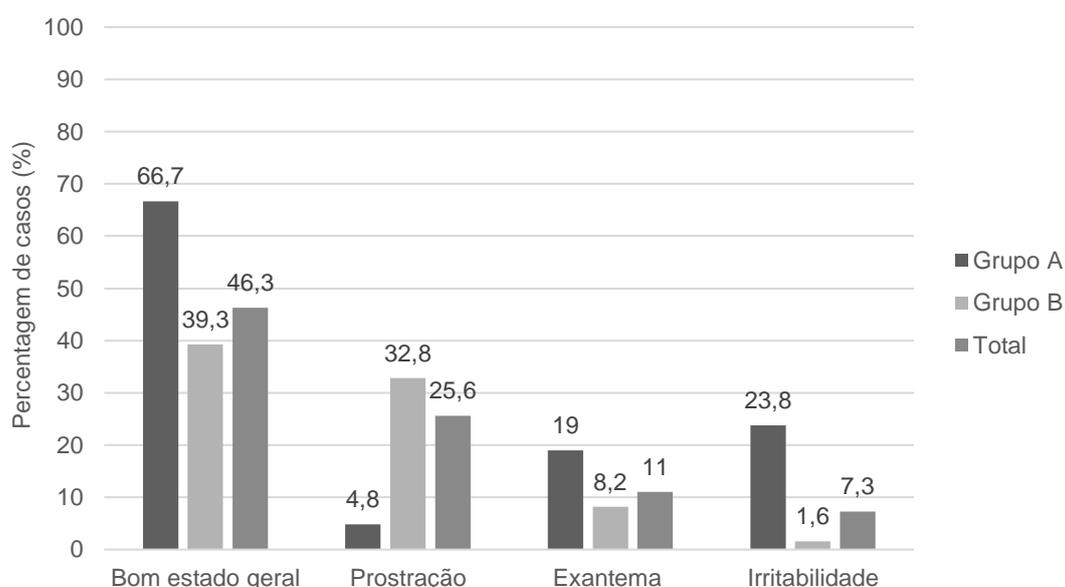


Figura 4. Exame objetivo dos casos de infeção do SNC por EV confirmada por PCR no LCR, entre 2011 e 2019, no grupo A (n=21) e no grupo B (n=61).

Quando comparados os dois grupos, verifica-se que no grupo A o bom estado geral à observação foi mais frequente, com significado estatístico ($p=0,030$). Já a descrição de prostração foi estatisticamente mais frequente no grupo B ($p=0,011$), enquanto a irritabilidade foi mais observada no grupo A ($p=0,004$).

Foi descrita a presença de exantema (micropapular, maculopapular ou petequial, entre outros) em quatro lactentes e cinco crianças, sem diferença estatística entre os grupos ($p=0,224$).

Nos 21 lactentes do grupo A, três (14,3%) apresentaram fontanela abaulada. Relativamente à presença de sinais meníngeos, das 61 crianças do grupo B, 57 (93,4%) apresentaram rigidez da nuca, 16 (26,2%) sinal de Brudzinski e oito (13,1%) sinal de Kernig.

Exames complementares de diagnóstico

- Análise do LCR

Todos os casos realizaram PL no primeiro dia de observação no SU (68,3%) ou no dia seguinte (31,7%).

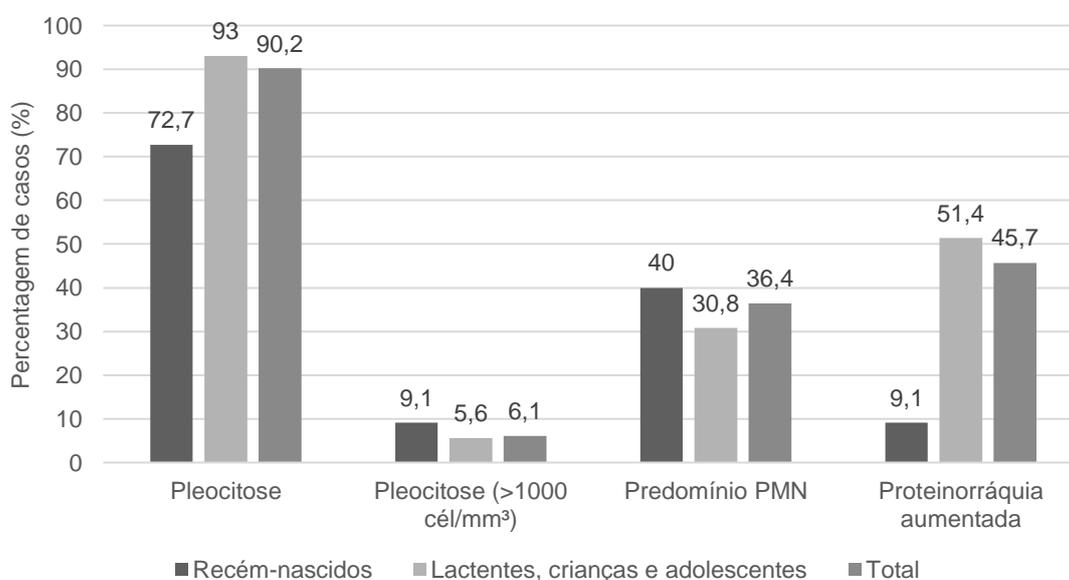
A média da proteinorráquia foi de $49,96 \pm 26,19$ mg/dL, estando aumentada em 37 casos (45,7%). A mediana da glicorráquia foi de 3 mmol/L (IQR 0,73), estando abaixo de 2,2 mmol/L em nove casos (10,9%). Nos 54 casos em que foi possível obter a relação da glicorráquia com a glicémia, verificou-se uma média de $58 \pm 8\%$, com 16,6% com relação <50%.

