

Ana Rita da Silva Moreira

A infecção por Enterovírus: Epidemiologia e diagnóstico molecular

Universidade Fernando Pessoa

Faculdade Ciências da Saúde

Porto, 2021

Ana Rita da Silva Moreira

A infecção por Enterovírus: Epidemiologia e diagnóstico molecular

Universidade Fernando Pessoa

Faculdade Ciências da Saúde

Porto, 2021

Ana Rita da Silva Moreira

A infecção por Enterovírus: Epidemiologia e diagnóstico molecular

Ana Rita da Silva Moreira

Trabalho apresentado à Universidade Fernando Pessoa como parte dos requisitos para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas, sob a orientação do Prof. Doutor José Manuel Cabeda

Resumo

O enterovírus é um vírus de RNA de cadeia simples, que pertence a família dos picornavírus. Este grupo de vírus inclui inúmeras espécies e subtipos virais. As infecções provocadas por enterovírus são sobretudo mais frequentes em períodos com temperatura amena, como as estações do verão e outono. Deste modo são observados picos das distintas doenças provocadas por enterovírus, sobretudo em climas amenos. As infecções por enterovírus dão origem a múltiplas patologias, afetando sobretudo a população infantil. A resolução de muitas destas doenças provocadas por enterovírus é espontânea, mas ocorrem casos de gravidade clínica significativa que podem mesmo ser fatais.

Neste estudo, além da descrição de patologias provocadas por enterovírus, são descritos distintos tratamentos para as diferentes espécies de enterovírus. Foram retratadas distintas técnicas de diagnóstico molecular, evidenciando-se o Multiplex PCR e o Nested PCR. Sendo que um bom diagnóstico nestas infecções é fundamental, uma vez que muitas destas patologias provocadas por enterovírus não necessitam de hospitalização.

Palavras-chave: Enterovírus, Técnicas de diagnóstico, Patologias, Epidemiologia

Abstract

Enterovirus is a group of single-stranded RNA virus, that is part of the picornavirus family. Enteroviruses are divided into numerous distinctive species and different subtypes. Infections caused by enterovirus are most frequent during mild temperature seasons, like summer and autumn. Accordingly, there are a noticeable peak of enterovirus associated illnesses especially in mild weather seasons. Enterovirus infections can cause multiple illnesses affecting mostly the younger population. In most cases, these illnesses are self-limiting and spontaneously resolve without the need for clinical intervention but in a minority of cases they can cause clinical relevant situations that may even turn fatal. In the present study, in addition to the description enterovirus infection associated disease, we also describe treatments options available for the different enterovirus species. Additionally, as a sensitive, specific and rapid diagnosis of these infections is vital, considering that most of the illnesses caused by the enterovirus don't require hospitalization. Various molecular diagnosis techniques are described with emphasis, in multiplex PCR and Nested PCR.

Keywords: Enterovirus, Diagnostic techniques, Pathologies, Epidemiology

Agradecimentos

Em primeiro lugar, um agradecimento muito especial aos meus pais por todo o apoio e esforço que fizeram durante estes 5 anos. Um obrigado também à minha irmã pela paciência e apoio neste percurso.

A toda a minha família, avós, padrinhos e tios um obrigado especial, pelo carinho.

À Ana e a Francisca pelo companheirismo durante estes 5 anos, que tiveram momentos maravilhosos, mas também momentos mais difíceis, mas que estiveram sempre lá para me apoiar.

Ao meu orientador Professor Doutor José Cabeda, por toda a dedicação, disponibilidade e apoio durante a elaboração deste trabalho.

Obrigado a todos os professores e colegas que fizeram parte desta caminhada de 5 anos.

Índice

I. Introdução	1
II. Desenvolvimento	3
1. Vírus	3
2. Enterovírus	5
2.1. Proteínas virais.....	5
2.2. Classificação dos Enterovírus.....	6
2.2.1 Variabilidade genética.....	6
2.2.2 Espécies de Enterovírus	7
2.2.2.1 Enterovírus A-L	7
2.2.2.2 Rinovírus A-C	11
2.2.3 Replicação viral.....	13
3. Epidemiologia	17
3.1. Poliovírus.....	17
3.2. Enterovírus A71.....	18
3.3. Enterovírus D68	19
3.4. Coxsackievírus.....	20
3.5. Echovírus.....	21
4. Patologias	22
4.1. Encefalite	22
4.2. Doença mão pé boca	22
4.3. Herpangina.....	23
4.4. Febre aftosa	23
4.5. Miocardite enteroviral.....	24
4.6. Mielite flácida aguda.....	24
4.7. Pleurodínia	25
4.8. Sépsis Neonatal.....	25
4.9. Conjuntivite hemorrágica	25

