



UNIVERSIDADE D
COIMBRA

FACULDADE
DE
MEDICINA

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA – TRABALHO FINAL

MÁRCIA DANIELA MOREIRA DA COSTA

***A UTILIDADE DE UM PAINEL SINDRÓMICO DE BIOLOGIA
MOLECULAR NO DIAGNÓSTICO DE INFEÇÕES DO SISTEMA
NERVOSO CENTRAL DE ETIOLOGIA VÍRICA***

ARTIGO CIENTÍFICO

ÁREA CIENTÍFICA DE PEDIATRIA

Trabalho realizado sob orientação de:

DRA. ANA CRISTINA DE OLIVEIRA BRETT
PROF. DOUTORA FERNANDA MARIA PEREIRA RODRIGUES

ABRIL/2020

***A utilidade de um painel sindrómico de biologia
molecular no diagnóstico de infeções do Sistema
Nervoso Central de etiologia vírica***

**MÁRCIA DANIELA MOREIRA DA COSTA¹
PROF. DOUTORA FERNANDA RODRIGUES^{1,2}
DRA. ANA BRETT^{1,2}**

Afiliação:

¹ Faculdade de Medicina da 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 do Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra,

Avenida Afonso Romão, Alto da Baleia,

3000-602 Coimbra

Endereço de correio eletrónico do orientador:

anacbrett@gmail.com

Índice

Lista de siglas e abreviaturas.....	4
Resumo	5
Abstract	7
Introdução.....	9
Material e Métodos	11
Resultados.....	14
Demografia	14
Manifestações clínicas e exame objetivo.....	15
Epidemiologia.....	16
Exames complementares de diagnóstico	17
Tratamento e evolução.....	21
Complicações.....	22
Falsos positivos e co-deteções pelo teste sindrómico	22
Discussão	24
Conclusão.....	29
Agradecimentos.....	30
Referências	31

Lista de siglas e abreviaturas

CHUC	<i>Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra</i>
CMV	<i>Citomegalovírus</i>
EcoTF	<i>Ecografia transfontanelar</i>
EEG	<i>Eletroencefalograma</i>
EV	<i>Enterovírus</i>
GEA	<i>Gastrenterite aguda</i>
HHV-6	<i>Human herpes virus 6/vírus herpes humano 6</i>
HP	<i>Hospital Pediátrico</i>
HPeV	<i>Human Parechovírus/Parechovírus humano</i>
HSV-1	<i>Herpes simplex virus 1</i>
HSV-2	<i>Herpes simplex virus 2</i>
IQR	<i>Interquartil Range</i>
LCR	<i>Líquido cefalorraquídeo</i>
M/E	<i>Meningite e/ou encefalite</i>
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
pCr	<i>Proteína C-reativa</i>
PCT	<i>Procalcitonina</i>
PL	<i>Punção lombar</i>
RM-CE	<i>Ressonância magnética crânio-encefálica</i>
RN	<i>Recém-nascido</i>
RT-PCR	<i>Reverse transcription polymerase chain reaction</i>
SNC	<i>Sistema Nervoso Central</i>
SU	<i>Serviço de Urgência</i>
TC-CE	<i>Tomografia computadorizada crânio-encefálica</i>
VZV	<i>Vírus varicela zoster</i>

Resumo

Introdução: Os vírus constituem a principal etiologia das infeções do Sistema Nervoso Central (SNC), sendo a população pediátrica de elevado risco. O objetivo deste estudo foi caracterizar as infeções do SNC de etiologia vírica diagnosticadas através de um painel sindrómico de biologia molecular e avaliar o impacto da sua implementação num hospital pediátrico durante 3,5 anos.

Materiais e Métodos: Estudo observacional, transversal e analítico, com colheita retrospectiva de dados dos casos de infeção do SNC de etiologia vírica diagnosticados através de um teste sindrómico de *polymerase chain reaction* (PCR) no Hospital Pediátrico do Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra, de janeiro/2016 a junho/2019. Até janeiro/2018 o teste esteve disponível em horário normal durante dias úteis e desde então é realizado 24 horas/dia, todos os dias. Foram avaliados dados demográficos, manifestações clínicas, exames complementares, tratamento e evolução. A análise estatística foi realizada em SPSS25®.

Resultados: Foram diagnosticados 53 casos: 79,2% enterovírus (EV), 11,3% parechovírus humano (HPeV), 3,8% vírus herpes humano 6 (HHV-6), 3,8% vírus varicela zoster (VZV) e 1,9% vírus herpes simplex 2 (HSV-2). Num caso de EV detetou-se simultaneamente HHV-6. Do total, 58,5% eram do sexo masculino, com idade mediana de 9,7 meses (IQR 85,8). A febre foi a manifestação mais comum (79,2%). No grupo A (idade <12 meses, n=27) todos apresentaram fontanela anterior normotensa. No grupo B (crianças e adolescentes, n=26), 92,3% apresentaram cefaleias, 34,6% fotofobia e/ou fonofobia e 92,3% rigidez da nuca. Dos 53, 71,7% tinham pleocitose (mediana 40 células/mm³, IQR 151; três com >1000 células/mm³), 57,9% com predomínio de mononucleares. A proteinorráquia estava elevada em 45,3% e a glicorráquia diminuída em 9,4%. Iniciaram tratamento empírico 79,2% antes de 2018 e 37,9% após, com significado estatístico (p=0,005). Dos 29 (54,7%) que iniciaram antibioticoterapia, em 41,4% foi suspensa após identificação de vírus. Dos 26,4% (n=14) que iniciaram aciclovir, três mantiveram como tratamento (VZV e HSV-2). A duração mediana de internamento foi dois dias (IQR 3). Houve um falso positivo para HSV-2.

Discussão: A identificação do vírus através do teste sindrómico de PCR permitiu otimizar a terapêutica instituída. Verificou-se que, a partir de 2018, a abordagem terapêutica dos casos não urgentes se tornou mais expectante, demonstrado pela diminuição estatisticamente significativa em iniciar tratamento empírico.

Conclusão: O teste sindrômico de PCR é um teste sensível e de fácil execução, que permite a diagnóstico etiológico rápido de microrganismos usualmente associados a infecções do SNC, com conseqüente melhoria na abordagem clínica e terapêutica.

Palavras- chave: Meningite; Encefalite, Vírus; Biologia Molecular

Abstract

Introduction: Virus are the main aetiology of Central Nervous System (CNS) infections, with the paediatric population at higher risk. The aim of this study was to characterise CNS infections of viral aetiology diagnosed by molecular biology syndromic testing and to assess the impact of its implementation in a paediatric hospital during 3.5 years.

Material and Methods: A cross-sectional analytic study was conducted with retrospective data collection of all the clinical cases with CNS infection of viral aetiology diagnosed by polymerase chain reaction (PCR) syndromic testing in Hospital Pediátrico of Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra from January/2016 to June/2019. Until January/2018, the test was available during working days and since then is used 24 hours a day, every day of the week. Demographic factors, clinical features, diagnostic tests, treatment and outcome were evaluated. Statistical analysis was done using SPSS25®.

Results: Fifty-three cases were included: 79.2% enterovirus (EV), 11.3% human parechovirus (HPeV), 3.8% human herpes virus 6 (HHV-6), 3.8% varicella zoster virus (VZV) e 1.9% herpes simplex virus 2 (HSV-2). In one case of EV, HHV-6 was simultaneously detected. From the total number of cases, 58.5% were male, with a median age of 9.7 months (IQR 85.8). Fever was the most common symptom (79.2%). In group A (age <12 months, n=27) all presented with a normotensive anterior fontanelle. In group B (children and adolescents, n=26), 92.3% had headaches, 34.6% photophobia and/or phonophobia and 92.3% neck stiffness. Of the 53 cases, 71.7% had pleocytosis (median 40 cells/mm³, IQR 151; three cases with >1000 cells/mm³), with predominance of mononuclear cells in 57.9%. Cerebrospinal fluid protein count was elevated in 45.3% and glucose count low in 9.4%. Empirical treatment was started in 79.2% before 2018, and in 37.9% after 2018, with statistical significance (p=0,005). Of the 29 cases (54.7%) that started antibiotics, 41.4% stopped after identification of a virus. Of the 26.4% (n=14) who started acyclovir, three maintained it as treatment (VZV and HSV-2). Median duration of admission was two days (IQR 3). There was one false positive for HSV-2.

Discussion: Identification of the virus through PCR syndromic testing allowed for the optimisation of treatment. From 2018, the therapeutic approach of non-urgent cases became more expectant, confirmed by a statistically significant reduction in initiating empirical treatment.