A análise do número de células presentes no LCR revelou uma mediana de 91 células/mm³ (IQR 155), com um mínimo de 1 célula/mm³ e um máximo de 4520 células/mm³ (LCR não hemorrágico). Cinco casos apresentaram pleocitose >1000 células/mm³.

Relativamente ao predomínio de células (n=77), em 57,1% (n=44) existia predomínio de células mononucleares, em 36,4% (n=28) predomínio de células polimorfonucleares e em 6,5% (n=5) não existia predomínio celular. Em 64,3% dos casos descritos com predomínio de polimorfonucleares, a PL foi realizada até ao segundo dia de doença.

A cultura do LCR foi sempre negativa. Em todos os casos foi apenas isolado o EV no LCR.

Dado a sua diferente interpretação, alguns parâmetros analíticos do LCR foram analisados separadamente no período neonatal e restantes idades, representado na figura 5. Apenas a pleocitose teve significado estatístico quando comparados os recém-nascidos com as restantes idades ($p=0,024$).



Legenda: PMN - polimorfonucleares

Figura 5. Parâmetros analíticos do LCR nos recém-nascidos (n=11) e nos lactentes, crianças e adolescentes (n=71).

- Análises sanguíneas

Em três crianças (3,7%) não foram realizadas análises sanguíneas.

O valor médio de leucócitos no sangue foi de $10992 \pm 3652/\mu\text{L}$, sendo a média de neutrófilos de $7559 \pm 3423/\mu\text{L}$. A mediana do valor dos linfócitos foi de $1565/\mu\text{L}$ (IQR 1963), com um mínimo de $550/\mu\text{L}$ e um máximo de $11370/\mu\text{L}$.

O valor mediano da pCr foi de 1,10 mg/dL (IQR 1,99), com um valor mínimo de 0,03 mg/dL e um máximo de 6,90 mg/dL, apresentando 41 crianças (52,6%) pCr superior a 1 mg/dL.

A PCT, realizada em 50 crianças, apresentou uma mediana de 0,095 ng/mL, com um mínimo de 0,01 ng/mL e um máximo de 0,60 ng/mL.

A hemocultura foi efetuada em 75 (91,5%), em todos negativa.

- Outros exames complementares de diagnóstico

Na maioria dos casos (68,3%) não foram realizados exames complementares de diagnóstico adicionais.

Cinco efetuaram eletroencefalograma, com ritmo de base discretamente lento identificado em quatro. A TC-CE foi efetuada em 14 crianças, sendo descrito em um caso a presença de edema cerebral. Foi realizada RM-CE em quatro crianças, uma com alterações sugestivas de encefalite, e ecografia transfontanelar em três, uma com hiperrefletividade periventricular.

Seis crianças realizaram radiografia torácica, todas sem alterações relevantes. Dos 20 casos que realizaram sumária de urina e urocultura, um recém-nascido teve o diagnóstico concomitante de pielonefrite aguda por *Escherichia coli*.

Tratamento

Em 35 crianças (42,7%) foi iniciada terapêutica antibiótica, correspondendo a 81% dos lactentes e 30% das restantes idades. A decisão de interrupção da mesma teve em consideração os resultados dos exames complementares de diagnóstico, tal como apresentado na tabela 2. Destaca-se um recém-nascido de 22 dias que manteve antibioticoterapia pelo diagnóstico concomitante de pielonefrite aguda.

Tabela 2. Motivo de suspensão do antibiótico (n=35).

Motivo de suspensão	n (%)
Até PCR para EV positiva	20 (57,1)
Até cultura do LCR negativa	10 (28,6)
Até hemocultura negativa	4 (11,4)
Outro*	1 (2,9)

* após completar tratamento para pielonefrite aguda.