4.10.	Poliomielite.....	26
4.11.	Meningite	28
5.	Transmissão	29
5.1.	Aerossóis.....	29
5.2.	Contacto direto	30
5.3.	Contacto indireto	30
6.	Tratamento	31
6.1.	Medidas de prevenção	31
6.2.	Vacinas	31
6.3.	Inibidores do ciclo de vida	32
6.4.	Fármacos.....	33
7.	Diagnóstico molecular	33
7.1.	PCR / RT-PCR	34
7.1.1	RT-qPCR.....	35
7.2.	Nested PCR.....	36
7.3.	Multiplex PCR.....	36
III.	Discussão	38
IV.	Conclusão	39
V.	Bibliografia	41

Índice de Figuras

Figura 1- A estrutura do virião, representado pelas três proteínas estruturais (VP1-VP3) (adaptado de Yuan <i>et al.</i> , 2018).....	5
Figura 2- Ciclo de replicação do Enterovírus (adaptado de Elrick <i>et al.</i> , 2021)	14
Figura 3- Organização do genoma de picornavirus, representação da VPg e da cauda poli-A (adaptado de Cifunte e Moratorio, 2019)	15

Índice de Tabelas

Tabela 1- Enterovírus com capacidade de infetar seres humanos	6
Tabela 2- Diferentes espécies de Enterovírus de A a L e respectivos serotipos de acordo com o ICTV (ICTV, 2020)	8
Tabela 3- Diferentes espécies de Rinovírus de A a C e respectivos serotipos de acordo com o ICTV (ICTV, 2020).....	12

Lista de Abreviaturas

CV– Coxsackievirus

DNA – Ácido desoxirribonucleico

E – Echovirus

ELISA – Ensaio de imunoabsorção enzimática (do inglês Enzyme Linked Immunosorbent Assay)

EV – Enterovírus

FcRN – Recetor Fc neonatal

HFMD – Doença da Mão, Pé e Boca (do inglês Hand, Foot and Mouth Disease)

ICAM – Molécula de adesão Intercelular (do inglês Forced Vital Capacity)

ICTV– Comitê internacional de taxonomia de vírus (do inglês International Committee on Taxonomy of Viruses)

LCR – Líquido cefalorraquidiano

LDL – Lipoproteína de baixa densidade

MFA – Mielite flácida aguda

PCR - Reação em cadeia da polimerase (do inglês Polymerase chain reaction)

PSGL-1 – Ligante da glicoproteína seletina P (do inglês P-selectin glycoprotein ligand-1)

PV – Poliovírus

RNA – Ácido Ribonucleico (do inglês Ribonucleic Acid)

RV– Rinovírus

RT-PCR – Transcriptase reversa seguida de Reação em cadeia da polimerase (do inglês Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction)

SNC – Sistema nervoso central

UTR – Região não traduzida (do inglês Untranslated Region)

VP – Proteína viral

VPg – Proteína associada ao genoma (do inglês Viral Protein genome-linked)

I. Introdução

Os Enterovírus são vírus da família *Picornaviridae*, de dimensão pequena (o nome picornavírus resulta da combinação de pico+RNA+vírus) com uma cadeia de RNA simples de polaridade positiva, envolto numa cápside icosaédrica e isento de envelope. O genoma viral apresenta um comprimento total de cerca de 7,5 kb incluindo uma região 5' não traduzida (UTR) composta por 750 nucleótidos e uma região 3' não traduzida com 70 a 100 nucleótidos. Estes vírus apresentam-se resistentes a desinfetantes, bem como a condições ambientais adversas diversas, já que possuem capacidade de suportar a salinidade e também são resistentes a alterações de temperaturas (Chen *et al.*, 2020; Richter *et al.*, 2019; Brown *et al.*, 2020).

A denominação de Enterovírus deriva de “enteron” que significa intestino, local onde este vírus se replica. Este vírus é classificado em 15 espécies distintas: Enterovírus de A a L e Rinovírus de A a C de acordo com propriedades genómicas e biológicas. Porém apenas os Enterovírus classificados de A a D e os Rinovírus classificados de A a C têm a capacidade de infetar humanos. Os restantes oito Enterovírus (os Enterovírus classificados de E a L) têm por isso tropismo exclusivamente para espécies animais que não o Homem (B'Krong *et al.*, 2018; Peng *et al.*, 2016).

Os Enterovírus provocam cerca de um bilião de infeções durante um ano na população humana mundial, sendo os indivíduos em idade pediátrica os mais afetadas com estas infeções. Na larga maioria dos casos, as infeções por Enterovírus apresentam-se como assintomáticas. Existem contudo infeções por enterovírus que causam quadros clínicos de natureza e gravidade tão variáveis como dor de cabeça, dor de garganta, vômitos, febre, mas também patologias como a poliomielite, síndrome mão-pé-boca, doenças respiratórias, febre aftosa, doença paralítica, entre outras (Good *et al.*, 2018; Toczyłowski *et al.*, 2020; Taravilla *et al.*, 2019).