Conclusions: PCR syndromic testing is a sensitive and easy-to-execute test that allows for the rapid aetiologic diagnosis of microorganisms usually associated with CNS infections, with subsequent improvement of both clinical and therapeutic approaches.

Keywords: Meningitis; Encephalitis; Virus; Molecular Biology

Introdução

A meningite, a encefalite e a meningoencefalite (M/E) correspondem, respetivamente, à inflamação das meninges, do encéfalo ou de ambos. Constituem infeções graves do Sistema Nervoso Central (SNC), às quais é atribuída uma morbimortalidade significativa, incluindo a possibilidade de sequelas graves. Como tal, é imperativo um diagnóstico célere de forma a assegurar um tratamento adequado e um melhor prognóstico.^{1,2}

Nos últimos anos, devido à disponibilidade de vacinas preventivas, assistiu-se a uma diminuição da incidência das infeções de etiologia bacteriana. Por outro lado, o diagnóstico das infeções de etiologia vírica tem apresentado avanços significativos, com o desenvolvimento das técnicas de biologia molecular. Estas técnicas, cada vez mais simples e acessíveis, vieram facilitar o diagnóstico etiológico de M/E, uma vez que os vírus constituem os principais agentes, com a população pediátrica a representar um grupo de elevado risco.²⁻⁴

A *reverse transcription polymerase chain reaction* (RT-PCR) foi das primeiras técnicas comercialmente disponíveis na deteção de vírus no líquido cefalorraquídeo (LCR). Exige um elevado nível de suspeita clínica, pois os agentes específicos que se pretende testar, como o vírus herpes simplex (HSV-1 e HSV-2), enterovírus (EV) ou vírus varicela zoster (VZV), têm de ser selecionados pelo clínico. A sua realização requer técnicos especializados e várias horas de processamento, o que pode condicionar uma demora na obtenção dos resultados, com eventual cobertura antibiótica desnecessária e atrasos na implementação da terapêutica definitiva.²⁻⁵

Na tentativa de ultrapassar as suas limitações, foram surgindo painéis sindrómicos de biologia molecular que utilizam a técnica *real-time* PCR. Permitem não só a deteção simultânea de múltiplos microrganismos, incluindo bactérias, vírus e fungos, como todos os resultados estão disponíveis em menos de duas horas.⁵⁻⁷ Têm sido realizados vários estudos internacionais para estudar o impacto da implementação dos testes sindrómicos em diferentes hospitais, nomeadamente a sua comparação em termos de resultados e custos com os métodos convencionais e a repercussão da sua implementação na terapêutica e duração de internamento.^{2,6-21} Até à data não existem estudos em Portugal que avaliem a implementação deste teste na realidade pediátrica.

O objetivo deste estudo foi caracterizar os casos de infeção do SNC de etiologia vírica diagnosticados através de um teste sindrómico de PCR no Hospital Pediátrico do

Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra (HP-CHUC), por forma a avaliar o impacto deste teste no diagnóstico e tratamento das crianças.

Material e Métodos

Foi realizado um estudo observacional, transversal e analítico, com colheita retrospectiva de dados, recorrendo aos registos informáticos dos processos clínicos. A amostra incluiu todos os doentes diagnosticados com M/E que, durante um período de três anos e meio (janeiro de 2016 a junho de 2019), recorreram ao Serviço de Urgência (SU) do HP-CHUC e nos quais foi identificado um vírus pelo painel síndromico de biologia molecular no LCR.

O HP-CHUC recebe crianças e adolescentes com idade inferior a 18 anos, principalmente do distrito de Coimbra, mas também da região Centro. A sua área de influência direta abrange uma população de 67 873 crianças e adolescentes dos 0-18 anos, disponibilizando cuidados altamente diferenciados a 296 083 crianças e adolescentes da Região Centro do país (Fonte: Instituto Nacional de Estatística, Censos 2011). Nos últimos 4 anos, teve uma média de 64012 observações no Serviço de Urgência e de 3773 internamentos.²²

O primeiro teste comercial disponível por *real-time* PCR para a deteção simultânea de microrganismos no LCR (*BioFire® FilmArray® Meningitis/Encephalitis Panel*) foi aprovado pela *Food and Drug Administration* em outubro de 2015 e pela Comissão Europeia em janeiro de 2016.^{2,5,7} Inclui 14 dos principais agentes de M/E: seis bactérias (*Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae*, *S. agalactiae*, *Escherichia coli K1*, *Haemophilus influenzae* e *Listeria monocytogenes*), sete vírus (EV, HSV-1, HSV-2, VZV, parechovírus [HPeV], citomegalovírus [CMV] e vírus herpes humano 6 [HHV-6]) e um fungo (*Cryptococcus neoformans/gatti*). Apenas necessita de um volume de LCR de 200 µL e o processamento das amostras é simples e rápido, com resultados disponibilizados em menos de duas horas, sendo cada microrganismo classificado como “detetado” ou “não detetado”.^{2,3,23}

Este painel síndromico de biologia molecular é realizado desde janeiro de 2016 no HP-CHUC, utilizando as recomendações do fabricante.²³ Inicialmente era realizado durante os dias úteis entre as 9 e as 17 horas, porém, desde janeiro de 2018, encontra-se disponível 24 horas por dia, todos os dias da semana. Os resultados do teste foram fornecidos pelo Laboratório de Patologia Clínica dos CHUC. Foram selecionados aqueles que apresentaram deteção de vírus.

Para cada caso foram analisados: sexo e idade à apresentação; dia de doença em que recorreu ao SU e em que realizou a punção lombar (PL), manifestações clínicas, contexto epidemiológico (escolar e familiar), exames complementares de diagnóstico,

tratamento com antibioticoterapia e/ou aciclovir e a sua relação com o resultado de exames realizados, duração de internamento, existência de complicações e reinternamentos.

Relativamente à sintomatologia, foi pesquisada a presença de febre (definida como temperatura axilar superior a 38°C), vômitos, irritabilidade, diarreia, prostração, convulsão, exantema, sintomas respiratórios ou outros. Definiram-se dois grupos etários para análise de algumas manifestações clínicas. O grupo A incluiu recém-nascidos (RN) dos 0 aos 28 dias e lactentes, dos 29 dias aos 12 meses. O grupo B incluiu as crianças com >12 meses a <18 anos de idade. No grupo A avaliou-se a fontanela anterior e no grupo B a presença de cefaleias, fotofobia/fonofobia e sinais meníngeos (rigidez terminal da nuca, sinais de Kernig e Brudzinski).^{1,4,24}

Dos exames complementares de diagnóstico foram avaliados os resultados das análises sanguíneas, incluindo os valores de procalcitonina (PCT) e de proteína C-reativa (pCr), tomando como valores normais de referência: PCT sérica <0,5 ng/mL e pCr <1 mg/dL.²⁵ Do estudo do LCR procedeu-se à análise química e exame citológico, com valores de referência diferentes nos RN e restantes idades. No grupo dos RN consideraram-se valores normais <20 células/mm³ e proteinorráquia <120 mg/dL. Nas restantes idades consideraram-se valores normais <5 células/mm³ e proteinorráquia <40 mg/dL. A glicorráquia foi considerada normal se entre 2,2-4,4 mmol/L e a relação glicose LCR/plasma se ≥0,5.^{24,26} Foram ainda avaliados os resultados de hemocultura, sumária de urina e urocultura, eletroencefalograma (EEG), tomografia computadorizada crânio-encefálica (TC-CE), ecografia transfontanelar (EcoTF), ressonância magnética crânio-encefálica (RM-CE) e do painel sindrómico de PCR das secreções respiratórias, que permite a identificação de 18 vírus respiratórios e quatro bactérias atípicas.²⁷

Foram comparadas as infeções pelos diferentes agentes etiológicos em relação a dados demográficos, diagnóstico, evolução, tipo de tratamento utilizado, complicações e necessidade de reinternamento.

Para avaliar o impacto do teste sindrómico, foi comparada a abordagem terapêutica inicial antes e depois do teste estar disponível 24 horas por dia todos os dias da semana.