A decisão de suspender o antibiótico foi adiada maioritariamente no grupo dos lactentes: até conhecimento dos resultados da cultura do LCR (60% lactentes e 40% restantes idades) ou da hemocultura (100% lactentes).

A terapêutica com aciclovir foi iniciada em 14 casos (17,1%), tendo o antivírico sido interrompido quando o resultado da PCR foi negativo para vírus herpes simplex e positivo para EV.

Diagnóstico

Das 82 crianças com infeção no SNC por EV, 76 (92,7%) foram diagnosticadas com meningite, cinco (6,1%) com encefalite ou meningoencefalite (idade 7, 9 e 14 meses; 8 e 13 anos) e um caso (21 meses) com diagnóstico de meningite e polirradiculite aguda.

Internamento, complicações e reinternamento

Apenas dez crianças (12,2%) tiveram internamento com duração inferior a 24 horas. A duração mediana de internamento foi um dia (IQR 1), com máximo de 16 dias, correspondente a um caso diagnosticado com meningoencefalite aguda.

No grupo A, a duração mediana foi de três dias (IQR 4), com mínimo de um dia e máximo de 16 dias. Já no grupo B, a mediana observada foi de um dia (IQR 0), com mínimo <24 horas e máximo de 14 dias ($p < 0,001$).

Em 70 crianças (85,4%) não foi identificada nenhuma complicação. Nas restantes 12, a complicação mais descrita foi síndrome pós-PL, em 10 casos. Ocorreu um caso de envolvimento sistémico com choque (29 dias de idade) e um caso de edema cerebral diagnosticado em TC-CE (15 anos).

Em sete casos (8,5%) houve necessidade de reinternamento. Em seis por cefaleias consideradas serem por síndrome pós-PL e um caso por suspeita de meningoencefalite, posteriormente não confirmada. A duração do primeiro internamento tinha sido inferior a 24 horas num dos casos e nos restantes seis casos de um dia.

Destaca-se o caso de uma criança do sexo masculino diagnosticada com meningite e polirradiculite aguda atribuível a EV aos 21 meses de idade. O quadro clínico caracterizou-se inicialmente por febre e vômitos incoercíveis, seguido de aparecimento de exantema micropapular e, posteriormente, claudicação da marcha, tendo sido diagnosticado com sinovite transitória da anca. Ao décimo dia de doença, por agravamento do desequilíbrio na marcha e vômitos, com febre a espaçar, foi reobservado, sendo referenciado para a Neuropediatria. Tinha contexto familiar de uma irmã com gastroenterite aguda. À observação salientava-se a presença de déficit distal do membro inferior esquerdo (dorsiflexão do pé) com repercussão na marcha, assimetria dos reflexos miotáticos nos membros e entre os reflexos dos membros inferior (menos vivos) e os dos membros superiores, marcha de base alargada, com decomposição da volta e queda preferencial para trás. Realizou PL, com 182 células/mm³, predomínio de mononucleares, proteinorráquia aumentada e com identificação de EV no LCR. Realizou RM-CE e medular que não evidenciou alterações. Apresentou boa evolução clínica durante o internamento, apenas com terapêutica de suporte. Foi reavaliado em consulta de Neuropediatria um mês mais tarde, clinicamente bem, e com investigação para neuropatia periférica (anticorpos antigangliosídeos) negativa.

Discussão

Nesta análise retrospectiva foram avaliadas crianças com infecção do SNC com identificação de EV por PCR no LCR durante um período de 8,5 anos, englobando um total de 82 crianças. Em conjunto com os parechovírus, originalmente incluídos no mesmo género, os EV constituem a principal causa de meningite vírica em crianças, particularmente em recém-nascidos e lactentes.⁷

Em climas temperados as infeções por EV ocorrem, sobretudo, nos meses de verão e outono, enquanto que em climas tropicais e subtropicais acontecem ao longo de todo o ano.^{4,14} De facto, nesta série, o maior número de casos foi observado em meses de verão, em julho e agosto (n=14 em cada). No outono e na primavera foi diagnosticado um número semelhante de casos, 21 e 20, respetivamente. Um estudo alemão mostrou resultados semelhantes, com as taxas mais elevadas de infeção por EV observadas desde junho até setembro.³