A análise estatística foi efetuada com o programa *Statistical Package for the Social Sciences*®, versão 25 (SPSS, Chicago, IL). Para averiguar a normalidade foi utilizado o teste de Shapiro-Wilk. As variáveis quantitativas foram analisadas com recurso a medidas de tendência central e dispersão. As variáveis qualitativas foram analisadas através de frequências absolutas e relativas. As diferenças de distribuição

entre variáveis categóricas foram analisadas com o teste Exato de Fisher, de acordo com o tamanho da amostra. Foi utilizado 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

Durante os três anos e meio do estudo foram identificados, através do painel sindrómico, 53 casos de infeção do SNC de etiologia vírica. Destes, 42 corresponderam a infeção por EV (79,2%), seis por HPeV (11,3%), dois por HHV-6 (3,8%), dois por VZV (3,8%) e um por HSV-2 (1,9%). Num dos casos de EV detetou-se a presença simultânea de HHV-6. Não foram identificados HSV-1 ou CMV durante o período do estudo. A figura 1 mostra a distribuição dos casos por ano e por vírus detetado.

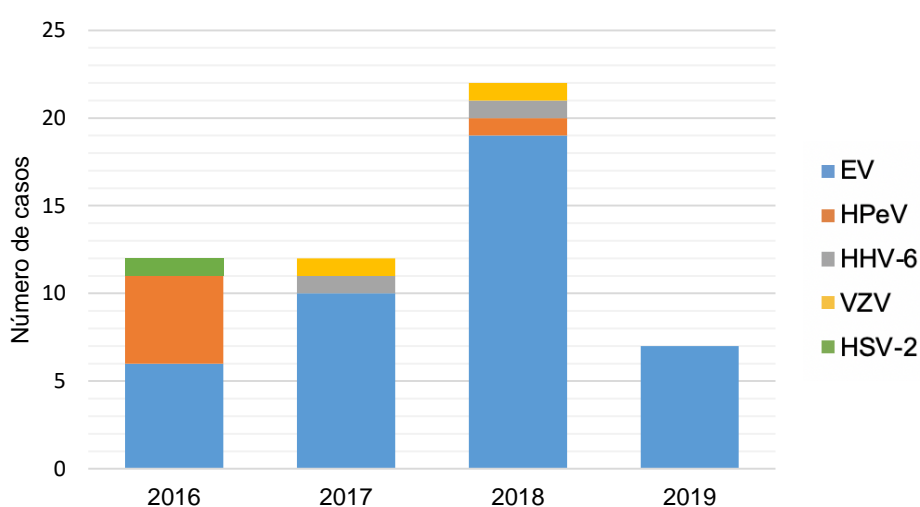


Figura 1. Distribuição anual dos casos de infeção do SNC de etiologia vírica confirmados pelo painel sindrómico de biologia molecular, durante o período do estudo (n=53).

Do total, 58,5% (n=31) eram do sexo masculino. A idade mediana foi de 9,7 meses (IQR 85,8), com mínimo de nove dias e máximo de 17,6 anos. Relativamente à faixa etária, 50,9% (n=27) ocorreram abaixo dos 12 meses (grupo A), e 26 em crianças ou adolescentes (grupo B). A figura 2 mostra a distribuição dos vírus por idade.

Das crianças observadas, 77,4% recorreram ao SU nas primeiras 24 horas de doença. Duas crianças diagnosticadas com EV recorreram ao SU no décimo e décimo primeiro dia de doença.

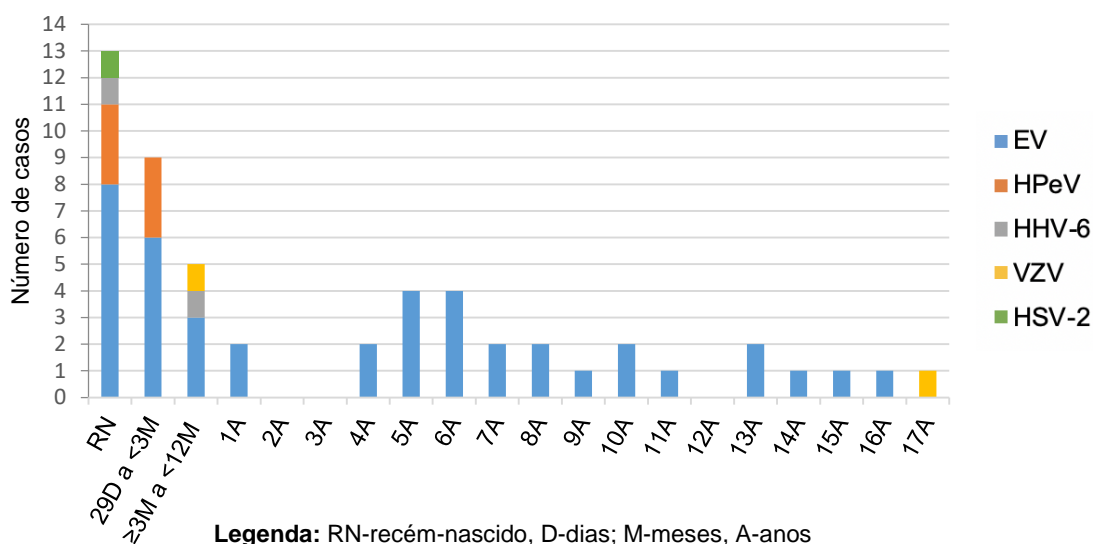


Figura 2. Distribuição por idade dos casos de infecção do SNC de etiologia vírica confirmados pelo painel síndromico de biologia molecular, durante o período do estudo (n=53).

Manifestações clínicas e exame objetivo

Na tabela 1, apresentam-se as manifestações clínicas presentes em todos os casos diagnosticados.

Tabela 1. Manifestações clínicas dos casos de infecção do SNC de etiologia vírica confirmados pelo painel síndromico de biologia molecular, durante o período do estudo (n=53).

Manifestações clínicas	EV (n=42)	HPeV (n=6)	HHV-6 (n=2)	VZV (n=2)	HSV-2 (n=1)	Total (n=53) n (%)
Febre	32	6	2	1	1	42 (79,2%)
Vômitos	24	0	0	1	1	26 (49,1%)
Respiratórias	10	0	1	1	1	13 (24,5%)
Exantema	8	1	2	2	0	13 (24,5%)
Irritabilidade	6	3	0	1	0	10 (18,9%)
Prostração	6	1	0	1	0	8 (15,1%)
Convulsões	2	0	1	0	1	4 (7,5%)
Diarreia	1	1	1	0	0	3 (5,7%)
Outras*	6	4	1	0	1	12 (22,6%)

*Outras: gemido intermitente, recusa alimentar, má perfusão periférica, claudicação intermitente.

A febre foi a manifestação clínica mais comum, estando presente em 42 casos (79,2%). A mediana das temperaturas foi de 38,3°C (IQR 0,6), com mínimo de 36°C e máximo de 39,1°C.

A sintomatologia respiratória predominante foi tosse, obstrução nasal, rinorreia mucosa e odinofagia. Um caso com identificação de VZV apresentou sinais de dificuldade respiratória (tiragem intercostal) e o caso com HSV-2 necessitou de O₂ suplementar.

Relativamente às manifestações cutâneas, em seis com identificação de EV descreveu-se exantema micro/macropapular, com atingimento preferencial do tronco e membros, sem envolvimento palmoplantar. Nos outros dois casos de EV com exantema, um foi descrito como petequial periorbitário e outro como petequial com atingimento da face e região cervical. O exantema do caso com HPeV foi descrito como macular disperso, com atingimento palmoplantar. Num dos casos de VZV foram descritas lesões vesiculares no couro cabeludo, tronco e membros e no outro objetivaram-se lesões na região dorsal sugestivas de zona. Nos casos de HHV-6, o exantema estava localizado ao tronco, membros e região cervical.

No grupo A (n=27), todos os lactentes tinham descrita a fontanela anterior como normotensa. No grupo B (n=26), 24 crianças apresentaram cefaleias (92,3%), das quais nove com fotofobia e/ou fonofobia associada. Dos sinais meníngeos, objetivou-se rigidez da nuca em 92,3% (n=24), sinal de Brudzinsky em 34,6% (n=9) e sinal de Kernig em 19,2% (n=5).

Epidemiologia

Relativamente ao contexto epidemiológico, a salientar 35,7% das crianças com infeção por EV com contacto com pessoas sintomáticas.

Da epidemiologia familiar, destacam-se sintomas respiratórios (EV=6, HPeV=1), febre (EV=3, HPeV=2) e dejeções diarreicas (EV=5) em familiares diretos (avós, pais, irmãos). Quanto à epidemiologia escolar, refere-se a presença de sintomatologia respiratória num caso com EV e o contacto com uma lactente com varicela num dos casos com VZV.

Os casos com HHV-6 e o de HSV-2 não apresentaram contexto epidemiológico.

Exames complementares de diagnóstico

Todos fizeram exames complementares de diagnóstico (figura 3 e tabela 2).

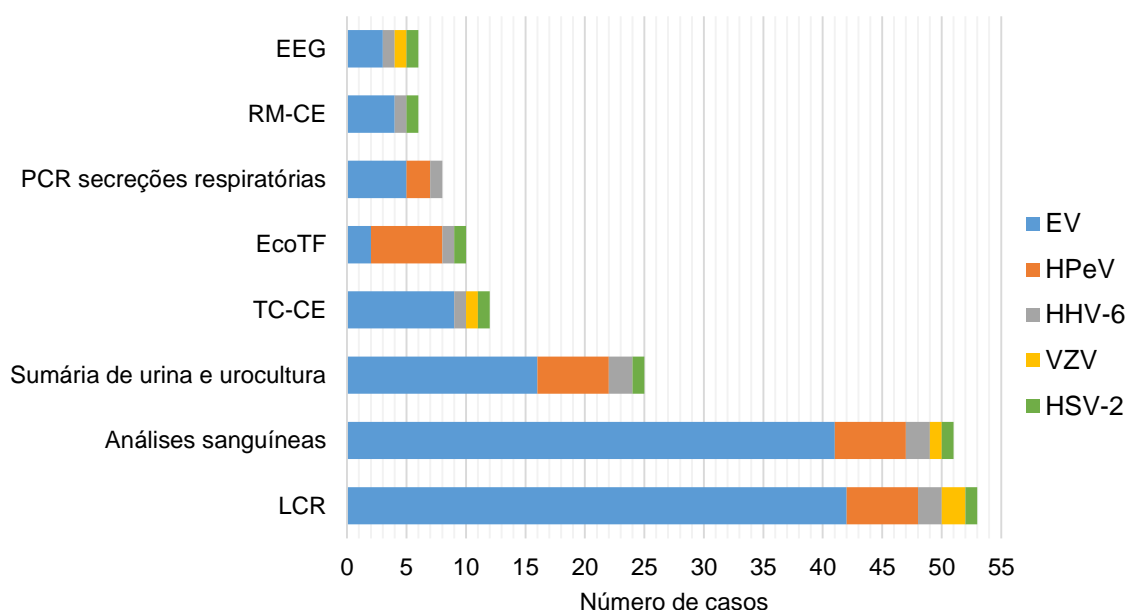


Figura 3. Distribuição dos exames complementares de diagnóstico realizados nos casos de infecção do SNC de etiologia vírica confirmados pelo painel síndromico de biologia molecular, durante o período do estudo (n=53).

Todos realizaram punção lombar, 66% (n=35) à data de admissão e 34% (n=18) no dia seguinte. O valor médio da glicorráquia foi de $2,97 \pm 0,62$ mmol/L, estando diminuída em 9,4% (n=5). Foi possível calcular a relação glicose LCR/plasma em 69,8% (n=37), sendo a média de $0,58 \pm 0,09$, com 21,6% (n=8) a apresentarem valores $< 0,5$. A mediana da proteinorráquia foi de 49,3 mg/dL (IQR 35,7), com um valor mínimo de 10 mg/dL e máximo de 159,7 mg/dL, estando os valores aumentados em 45,3% (n=24).

A análise da celularidade do LCR apresentou uma mediana de 40 células/mm³ (IQR 151), com um valor mínimo de 1 célula/mm³ e máximo de 2000 células/mm³. A pleocitose esteve presente em 38 (71,7%), dos quais 35 eram por EV, dois por VZV e um por HSV-2. Três apresentaram pleocitose > 1000 células/mm³. Relativamente ao predomínio de células, em 57,9% (n=22) constatou-se predomínio de mononucleares, em 34,2% (n=13) de polimorfonucleares e em 7,9% (n=3) não houve predomínio celular. A cultura de LCR foi negativa em todos.

Na figura 4 encontram-se alguns parâmetros analíticos do LCR analisados separadamente em RN e em lactentes, crianças ou adolescentes.

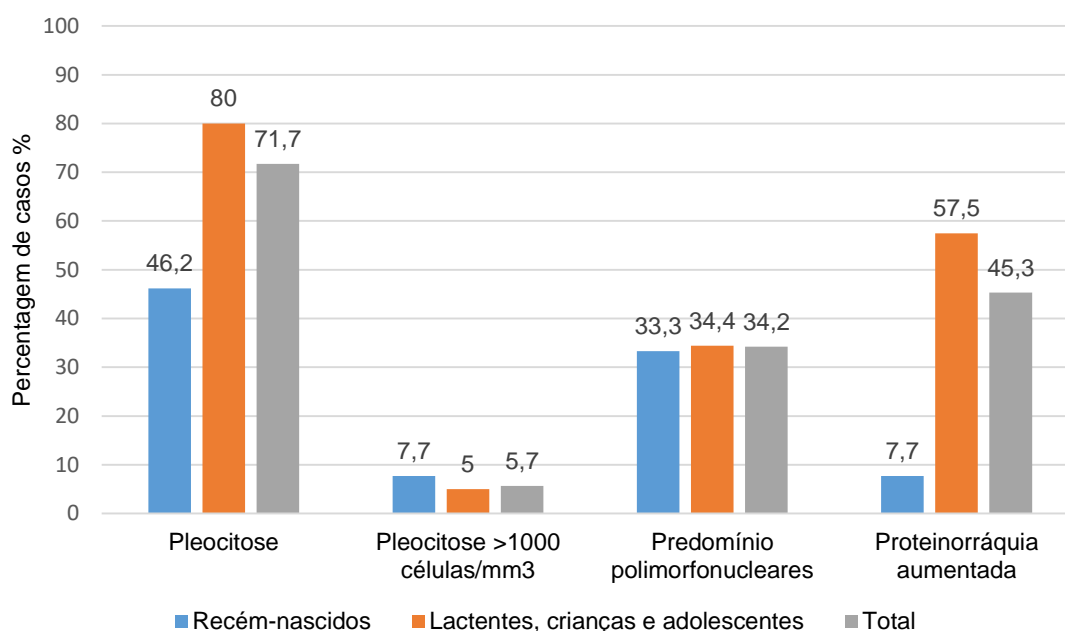


Figura 4. Parâmetros analíticos no LCR dos recém-nascidos (n=13) e lactentes, crianças e adolescentes (n=40) com infecção do SNC de etiologia vírica confirmados pelo painel sindrômico de biologia molecular, durante o período do estudo (n=53).

Foram realizadas análises sanguíneas em 96,2% (n=51). O valor médio da contagem dos leucócitos foi de $9225 \pm 4116/\mu\text{L}$ e de neutrófilos de $5837 \pm 3352/\mu\text{L}$. O valor mediano dos linfócitos foi de 1710 (IQR 2900), com valor mínimo de $750/\mu\text{L}$ e máximo de $8620/\mu\text{L}$.

O valor mediano da pCr foi de 0,59 mg/dL (IQR 1,14), com mínimo de 0,03 mg/dL e máximo de 6,26 mg/dL. Em 30,2% (n=16) apresentou valores superiores a 1 mg/dL.

Em 84,9% (n=45) foi realizada PCT, com valor mediano de 0,12 ng/mL (IQR 0,22), mínimo de 0,01 ng/mL e máximo de 8,1 ng/mL numa lactente de 4 meses com infecção por VZV.

A hemocultura foi realizada em 94,3% (n=50), todas com resultado negativo. Foi realizada sumária de urina e urocultura em 25 casos (47,2%), 22 (88%) dos quais com idade <3 meses, sendo positiva para *E. coli* numa RN de 21 dias com infecção do SNC a EV, a quem foi diagnosticada concomitantemente uma pielonefrite aguda.

Em oito casos foi realizado teste sindrômico por PCR das secreções respiratórias, identificando-se em três casos de infecção do SNC por EV e num caso por

HPeV a presença de rinovírus/EV. Num caso de HHV-6 identificou-se a presença de parainfluenza 3 e rinovírus/EV nas secreções respiratórias.

Em seis crianças foi realizado EEG, descrito como normal em quatro (EV=2, VZV=1 e HHV-6=1). Num caso por EV de uma criança de 14 meses descreveram-se alterações consistentes com encefalopatia. No caso com identificação de HSV-2 foi descrita atividade paroxística temporal mais evidente à esquerda.

Dos exames de imagem, em 12 casos efetuou-se TC-CE, apresentando edema cerebral difuso num caso por EV de um rapaz de 15 anos. Foram realizadas seis RM-CE, tendo-se registado lesões compatíveis com meningoencefalite num caso por EV e no caso por HSV-2. A EcoTF foi realizada em 10 casos, sem alterações a registar.

A tabela 2 discrimina os resultados por vírus identificado.