A transmissão ocorre principalmente por via fecal-oral e, em menor grau, através de gotículas respiratórias.⁴ Nos Estados Unidos, cerca de 30 a 80% dos adultos possuem anticorpos contra os serótipos mais comuns. A imunidade é específica para o serótipo, no entanto, pode ocorrer reinfeção pelo mesmo serótipo e esta ser assintomática.⁸ O período de incubação descrito é variável entre estudos: entre 7 a 14 dias¹⁴ ou entre 3-10 dias.⁹ Embora possa ocorrer alguma replicação na nasofaringe com disseminação para os vasos linfáticos do trato respiratório superior, a maioria dos vírus são deglutidos e transferidos para o estômago e trato gastrointestinal inferior, local em que, aparentemente, se ligam a recetores específicos dos enterócitos. Ocorre replicação viral na lâmina própria das placas de Peyer e, posteriormente, virémia, que transporta o vírus para locais de infeção secundária, resultando, nos casos de envolvimento do SNC, em meningite ou encefalite.⁷

A meningite a EV afeta todos os grupos etários, embora esteja mais frequentemente descrita em crianças com menos de um ano de idade.¹⁰ Dado a imaturidade do sistema imunitário, os recém-nascidos apresentam um elevado risco para infeções e manifestações clínicas graves,¹ podendo apresentar-se com um quadro clínico de sépsis-*like* de difícil distinção de sépsis bacteriana.⁹ Na nossa amostra, a maioria dos casos foram diagnosticados em crianças em idade escolar (32,9%) e em adolescentes (22%), com uma idade mediana de diagnóstico de 6,7 anos (IQR 10,71), não sendo concordante com a maioria dos estudos.⁶ Num estudo espanhol, que englobou crianças até aos 11 anos foi descrita uma média de idade de 2,5 anos, dos quais 32% eram recém-nascidos,¹⁵ e noutro estudo realizado nos Estados Unidos a

idade mediana foi de 1,7 meses (IQR 14 anos).¹⁶ Não foi encontrada justificção para esta discrepância. À semelhança de outros estudos, verificou-se um predomínio no sexo masculino.^{5,15-17}

Em recém-nascidos e lactentes, a meningite a EV caracteriza-se pela presença de sintomas inespecíficos, nos quais se inclui a febre sem foco, a irritabilidade, a letargia e a recusa alimentar. Crianças mais velhas já apresentam sinais mais específicos de meningite, tais como cefaleia, fotofobia e rigidez da nuca.¹¹ O exantema está frequentemente presente.⁹ Neste estudo, previsivelmente, a febre foi o sintoma mais comum em todas as idades.^{3,15,16,18} Adicionalmente, no grupo A a irritabilidade e a clínica respiratória foram os sintomas mais frequentemente reportados. Já no grupo B, também se destacam a cefaleia, vômitos e fotofobia e/ou fonofobia. O exame objetivo enfatiza as características expectáveis em cada grupo etário, com o grupo A com mais casos de irritabilidade, apesar do bom estado geral, enquanto que no grupo B foi mais evidente a prostração, com 93,6% das crianças a manifestarem rigidez da nuca. Outro estudo observou frequências de sinais e sintomas semelhantes: febre (98%), irritabilidade (40%) e sintomas respiratórios (30%) em recém-nascidos e febre (98%), vômitos (88%) e cefaleia (76%) em crianças mais velhas, com rigidez da nuca observada em todas com idade superior a dois anos.¹⁵

Relativamente ao contexto epidemiológico familiar, este esteve presente em 30,4% dos casos deste estudo, habitualmente de clínica respiratória. Destaca-se a existência de contexto epidemiológico evidente entre dois irmãos: o segundo caso foi diagnosticado quatro dias após o irmão ter estado internado, ambos com o diagnóstico de meningite vírica e identificação de EV no LCR. Num estudo espanhol sobre meningite a EV também foi descrita a presença de associação epidemiológica em quatro crianças (dois pares de irmãos).¹⁵

A pleocitose no LCR e elevação da proteinorráquia são comuns em infeções por EV.¹⁸ Contudo, sabe-se que a meningite a EV se pode desenvolver na ausência de alterações no número de células, especialmente em recém-nascidos.¹⁹ Neste estudo, verificou-se pleocitose em 90,2% dos casos, com uma mediana de células relativamente baixa, de 91 células/mm³ (IQR 155). No entanto, esta percentagem é superior quando comparado com um estudo realizado nos Países Baixos (58%)²⁰ e ligeiramente superior a um efetuado nos Estados Unidos (82,8%).¹⁶ Está descrito nas infeções por EV um predomínio inicial de polimorfonucleares (1-2 dias), com aparecimento do predomínio típico de linfócitos à medida que a doença evolui.^{9,11} Neste estudo, cada criança apenas foi submetida a uma única PL. Desta forma, podemos inferir que o predomínio de

polimorfonucleares no LCR constatado em 36,4% (n=28) das crianças se pode dever ao facto da PL ter sido realizada, maioritariamente, em fase precoce de doença. Nestes casos, a deteção precoce do EV teve importância na decisão terapêutica. Relativamente à proteinorráquia, estava aumentada em 45,7% dos casos, enquanto que um estudo realizado nos Estados Unidos descreve uma proteinorráquia superior a 50 mg/dL em 68,8%.¹⁶ Um estudo realizado no Reino Unido observou uma média de glicorráquia de $2,95 \pm 0,59$ mmol/L,¹⁸ semelhante à mediana do nosso estudo de 3mmol/L (IQR 0,73). Os valores de leucócitos e de pCr observados foram consistentes com outros estudos.^{11,15}

Habitualmente, a TC-CE e a RM-CE não são efetuadas em caso de suspeita de meningite a EV. Não existem alterações características de infeção do SNC por EV, no entanto podem ocorrer alterações da substância branca em caso de encefalite por este vírus.¹¹

Os EV encontram-se agrupados em quatro espécies, de A a D.⁴⁻⁶ A nível internacional foi observada uma maior tendência para o EV-B, em particular os echovírus. O EV-A foi descrito como espécie dominante apenas em estudos asiáticos.² No HP-CHUC a genotipagem do enterovírus não é solicitada por rotina, além de que apenas está disponível em laboratórios nacionais de referência, como é o caso do Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge, sendo apenas realizada em caso de surto. Os métodos moleculares disponíveis são rápidos, económicos e sensíveis.¹⁰ A cultura, além de ser mais laboriosa e cara,¹⁰ é também menos sensível.¹⁴ Já as serologias não têm utilidade no diagnóstico da infeção aguda, a não ser que haja suspeita de um serótipo específico.¹⁰ De salientar que a eliminação do vírus nas secreções nasofaríngeas e nas fezes podem ocorrer até duas semanas e entre quatro-oito semanas, respetivamente, depois da infeção, o que pode ser útil em contexto de surto.⁹ Apesar deste trabalho incluir exclusivamente amostras de LCR, o *European non-polio enterovirus network* (ENPEN) recomenda que, em caso de suspeita de meningite/meningoencefalite, também seja efetuada a pesquisa de EV em amostras respiratórias, de sangue e fezes.²¹

As infeções do SNC causadas por EV englobam a meningite vírica, a encefalite, a meningoencefalite, a encefalite do tronco cerebral e a paralisia flácida aguda.⁴ Também têm sido associados a casos de síndrome de Guillain-Barré, de mielite aguda transversa e de ataxia cerebelosa.¹⁴ A meningite é de longe o tipo de infeção mais frequente.^{4,10} A encefalite a EV é clinicamente indistinguível das encefalites causadas por outros vírus (vírus herpes simplex, por exemplo). No entanto, estudos sugerem

tratar-se de uma encefalite menos grave, com tempo de hospitalização mais curto e melhores resultados associados.¹⁰ Este estudo corrobora o facto de a meningite constituir a manifestação de infeção do SNC mais comum,¹⁰ uma vez que 92,7% dos casos foram diagnosticados com meningite e apenas 6,1% com encefalite/meningoencefalite, resultados congruentes com um estudo realizado nos Estados Unidos.¹⁶ Destaca-se, ainda, um caso com diagnóstico concomitante de meningite e polirradiculite aguda atribuível a EV.

Atualmente, não há nenhum tratamento específico disponível e não está aprovada qualquer medicação antiviral para o tratamento das infeções por picornavírus. Embora sejam necessários mais estudos, alguns sugerem benefícios com a utilização de pleconaril, um inibidor da cápside viral, com atividade contra os picornavírus.⁷ A imunoglobulina intravenosa é usada em casos graves de infeção por EV, apesar de não existir uma clara evidência do seu benefício.¹⁰ Com exceção da China, onde foram introduzidas duas vacinas contra o EV-A71, não está disponível nenhuma vacina eficaz contra os EV não-polio.^{7,10} Dado o seu elevado número, o desenvolvimento de vacinas contra todos os serótipos do género EV é difícil.⁷ Assim, as medidas gerais de prevenção da disseminação destas infeções contemplam medidas de higiene básicas, tal como a lavagem das mãos.¹⁰