Tabela 2. Comparação em termos demográficos, de tratamento, evolução e valores de exames complementares de diagnóstico dos casos com infecção do SNC de etiologia vírica confirmados pelo painel sindrômico de biologia molecular, durante o período do estudo (n=53).

	EV (n=42) n (%)	HPeV (n=6) n (%)	HHV-6 (n=2) n (%)	VZV (n=2) n (%)	HSV-2 (n=1) n (%)
Demografia					
Sexo masculino	24 (57,1%)	6 (100%)	1 (50%)	1 (50%)	0
Idade <12 meses	17 (40,5%)	6 (100%)	2 (100%)	1 (50%)	1 (100%)
SANGUE	41 (97,6%)	6 (100%)	2 (100%)	1 (50%)	1 (100%)
Leucócitos (/ μ L)	10480 \pm 3513	3770 \pm 1113	3380 e 6690	6340	1780
Neutrófilos (/ μ L)	6654 \pm 3121	1750 \pm 1131	1170 e 1970	4750	6480
Linfócitos (/ μ L)	2070 (IQR 3265)	1307 \pm 452	1560 e 3690	1230	8620
Proteína C-reativa (mg/dL)	0,65 (IQR 1,19)	0,03 (IQR 0,44)	0,03 e 0,97	0,97	0,03
Procalcitonina (ng/mL)	0,09 (IQR 0,10)	0,25 \pm 0,10	0,26 e 8,10	8,10	0,16
LCR					
Colheita 1 ^{as} 24 horas	28 (66,7%)	4 (66,7%)	2 (100%)	2 (100%)	0 (0%)
Glicorráquia (mmol/L)	3,02 \pm 0,63	2,75 \pm 0,42	2,90 e 3,10	2,70 e 3,80	1,70
Relação glicose LCR/plasma	0,57 \pm 0,07(n=29)	0,63 \pm 0,13 (n=5)	0,79 (n=1)	0,72 (n=1)	0,36
RECÉM-NASCIDO	8 (19%)	3 (50%)	1 (50%)	-	1(100%)
Pleocitose	5	0	0	-	1
Predomínio mononucleares	3	-	-	-	1
Proteinorráquia aumentada	0	0	0	-	1
IDADE >28 dias	34 (81%)	3 (50%)	1 (50%)	2(100%)	-
Pleocitose	30	0	0	2	-
Predomínio mononucleares	17	-	-	1	-
Proteinorráquia aumentada	18	2	1	2	-
TRATAMENTO EMPÍRICO INICIAL					
Antibiótico	19 (45,2%)	6 (100%)	2 (100%)	1 (50%)	1 (100%)
Aciclovir	9 (21,4%)	1 (16,7%)	1 (50%)	2 (100%)	1 (100%)
DURAÇÃO DO INTERNAMENTO (dias)	1 (IQR 2)	4 \pm 2,10	2 e 4	3 e 10	29

* Análise estatística: As variáveis quantitativas foram analisadas com recurso a medidas de tendência central e dispersão. As variáveis qualitativas foram analisadas através de frequências absolutas e relativas.

Tratamento e evolução

Dos 53 casos, 30 (56,6%) iniciaram tratamento empírico. Verificou-se que, antes do teste sindrômico de PCR estar disponível 24 horas por dia todos os dias da semana, 79,2% (19/24) iniciaram tratamento empírico, enquanto que, após estar sempre disponível, 37,9% (11/29) iniciaram tratamento empírico, diferença esta com significado estatístico ($p=0,005$). Não houve diferença estatística na mediana de idades nos dois períodos ($p=0,317$).

O aciclovir foi iniciado em 14 casos (26,4%), em 13 em associação com antibioticoterapia. Em 11 dos casos (EV=9, HPeV=1 e HHV-6=1) foi suspenso após o resultado do teste sindrômico. Nos dois casos de VZV e no caso de HSV-2 foi usado como tratamento.

Foi iniciada antibioticoterapia em 29 casos (54,7%). Na tabela 3 encontra-se descrito o motivo de suspensão da mesma e a sua relação com resultados de exames complementares de diagnóstico.

Tabela 3. Motivo de suspensão da antibioticoterapia em relação com o vírus identificado e o resultado de exame complementares de diagnóstico (n=29).

Suspensão da antibioticoterapia	EV n=19	HPeV n=6	HHV-6 n=2	VZV n=1	HSV-2 n=1	Total (n=29) n (%)
PCR positiva para vírus	7	2	1	1	1	12 (41,4%)
Cultura de LCR negativa	7	0	0	0	0	7 (24,1%)
Hemocultura negativa	4	4	1	0	0	9 (31%)
Outro*	1	0	0	0	0	1 (3,4%)

* suspenso após completar tratamento para pielonefrite aguda.

A suspensão da antibioticoterapia foi adiada maioritariamente no grupo A: até resultados da cultura de LCR (57,1% grupo A e 42,9% grupo B) ou da hemocultura (100% grupo A, todos com idade <2 meses).

Apenas três crianças (5,7%), diagnosticadas com EV, tiveram internamento com duração inferior a 24 horas. A duração mediana de internamento foi de dois dias (IQR 3), com máximo de 29 dias, correspondente ao caso de uma RN de 17 dias diagnosticada com meningoencefalite a HSV-2.

Complicações

Surgiram complicações em nove casos, todos por EV. Seis crianças apresentaram como complicação síndrome pós-PL, com quadro clínico caracterizado por lombalgias, cefaleias e vômitos. Duas destas crianças foram reinternadas, ambas por um dia. Um RN de 26 dias com EV evoluiu para envolvimento sistêmico com choque, com necessidade de internamento em cuidados intensivos. Uma criança com infecção por EV complicou com edema cerebral, confirmado por TC-CE.

Destaca-se o diagnóstico de meningite e polirradiculite aguda atribuível a EV numa criança de 21 meses. Inicialmente apresentou febre e vômitos incoercíveis, seguido de aparecimento de exantema micropapular e, posteriormente, claudicação da marcha, tendo sido diagnosticado com sinovite transitória da anca. A irmã tinha sido diagnosticada na semana anterior com gastroenterite aguda (GEA). Ao décimo dia de doença, por agravamento do desequilíbrio na marcha e vômitos, com febre a espaçar, foi reobservado, sendo referenciado para a Neuropediatria. À observação salientava-se a presença de marcha de base alargada, com decomposição da volta e queda preferencial para trás, abolição do reflexo aquiliano esquerdo e hiporreflexia patelar ipsilateral, com assimetria clara dos reflexos miotáticos entre os membros inferiores (menos acentuados) e superiores. Realizou PL, que evidenciou pleocitose com predomínio de mononucleares, proteinorráquia aumentada e foi identificado EV. Durante o internamento realizou terapêutica de suporte com boa evolução clínica. Foi reavaliado um mês mais tarde em consulta de Neuropediatria, sem sequelas e com investigação para neuropatia periférica (anticorpos antigangliosídeos) negativa.

Falsos positivos e co-deteções pelo teste sindrómico

Durante o período de estudo houve um falso positivo do teste sindrómico, com identificação de HSV-2. Tratava-se de uma criança com 13 meses que recorreu ao SU de outro hospital com uma clínica caracterizada por vômitos, diarreia, dor abdominal, anorexia, convulsões tónico-clónicas generalizadas (total de seis) e noção de rigidez da nuca. Sem febre. Como contexto epidemiológico apresentava avó e tio com GEA. Fez TC-CE e PL (descrita como muito hemorrágica) e iniciou antibioticoterapia e aciclovir. Foi transferida para o HP-CHUC, com envio do LCR. O painel sindrómico foi positivo para HSV-2, sendo apenas mantido tratamento com aciclovir. Por posterior incongruência com o resultado da PCR para HSV no LCR realizada no outro hospital (negativa para HSV-1 e HSV-2) e por clínica pouco sugestiva de quadro de M/E, repetiu-se a PL, sendo o painel sindrómico e PCR específica para HSV negativos. Fez ainda

serologia para HSV, também negativa. Como a clínica era sugestiva de GEA realizou-se teste de antígenos nas fezes, positivo para norovírus, suspendendo o aciclovir. Considerou-se o diagnóstico mais provável de convulsões afebris benignas associadas à GEA (CABAGAL).