A maioria dos lactentes que apresentam sinais e sintomas sugestivos de infeção do SNC inicia antibioticoterapia empiricamente, enquanto aguarda pelos resultados microbiológicos, podendo ser suspensa assim que o EV é identificado no LCR e caso as características clínicas e laboratoriais não sejam sugestivas de uma meningite bacteriana.¹¹ Neste estudo, 42,7% dos casos iniciaram antibioticoterapia, uma percentagem inferior a estudos efetuados nos Países Baixos (52%)²⁰ e em Espanha, (apenas incluindo recém-nascidos; 72%),²² mas superior a outro espanhol (38%).¹⁵ Neste estudo, previsivelmente, a proporção de lactentes que iniciou esta terapêutica foi superior à observada nas restantes idades (81% vs. 30%). Um estudo realizado no Reino Unido concluiu que o rápido diagnóstico das infeções por EV reduziu a duração de tratamento com antibiótico e a duração de internamento hospitalar em 48 horas, em média, em crianças com menos de três meses que se apresentaram com doença sépsis-like ou meningite. A confirmação diagnóstica também evitou a realização de exames complementares de diagnóstico adicionais.¹⁸ Outro estudo do Reino Unido também observou um período de internamento e de exposição a antibióticos menor nos casos positivos para EV/parechovírus quando comparado com casos com apresentação clínica semelhante, mas negativos para ambos os vírus e sem qualquer achado microbiológico positivo.¹⁸ Estas vantagens foram igualmente constatadas quando foi

feita a comparação de crianças com identificação de EV no LCR com crianças em que não foi realizada esta pesquisa.¹¹ Neste estudo, a PCR positiva para EV motivou a interrupção da antibioticoterapia em 57,1% (n=20) das 35 crianças que a tinham iniciado. O facto dos resultados da PCR neste estudo estarem disponíveis desde 2017 poucas horas após a colheita de LCR também tem contribuído para a redução do tempo de antibioticoterapia e de internamento. A negatividade da cultura do LCR permitiu a suspensão do antibiótico em dez crianças, enquanto que em quatro crianças apenas foi interrompida quando a hemocultura se revelou negativa. O protelar da interrupção do antibiótico até cultura do LCR e/ou hemocultura negativas ocorreu, sobretudo, em lactentes, correspondendo a 60% e 100%, respetivamente, uma faixa etária em que tendencialmente o quadro clínico pode causar maior preocupação. Certamente que, nestes casos, o senso clínico prevaleceu. Apenas uma criança completou a antibioticoterapia com intuito de tratamento de pielonefrite aguda. Há estudos que reportam a presença concomitante de infeção do trato urinário.^{5,15,23} Um desses estudos, que incluiu apenas lactentes com menos de três meses, diagnosticou 7/45 (15,5%) com infeção do SNC a EV e infeção urinária.²³

A mediana da duração de internamento (um dia) foi inferior à observada noutros estudos: de dois dias nos Estados Unidos¹⁶ e de 3,5 dias em Espanha.¹⁵ Neste último estudo foi observada uma duração superior de internamento em recém-nascidos, comparativamente a crianças com idade superior a dois anos (4,5 dias vs. 2,3 dias), sendo congruente com o verificado na amostra deste trabalho, com significado estatístico.

A cefaleia pós-PL é uma das complicações mais comuns desta patologia. Apesar das evidências serem limitadas, sugerem que a sua frequência em crianças é de aproximadamente 5-15%.²⁴ A complicação mais descrita neste estudo, assim como o principal motivo de reinternamento, correspondeu a esta síndrome, que se caracteriza pelo aparecimento de cefaleias, por vezes acompanhadas de náuseas e vómitos que agravam em ortostatismo. Noutro estudo, foi descrita a readmissão de 2/92 crianças por cefaleias pós-PL.¹⁵

Apesar de raro, em recém-nascidos, estão descritos casos de miocardite, hepatite²⁵ e sépsis severa,⁶ com mortalidade elevada. No entanto, a maioria dos casos de meningite a EV resolve sem complicações. Pelo contrário, estas podem ocorrer em crianças com encefalite, nomeadamente sequelas neurológicas a longo prazo. Nessas situações, as crianças devem manter vigilância, com o objetivo de reavaliar a audição, visão e o neurodesenvolvimento.¹¹ A evolução clínica a longo prazo não foi objeto deste

estudo, mas há trabalhos que demonstram que os lactentes com infeções do SNC por EV, mesmo com aparente evolução sem complicações, podem vir a apresentar perturbações do neurodesenvolvimento no futuro.⁷ Por esse motivo, nos últimos anos, tem sido prática comum no HP-CHUC proceder ao pedido de consulta de neurodesenvolvimento após infeção do SNC por EV em pequenos lactentes.

Desde o ano 2000 têm existido alguns surtos de infeções graves por EV-D68 e EV-A71.⁷ Estes serótipos têm estado associados a doenças do SNC mais graves e a piores resultados, no entanto a deteção do serótipo não altera o tipo de intervenção.¹¹ O EV-D68, assim como o EV-A71, têm sido associados a paralisia flácida aguda.^{10,26} Nos primeiros sete meses do ano de 2019 foram diagnosticados 38 casos de EV-A71 (um deles fatal) na Alemanha.²⁷ No caso do menino de 21 meses diagnosticado com meningite e polirradiculite aguda atribuível a EV não foi solicitada genotipagem, no entanto, dado a diferente apresentação e evolução comparativamente com as restantes crianças, é possível suspeitar do envolvimento de um serótipo mais agressivo, como é o caso do EV-D68.