O caso da co-deteção de EV e HHV-6 correspondeu a uma criança de sete anos com um quadro clínico com quatro dias de evolução caracterizado por cefaleias sem resposta ao ibuprofeno. Recorreu ao SU por agravamento da cefaleia, com fotofobia e vômitos associados. Ao exame objetivo apresentava sinais meníngeos e presença de exantema micropapular nos membros superiores. Fez TC-CE, sem alterações significativas, e o LCR apresentava pleocitose (predomínio de células polimorfonucleares), proteinorráquia aumentada e identificação de EV e HHV-6 no LCR. Iniciou terapêutica de suporte, com boa evolução clínica, tendo alta no dia seguinte. Foi reavaliado após quatro dias, clinicamente assintomático.

Discussão

Neste estudo foram avaliados e caracterizados os casos de infecção do SNC de etiologia vírica em idade pediátrica diagnosticados através de um teste sintromico de PCR durante um período de 3,5 anos no HP-CHUC, englobando um total de 53 casos. No nosso estudo, verificamos que a etiologia vírica mais frequentemente associada a M/E foi o EV seguida de HPeV, semelhante a outros com incidências descritas entre 59 e 74,6% para EV e entre 12 e 30,5% para HPeV.^{2,11,16,17,21,28}

Demografia

No nosso estudo encontramos uma ligeira predominância do sexo masculino, também verificada noutras publicações, com 56,5%¹⁸ e 58%.¹⁰ Cerca de metade dos casos ocorreram em lactentes, sendo que noutros estudos esses valores foram ligeiramente superiores, rondando os 63%.^{18,29} Analisando separadamente, 59,5% dos casos de EV afetaram crianças do grupo B, não sendo concordante com a maioria dos estudos, com idades inferiores.^{2,18,29} Os casos de HPeV ocorreram abaixo dos três meses, semelhante ao descrito na literatura.^{2,11,30} O VZV foi detetado numa lactente de 4 meses e num adolescente de 17 anos, sendo que um estudo sobre complicações neurológicas por VZV reportou idades entre 4 meses e 16,5 anos.³¹ Para infeções primárias por HHV-6,²⁸ estão descritas idades inferiores a 2 anos e para M/E por HSV³² uma mediana de 19 dias, idêntico ao observado no nosso estudo.

Manifestações clínicas, exame objetivo e contexto epidemiológico

A febre foi a manifestação mais frequente (79,2%), à semelhança de outros estudos em que estava presente em 82%¹⁷ e 89,1%¹⁸ dos casos.

Um estudo espanhol sobre meningite por EV reportou, além da febre, a presença de vômitos em 63% e sintomas respiratórios em 19,5%.³³ Outro destacou a presença de contexto epidemiológico em 47,3%.³⁴ Dos 42 casos de infeções por EV no nosso estudo, 57,1% apresentaram vômitos, 23,8% sintomas respiratórios e 35,7% contexto epidemiológico.

Relativamente às infeções por HPeV, e semelhante ao encontrado no nosso estudo, um estudo britânico reportou a presença de irritabilidade em 42,9% e de prostração em 14,3% dos casos, não registando convulsões.³⁰

A M/E associada a VZV pode surgir associada a infecção primária (varicela) ou à sua reativação, no entanto em 50% ocorre sem exantema.⁴ No nosso estudo, ambos os casos apresentavam lesões. Verificou-se ainda num caso contexto escolar de varicela, tendo um estudo reportado que 55% das crianças têm habitualmente contexto de exposição a varicela.³¹

A infecção primária por HHV-6 cursa habitualmente com exantema súbito tipo roséola, semelhante ao descrito neste estudo, raramente acompanhado por doença do SNC.^{23,35}

Um estudo realizado em dois hospitais pediátricos de Utah demonstrou que nas infeções do SNC por HSV, 44% apresentaram febre e convulsões, 13% apneia e 6% dificuldade respiratória severa,³² sintomas apresentados pela RN com HSV-2 neste estudo.

Painel sindrómico de PCR no LCR

Numa abordagem inicial, a análise citoquímica do LCR pode auxiliar no enquadramento da infeção em bacteriana ou vírica, mas nem sempre é esclarecedor.³⁶ Um estudo realizado num hospital pediátrico de Los Angeles reportou, nas infeções do SNC de etiologia vírica, valores alterados de glicorráquia em 17,6%, de proteinorráquia em 51,8% e pleocitose em 54,4%,²⁹ achados semelhantes aos deste estudo à exceção da pleocitose que esteve presente em 71,7%, maioritariamente em crianças com infeção por EV. Na literatura é também relatado um predomínio de mononucleares nos casos de etiologia vírica,^{1,36} constatado em 57,9% dos nossos casos.

No entanto, para um diagnóstico etiológico definitivo são necessários métodos de microbiologia. A cultura de LCR é considerada o *gold standard* no diagnóstico de infeções bacterianas, com valores de sensibilidade a rondar os 80%, com possível diminuição se antibioticoterapia prévia, contaminação ou outros.^{3,8,9} Para o diagnóstico de infeções virais, o *gold standard* são os testes de PCR.³⁶ Os testes de PCR clássica são dirigidos a agentes específicos como EV, VZV ou HSV-1 e HSV-2, exigindo, portanto, um elevado nível de suspeita clínica para a sua correta seleção, algo que pode ser difícil pela natureza por vezes inespecífica da sintomatologia.^{3,6,36} Além disso, a obtenção dos resultados pode demorar entre várias horas a dias, particularmente se enviados para laboratórios de referência.^{3,12,36}

Na tentativa de ultrapassar estas limitações, surgiram os testes sindrómicos por *real-time* PCR, sendo o utilizado neste estudo o único aprovado pela FDA para uso no LCR.³⁶ Os valores de sensibilidade reportados para a maioria dos sete vírus presentes

estão compreendidos entre 86-100%, com os valores de especificidade a variar entre 95-100%.^{2,6,11-14,37}

De modo a avaliar o desempenho do teste sindrômico de PCR, vários estudos compararam os seus resultados com os de outros métodos disponíveis, como a PCR clássica.^{2,6,11-17} Destes estudos, analisando especificamente a etiologia vírica, um estudo multicêntrico reportou 9,6% de falsos positivos.² A correta identificação do microrganismo depende do processo de colheita, armazenamento, transporte e da preparação da amostra.^{2,5,23} A deteção de um vírus latente também pode ser causa possível de falsos positivos.^{23,38} O impacto destes resultados pode ser significativo, uma vez que podem potenciar terapêuticas e procedimentos prejudiciais e atrasar e/ou ocultar o diagnóstico final.^{5,7,38} Durante o nosso estudo registou-se um falso positivo para HSV-2, sugerido através do contexto clínico e pela realização de novos testes confirmatórios que se revelaram negativos, justificando a suspensão do tratamento com aciclovir.

Um resultado negativo também não exclui infeção, uma vez que existem microrganismos que não estão incluídos no teste, sendo fundamental o bom senso clínico. Além disso, os próprios agentes detetados pelo teste podem associar-se a falsos negativos, resultantes da perda de ácido nucleico durante a recolha, transporte e armazenamento incorreto da amostra ou da sua presença em muito baixas quantidades no LCR.^{2,7,23}

De destacar que os herpesvírus presentes neste teste, especialmente o HHV-6 e o CMV, são conhecidos por estabelecer latência, podendo a sua deteção representar uma infeção primária recente, uma reativação viral secundária ou a presença do vírus latente nas células do LCR.^{2,3} No caso do HHV-6, e na presença de pleocitose no LCR, pode ainda resultar de um fenómeno de integração cromossómica que ocorre em cerca de 1% da população e não se encontra associado a infeção ativa.^{35,39} A contaminação do LCR durante uma PL traumática pode também levar a um aumento das deteções de HHV-6.³ O teste sindrômico de PCR deteta tanto o HHV-6A como o HHV-6B, sendo o segundo causa comprovada de M/E.^{23,35,39} No nosso estudo, uma criança de 7 anos teve deteção simultânea de EV e HHV-6. Estudos anteriores reportaram co-deteções em 1-6% dos casos positivos, realçando a importância de interpretar estes resultados com precaução e, se necessário, efetuar a sua confirmação por métodos alternativos, imperando sempre o bom senso clínico.^{2,13,16,23}

O diagnóstico etiológico através deste teste torna-se assim uma ferramenta poderosa quando bem correlacionado com o contexto clínico, incluindo a história, o exame objetivo e os resultados de exames complementares de diagnóstico.⁵⁻⁷

Outros exames complementares de diagnóstico

Perante a suspeita de M/E, o hemograma com leucograma, a pCr e a PCT podem ser úteis mas não permitem diferenciar com segurança entre possíveis etiologias, sendo o LCR o principal exame de diagnóstico.¹

Num outro estudo constatou-se que três casos (8%) de M/E vírica apresentavam co-infecção bacteriana, dois dos quais infeção urinária.¹⁷ De modo semelhante, no nosso estudo foi diagnosticada uma pielonefrite aguda a *E. coli* num caso de M/E por EV.

Um estudo americano reportou que em 32,2% foi detetada a presença concomitante de EV no teste sindrómico do LCR e de rinovírus/EV no teste sindrómico das secreções respiratórias.³⁴ Destaca-se que, devido à semelhança genética entre EV e rinovírus, não é possível a sua distinção com precisão por estes testes.²⁷ No nosso estudo, em quatro casos foi detetado rinovírus/EV nas secreções respiratórias, em infeções por EV e por HPeV, este último geneticamente semelhante aos enterovírus.²³

Relativamente a outros exames, o EEG é um marcador pouco específico de disfunção cerebral, podendo observar-se apenas lentificação focal ou difusa. A exceção é a encefalite herpética, em que cerca de 75% dos doentes apresentam lentificação focal temporal e atividade periódica lateralizada no EEG.²⁶ No nosso estudo, foi observada atividade paroxística temporal mais evidente à esquerda no EEG do caso de HSV-2, sendo que num caso de EV objetivaram-se alterações eletroencefalográficas consistentes com encefalopatia.

Nos casos de encefalite, a TC-CE é pouco sensível e específica, pelo que é utilizada apenas na indisponibilidade de RM-CE, a qual apresenta maior sensibilidade e especificidade, apesar de um resultado normal não excluir o diagnóstico.²⁶ Em casos de HSV, a RM-CE pode apresentar lesões com hipersinal T2 nos lobos temporais e noutras estruturas do sistema límbico.²⁶ No nosso estudo, das 12 TC-CE realizadas, apenas um caso de EV apresentou edema cerebral, e das seis RM-CE verificou-se a presença de lesões compatíveis com meningoencefalite num caso de EV e no caso de HSV-2.

Tratamento e evolução: a utilidade do painel sindrómico

A maioria das M/E víricas são autolimitadas e tem um tratamento essencialmente de suporte, à exceção dos vírus HSV e VZV para os quais existe tratamento específico com aciclovir.^{4,18} Tendo em conta o prognóstico desfavorável das M/E bacterianas e associadas a HSV, preconiza-se que, em casos suspeitos, se deva iniciar logo que possível terapêutica antibiótica e aciclovir.^{2,17}

Um estudo alemão recente comparou o uso de aciclovir e de antibiótico antes e após a implementação do teste sindrómico de PCR para M/E na população pediátrica, concluindo que a duração do aciclovir e da antibioticoterapia foi inferior após a implementação do teste.¹⁸ Outros defendem que, pela sua sensibilidade, um resultado positivo para vírus no contexto clínico correto deve permitir a interrupção da antibioticoterapia.^{20,40} Da mesma forma, é também aceitável a suspensão de aciclovir perante a identificação de qualquer agente que não HSV ou VZV. Uma justificação apontada para a não interrupção das terapêuticas empíricas prende-se com o facto de o painel sindrómico ser de implementação recente e, por conseguinte, haver uma falta de conhecimento e/ou compreensão da sua tecnologia por parte dos clínicos.¹⁸⁻²⁰ Neste estudo foi iniciada antibioticoterapia em 29 casos, a qual foi interrompida em 41,4% após o resultado da PCR positiva para vírus. A manutenção da antibioticoterapia até cultura de LCR ou hemocultura negativas ocorreu principalmente no grupo A, uma faixa etária em que o quadro clínico pode ser mais preocupante e o tratamento mais conservador.^{18,19} Neste estudo, o aciclovir foi iniciado em 14 casos, tendo sido usado para tratamento apenas nos casos de VZV e HSV.

A disponibilidade do teste 24 horas por dia todos os dias da semana desde 2018 teve impacto na abordagem terapêutica, menos conservadora e mais expectante nos casos não urgentes. De facto, a instituição de tratamento empírico antes do conhecimento do resultado de painel sindrómico diminuiu de forma estatisticamente significativa a partir de 2018, verificando-se em 37,9% dos casos, um valor bastante inferior ao observado antes de 2018 de 79,2%.

Num estudo alemão dirigido à população pediátrica, onde estavam representadas todas as etiologias de M/E, verificou-se uma duração de internamento mediana de 5 dias.¹⁸ Num estudo realizado num hospital pediátrico australiano, a mediana de internamento registada após implementação do painel sindrómico para M/E foi de 2 dias.²¹ Já um estudo americano demonstrou que 20% dos casos de EV apresentaram duração de internamento inferior a 24 horas.¹⁷ No nosso estudo, a

mediana do tempo de internamento foi de dois dias, com três casos de infeção por EV (5,8%) a apresentarem hospitalização inferior a 24 horas.

Limitações

Uma possível limitação deste estudo é a sua natureza retrospectiva, limitando a informação obténivel pela variabilidade das abordagens e registos dos diferentes clínicos, não sendo sempre possível esclarecer todas as variáveis estudadas.

Atendendo a que durante o período do estudo não se procedeu, por rotina, à realização de PCR clássica para confirmação dos resultados, a avaliação da taxa de falsos positivos e de falsos negativos tornou-se inviável.

São necessários mais estudos de natureza multicêntrica e prospetiva de forma a avaliar a implementação do teste sindrómico por PCR na abordagem da população pediátrica com suspeita de M/E, permitindo assim uma melhor comparação entre diferentes etiologias.

Conclusão

A maioria das M/E víricas são autolimitadas, com tratamento essencialmente de suporte. O diagnóstico etiológico é complexo e desafiante, não só pela natureza muitas vezes inespecífica da clínica apresentada, como também pela variabilidade das alterações no LCR, que nem sempre são esclarecedoras. As técnicas de biologia molecular vieram ultrapassar esta dificuldade, permitindo o estabelecimento de um diagnóstico etiológico definitivo. Destas, o painel sindrómico por PCR prima pela sua facilidade de uso e permite um rápido diagnóstico de 14 dos microrganismos mais frequentemente associados a M/E, recorrendo apenas a uma pequena quantidade de LCR. Com uma especificidade e sensibilidade elevadas, sempre correlacionando com a sintomatologia, permite otimizar a orientação dos doentes em termos de terapêutica, diminuição do tempo de internamento e conseqüentemente de custos hospitalares, com grande impacto positivo na atividade clínica.

Agradecimentos

Agradeço à Dra. Ana Brett pela exímia orientação desde o momento da sugestão do tema até a sua concretização. Muito grata pela sua paciência, permanente disponibilidade, conhecimento, espírito crítico e incentivo que foram decisivos na elaboração deste trabalho.

Agradeço à Prof. Doutora Fernanda Rodrigues pela generosidade e rigor com que acompanhou este trabalho e pela pertinência das suas sugestões e correções.

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

À Isabel e ao António pela colaboração na realização da base de dados e por terem tão prontamente esclarecido as minhas dúvidas.

Aos meus pais, a minha enorme gratidão pelo apoio incondicional, incentivos constantes, paciência e por sempre me permitirem seguir os meus sonhos. Aos meus avós e ao meu padrinho pela contribuição na minha educação, por me verem crescer.

À Beatriz, por ter sido o meu abraço-casa em Coimbra por 5 anos e este ano mesmo longe continuar a ser incansável.

Ao Mauro e à Teresa por toda a orientação ao longo deste percurso, pelos seus preciosos conselhos e por entenderem o que é preciso para abraçar esta viagem.

À Mariana e à Lucinda que, entre lágrimas e gargalhadas tornaram esta caminhada mais bonita.