Este estudo apresenta algumas limitações. Como é um estudo retrospectivo, a abordagem e os registos são distintos consoante os clínicos envolvidos. A abordagem dos doentes também mudou durante o período do estudo, uma vez que inicialmente a PCR era realizada apenas em dias úteis, e nos últimos 2,5 anos do estudo os resultados são em tempo real, permitindo uma abordagem menos conservadora por parte dos clínicos, nomeadamente em termos de duração de tratamento e de internamento.

Conclusão

A maioria das infeções por EV apresentam uma evolução benigna e são autolimitadas. Apesar de não estar disponível nenhum tratamento específico, a identificação deste agente etiológico é fundamental para reduzir a duração de internamento e do tratamento antibiótico e, conseqüentemente, a realização de exames complementares de diagnóstico desnecessários e os custos económicos inerentes. A não confirmação diagnóstica desta infeção pode levar a uma subestimação da sua incidência, daí a importância da identificação deste agente no LCR, idealmente de forma rápida e sempre disponível, como é atualmente o caso no HP-CHUC.

Agradecimentos

Não poderia terminar este trabalho sem agradecer a todas as pessoas que contribuíram para a sua realização.

À minha orientadora, Dra. Ana Brett, o meu muito obrigada por toda a disponibilidade e dedicação a este trabalho. Obrigada pelo carinho, palavras de incentivo e pela paciência com que sempre esclareceu as minhas dúvidas.

À minha coorientadora, Prof. Doutora Fernanda Rodrigues, pela ajuda na correção do trabalho e pela pertinência das sugestões.

Aos responsáveis e técnicos do laboratório de Patologia Clínica do HP-CHUC pela disponibilização dos resultados da PCR.

À Márcia pela colaboração na recolha e organização dos dados.

À Elisabete Rodrigues e ao Dr. Francisco Caramelo pelo esclarecimento das dúvidas relativas à análise estatística.

À minha família, em especial à minha Mãe e ao meu irmão Ricardo, pelo carinho, paciência e apoio incondicional.

Ao Carlos, por estar sempre presente, entender os meus humores e por todas as vezes que me dá força e ânimo para nunca desistir.

Às minhas amigas, Bia, Carolina, Filipa, Lisandra, Lucinda e Mariana, obrigada pela vossa amizade e apoio.

Referências bibliográficas

1. Piralla A, Mariani B, Stronati M, Marone P, Baldanti F. Human enterovirus and parechovirus infections in newborns with sepsis-like illness and neurological disorders. *Early Hum Dev.* 2014;90 Suppl 1:S75-7.
2. Janes VA, Minnaar R, Koen G, van Eijk H, Dijkman-de Haan K, Pajkrt D, et al. Presence of human non-polio enterovirus and parechovirus genotypes in an Amsterdam hospital in 2007 to 2011 compared to national and international published surveillance data: a comprehensive review. *Euro Surveill.* 2014;19(46).
3. Vollbach S, Muller A, Drexler JF, Simon A, Drosten C, Eis-Hubinger AM, et al. Prevalence, type and concentration of human enterovirus and parechovirus in cerebrospinal fluid samples of pediatric patients over a 10-year period: a retrospective study. *Virology.* 2015;12:199.
4. Rudolph H, Schrotten H, Tenenbaum T. Enterovirus Infections of the Central Nervous System in Children: An Update. *Pediatr Infect Dis J.* 2016;35(5):567-9.
5. Roda D, Perez-Martinez E, Cabrerizo M, Trallero G, Martinez-Planas A, Luaces C, et al. Clinical characteristics and molecular epidemiology of Enterovirus infection in infants <3 months in a referral paediatric hospital of Barcelona. *Eur J Pediatr.* 2015;174(11):1549-53.
6. Cabrerizo M, Diaz-Cerio M, Munoz-Almagro C, Rabella N, Tarrago D, Romero MP, et al. Molecular epidemiology of enterovirus and parechovirus infections according to patient age over a 4-year period in Spain. *J Med Virol.* 2017;89(3):435-442.
7. de Crom SC, Rossen JW, van Furth AM, Obihara CC. Enterovirus and parechovirus infection in children: a brief overview. *Eur J Pediatr.* 2016;175(8):1023-9.
8. Modlin JF. Enterovirus and parechovirus infections: Epidemiology and pathogenesis. Waltham: UpToDate; 2019 [consultado em 22 Dez 2019] Disponível em: <https://www.uptodate.com/contents/enterovirus-and-parechovirus-infections-epidemiology-and-pathogenesis>.
9. Zaoutis T, Klein JD. Enterovirus infections. *Pediatr Rev.* 1998;19(6):183-91.
10. Modlin JF. Enterovirus and parechovirus infections: Clinical features, laboratory diagnosis, treatment, and prevention. Waltham: UpToDate; 2019 [consultado em 22 Dez 2019] Disponível em: <https://www.uptodate.com/contents/enterovirus-and-parechovirus-infections-clinical-features-laboratory-diagnosis-treatment-and-prevention>.