Referências

1. Oliveira G, Saraiva J, Brett A. Meningite e meningoencefalite. In: Lições de Pediatria Vol I e II. Imprensa da Universidade de Coimbra; 2017. p. 161–73.
2. Leber AL, Everhart K, Balada-Llasat JM, Cullison J, Daly J, Holt S, et al. Multicenter evaluation of biofire filmarray meningitis/encephalitis panel for detection of bacteria, viruses, and yeast in cerebrospinal fluid specimens. *J Clin Microbiol.* 2016;54(9):2251–61.
3. Gutierrez M, Emmanuel PJ. Expanding Molecular Diagnostics for Central Nervous System Infections. Vol. 65, *Advances in Pediatrics*. Academic Press Inc.; 2018. p. 209–27.
4. McGill F, Griffiths MJ, Solomon T. Viral meningitis: Current issues in diagnosis and treatment. Vol. 30, *Current Opinion in Infectious Diseases*. Lippincott Williams and Wilkins; 2017. p. 248–56.
5. Dien Bard J, Alby K. Point-Counterpoint: Meningitis/Encephalitis Syndromic Testing in the Clinical Laboratory. *J Clin Microbiol.* 2018;56(4).
6. Messacar K, Breazeale G, Robinson CC, Dominguez SR. Potential clinical impact of the film array meningitis encephalitis panel in children with suspected central nervous system infections. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2016;86(1):118–20.
7. Hanson KE. The First Fully Automated Molecular Diagnostic Panel for Meningitis and Encephalitis: How Well Does It Perform, and When Should It Be Used? *J Clin Microbiol.* 2016;54(9):2222–4.
8. Arora HS, Asmar BI, Salimnia H, Agarwal P, Chawla S, Abdel-Haq N. Enhanced Identification of Group B Streptococcus and Escherichia coli in Young Infants with Meningitis Using the Biofire Filmarray Meningitis/Encephalitis Panel. *Pediatr Infect Dis J.* 2017;36(7):685–7.
9. Wootton SH, Aguilera E, Salazar L, Hemmert AC, Hasbun R. Enhancing pathogen identification in patients with meningitis and a negative Gram stain using the BioFire FilmArray(®) Meningitis/Encephalitis panel. *Ann Clin Microbiol Antimicrob.* 2016;15(1):26.
10. Duff S, Hasbun R, Ginocchio CC, Balada-Llasat JM, Zimmer L, Bozzette SA. Economic analysis of rapid multiplex polymerase chain reaction testing for meningitis/encephalitis in pediatric patients. *Future Microbiol.* 2018;13(6):617–29.
11. Graf EH, Farquharson MV, Cárdenas AM. Comparative evaluation of the FilmArray meningitis/encephalitis molecular panel in a pediatric population. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2017;87(1):92–4.

12. Piccirilli G, Chiereghin A, Gabrielli L, Giannella M, Squarzoni D, Turello G, et al. Infectious meningitis/encephalitis: Evaluation of a rapid and fully automated multiplex PCR in the microbiological diagnostic workup. *New Microbiol.* 2018;41(2):118–25.
13. Liesman RM, Strasburg AP, Heitman AK, Theel ES, Patel R, Binnicker MJ. Evaluation of a Commercial Multiplex Molecular Panel for Diagnosis of Infectious Meningitis and Encephalitis. *J Clin Microbiol.* 2018;56(4).
14. Radmard S, Reid S, Ciryam P, Boubour A, Ho N, Zucker J, et al. Clinical Utilization of the FilmArray Meningitis/Encephalitis (ME) Multiplex Polymerase Chain Reaction (PCR) Assay. *Front Neurol.* 2019;10:281.
15. Naccache SN, Lustestica M, Fahit M, Mestas J, Dien Bard J. One Year in the Life of a Rapid Syndromic Panel for Meningitis/Encephalitis: a Pediatric Tertiary Care Facility's Experience. *J Clin Microbiol.* 2018;56(5).
16. Boudet A, Pantel A, Carles M-J, Boclé H, Charachon S, Enault C, et al. A review of a 13-month period of FilmArray Meningitis/Encephalitis panel implementation as a first-line diagnosis tool at a university hospital. *PLoS One.* 2019;14(10):e0223887.
17. Blaschke AJ, Holmberg KM, Daly JA, Leber AL, Dien Bard J, Korgenski EK, et al. Retrospective evaluation of infants aged 1 to 60 days with residual cerebrospinal fluid (CSF) tested using the FilmArray meningitis/encephalitis (ME) panel. *J Clin Microbiol.* 2018;56(7).
18. Hagen A, Eichinger A, Meyer-Buehn M, Schober T, Huebner J. Comparison of antibiotic and acyclovir usage before and after the implementation of an on-site FilmArray meningitis/encephalitis panel in an academic tertiary pediatric hospital: a retrospective observational study. *BMC Pediatr.* 2020;20(1):56.
19. Evans M, Merkel KG, Harder J, Rose DT. Impact of the implementation of a rapid meningitis/encephalitis multiplex polymerase chain reaction panel on IV acyclovir duration: multicenter, retrospective cohort of adult and pediatric patients. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2020;96(2):114935.
20. Chang D, Okulicz JF, Nielsen LE, White BK. A Tertiary Care Center's Experience with Novel Molecular Meningitis/Encephalitis Diagnostics and Implementation with Antimicrobial Stewardship. *Mil Med.* 2018;183(1–2):e24–7.
21. O'Brien MP, Francis JR, Marr IM, Baird RW. Impact of Cerebrospinal Fluid Multiplex Assay on Diagnosis and Outcomes of Central Nervous System Infections in Children: A Before and After Cohort Study. *Pediatr Infect Dis J.* 2018;37(9):868–71.
22. Serviço de Planeamento e Controlo de Gestão do CHUC-TB e SONHO.

23. BioFire® FilmArray ® Meningitis/Encephalitis (ME) Panel Instruction Booklet. 2017.
24. Prata F, Cabral M, Ventura L, Ferreira PR, Brito MJ. MENINGITES AGUDAS BACTERIANAS Recomendações da Sociedade de Infecçologia Pediátrica e da Sociedade de Cuidados Intensivos Pediátricos da SPP.
25. Oliveira G, Saraiva J, Cancelinha C. Meios complementares de diagnóstico em Pediatria. In: Lições de Pediatria Vol I e II. Imprensa da Universidade de Coimbra; 2017. p. 71–83.
26. SOCIEDADE PORTUGUESA DE PEDIATRIA ENCEFALITES PROTOCOLO DA SOCIEDADE DE INFECCIOLOGIA PEDIÁTRICA DA SPP E SOCIEDADE PORTUGUESA DE NEUROPEDIATRIA.
27. BioFire® FilmArray ® Respiratory Panel (RP2) Panel Instruction Booklet. 2020.
28. Lumley SF, Pritchard D, Dutta A, Matthews PC, Cann K. Multiplex PCR reveals high prevalence of enterovirus and HHV6 in acellular paediatric cerebrospinal fluid samples. Vol. 77, *Journal of Infection*. W.B. Saunders Ltd; 2018. p. 249–57.
29. Precit MR, Yee R, Pandey U, Fahit M, Pool C, Naccache SN, et al. Cerebrospinal Fluid Findings are Poor Predictors of Appropriate FilmArray Meningitis/Encephalitis Panel Utilization in Pediatric Patients. *J Clin Microbiol*. 2019.
30. 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):1523–9.
31. Science M, Macgregor D, Richardson SE, Mahant S, Tran D, Bitnun A. Central nervous system complications of varicella-zoster virus. *J Pediatr*. 2014;165(4):779–85.
32. Curfman AL, Glissmeyer EW, Ahmad FA, Korgenski EK, Blaschke AJ, Byington CL, et al. Initial presentation of neonatal herpes simplex virus infection. *J Pediatr*. 2016;172:121-126.e1.
33. Menasalvas-Ruiz AI, Salvador-García C, Moreno-Docón A, Alfayate-Miguélez S, Pérez Cánovas C, Sánchez-Solís 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.
34. 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*. 2020;26(1):14–

- 22.
35. Ward KN. Child and adult forms of human herpesvirus 6 encephalitis: looking back, looking forward. *Curr Opin Neurol*. 2014;27(3):349–55.
 36. Buchan BW. Avoiding the Headache: Laboratory Considerations for Implementation, Utilization, and Interpretation of Multiplex Molecular Panels for the Diagnosis of Meningitis and Encephalitis, Part I. *Clin Microbiol Newsl*. 2018;40(14):115–21.
 37. Hanson KE, Slechta ES, Killpack JA, Heyrend C, Lunt T, Daly JA, et al. Preclinical Assessment of a Fully Automated Multiplex PCR Panel for Detection of Central Nervous System Pathogens. *J Clin Microbiol*. 2016;54(3):785–7.
 38. Buchan BW. Avoiding the Headache: Laboratory Considerations for Implementation, Utilization, and Interpretation of Multiplex Molecular Panels for the Diagnosis of Meningitis and Encephalitis, Part II. *Clin Microbiol Newsl*. 2018;40(15):123–7.
 39. Green DA, Pereira M, Miko B, Radmard S, Whittier S, Thakur K. Clinical Significance of Human Herpesvirus 6 Positivity on the FilmArray Meningitis/Encephalitis Panel. Vol. 67, *Clinical Infectious Diseases*. Oxford University Press; 2018. p. 1125–8.
 40. Soucek DK, Dumkow LE, VanLangen KM, Jameson AP. Cost Justification of the BioFire FilmArray Meningitis/Encephalitis Panel Versus Standard of Care for Diagnosing Meningitis in a Community Hospital. *J Pharm Pract*. 2019;32(1):36–40.