11. Drysdale SB, Kelly DF. Fifteen-minute consultation: enterovirus meningitis and encephalitis-when can we stop the antibiotics? *Arch Dis Child Educ Pract Ed.* 2017;102(2):66-71.
12. Cailleaux M, Pilmis B, Mizrahi A, Lourtet-Hascoet J, Van JN, Alix L, et al. Impact of a multiplex PCR assay (FilmArray®) on the management of patients with suspected central nervous system infections. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2019.
13. Oliveira G, Saraiva J. *Lições de Pediatria: Imprensa da Universidade de Coimbra*; 2017.
14. Dunn JJ. Enteroviruses and Parechoviruses. *Microbiol Spectr.* 2016;4(3).
15. Menasalvas-Ruiz AI, Salvador-Garcia C, Moreno-Docon A, Alfayate-Miguel S, Perez Canovas C, Sanchez-Solis M. Enterovirus reverse transcriptase polymerase chain reaction assay in cerebrospinal fluid: an essential tool in meningitis management in childhood. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2013;31(2):71-5.
16. Torres SD, Jia DT, Schorr EM, Park BL, Boubour A, Boehme A, et al. Central nervous system (CNS) enterovirus infections: A single center retrospective study on clinical features, diagnostic studies, and outcome. *J Neurovirol.* 2019.
17. Gharbi J, Jaidane H, Ben M'hadheb M, El Hiar R, Chouchene C, Gueddiche MN, et al. Epidemiological study of non-polio enterovirus neurological infections in children in the region of Monastir, Tunisia. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2006;54(1):31-6.
18. Chakrabarti P, Warren C, Vincent L, Kumar Y. Outcome of routine cerebrospinal fluid screening for enterovirus and human parechovirus infection among infants with sepsis-like illness or meningitis in Cornwall, UK. *Eur J Pediatr.* 2018;177(10):1523-1529.
19. Song JY, Nam SO, Kim YA, Kim KM, Lyu SY, Ko A, et al. Cerebrospinal fluid non-pleocytosis in pediatric enteroviral meningitis: Large-scale review. *Pediatr Int.* 2018;60(9):855-861.
20. de Crom SC, Rossen JW, de Moor RA, Veldkamp EJ, van Furth AM, Obihara CC. Prospective assessment of clinical symptoms associated with enterovirus and parechovirus genotypes in a multicenter study in Dutch children. *J Clin Virol.* 2016;77:15-20.
21. Harvala H, Broberg E, Benschop K, Berginc N, Ladhani S, Susi P, et al. Recommendations for enterovirus diagnostics and characterisation within and beyond Europe. *J Clin Virol.* 2018;101:11-17.

22. Cabrerizo M, Trallero G, Pena MJ, Cilla A, Megias G, Munoz-Almagro C, et al. Comparison of epidemiology and clinical characteristics of infections by human parechovirus vs. those by enterovirus during the first month of life. *Eur J Pediatr*. 2015;174(11):1511-6.
23. Calvo C, Gallardo P, Torija P, Bellon S, Mendez-Echeverria A, Del Rosal T, et al. Enterovirus neurological disease and bacterial coinfection in very young infants with fever. *J Clin Virol*. 2016;85:37-39.
24. Fastle RK, Bothner J. Lumbar puncture: Indications, contraindications, technique, and complications in children. Waltham: UpToDate; 2019 [consultado em 23 Dez 2019] Disponível em: <https://www.uptodate.com/contents/lumbar-puncture-indications-contraindications-technique-and-complications-in-children>.
25. Verboon-Maciolek MA, Krediet TG, Gerards LJ, de Vries LS, Groenendaal F, van Loon AM. Severe neonatal parechovirus infection and similarity with enterovirus infection. *Pediatr Infect Dis J*. 2008;27(3):241-5.
26. Bitnun A, Yeh EA. Acute Flaccid Paralysis and Enteroviral Infections. *Curr Infect Dis Rep*. 2018;20(9):34.
27. Bottcher S, Diedrich S, Keeren K, Laboratory Network For Enterovirus Diagnostic (LaNED). Increased detection of enterovirus A71 infections, Germany, 2019. *Euro Surveill*. 2019;24(39).