Os Enterovírus têm uma maior prevalência durante o período de verão-outono, contudo há casos descritos durante todo o ano e distribuídos por todo o mundo (Toczyłowski *et al.*, 2020; Chen *et al.*, 2020). Dos distintos Enterovírus há vários que podem originar o desenvolvimento de uma meningite asséptica podendo evoluir para encefalite mais

gravosa. Este tipo de Enterovírus são patogéneos neurotrópicos como por exemplo o vírus causador de poliomielite. A via fecal-oral é a via de entrada mais frequente deste vírus no organismo. Resistindo ao pH ácido, é estável em todo o trato gastrointestinal, nele se replica, o que lhe permite atingir outros órgãos e produzir ciclos prolongados de excreção, mesmo quando a infecção é assintomática. Existem contudo alguns casos de enterovírus sensíveis ao pH ácido como o Enterovírus D68 (Chen *et al.*, 2020). Os Enterovírus também se podem replicar no trato respiratório e noutros tecidos como o tecido nervoso e os músculos, sendo nestes casos responsáveis por doenças potencialmente graves afetando estes órgãos e podendo ocasionar paralisias várias (Chen *et al.*, 2020). A transmissão também pode ocorrer pela via transplacentária (de Crom *et al.*, 2016).

O genoma dos Enterovírus codifica uma poliproteína que é clivada proteoliticamente por uma protease viral, dando origem a duas proteínas não estruturais P2 (2A-2C) e P3 (3A-3D) e proteínas estruturais denominadas de P1 (VP1-VP4) (Puenpa *et al.*, 2019).

A infecção por parte do Enterovírus é altamente infecciosa, e bastante frequente em crianças pequenas e recém-nascidos, sendo por esse motivo a população pediátrica é a mais afetada por estas infeções. Com efeito, segundo a organização mundial de saúde cerca de 70% das infeções por Enterovírus afetam crianças com menos de 10 anos de idade (de Crom *et al.*, 2016; Wells e Coyne, 2019).

Apesar de as infeções por Enterovírus serem frequentes (sobretudo em crianças), o facto de a maioria das infeções por Enterovírus originarem situações clínicas assintomáticas, auto-resolúveis e de baixa gravidade tem levado a que, em Portugal as infeções provocadas por Enterovírus sejam pouco estudadas. Com o presente trabalho pretende-se assim contribuir para a sistematização do conhecimento disponível sobre a epidemiologia dos distintos enterovírus em todo o mundo, assim como a sua distribuição geográfica, tendo sido definidos como objetivos específicos:

- Caracterizar a sazonalidade dos enterovírus e descrição de surtos ocorridos;
- Caracterização de distintas doenças causadas por enterovírus;
- Descrição de distintos métodos de diagnóstico molecular usado a técnica de PCR para a deteção e diagnóstico de Infeções por Enterovírus;

II. Desenvolvimento

1. Vírus

Dimitri Ivanowsky foi um cientista russo, que se debruçou extensamente no estudo da doença do mosaico nas plantas em geral e nas folhas do tabaco em particular, publicou resultados em 1892 que iriam revolucionar não apenas o conhecimento sobre esta doença, mas também o conhecimento sobre a diversidade do mundo biológico. Ivanowsky concluiu que mesmo após macerar as folhas do tabaco e fazer passar o suco das plantas, o agente causador desta doença (que hoje chamamos genericamente de vírus) conseguia passar pelo filtro utilizado. Demonstrou assim que o filtro chamado de velas de Chamberland, que apresentava poros muito pequenos e que eram capazes de reter bactérias, não conseguia reter estes pequenos microrganismos que concluíam teria uma dimensão inferior à das bactérias. Por este motivo, Ivanowsky denominou estes agentes, de agentes infecciosos filtráveis. No ano de 1898, Martinus Beijerinck observou que preparações diluídas de folhas de tabaco infetadas tinham a capacidade de infetar folhas sãs, concluindo assim que o agente filtrável, que continha estes pequenos microrganismos tinham a capacidade de se multiplicar e infetar novas folhas. Verificou ainda que esta replicação só acontecia em células vivas, uma propriedade que também as diferenciava das bactérias. Este cientista denominou este agente de *contagium vivum fluidum*. Hoje em dia denominamos genericamente todos estes agentes como vírus, os quais são pequenos agentes infecciosos, de tamanho submicroscópico, e que são capazes de provocar uma nova infecção desde que haja vida no tecido a infetar (Lecoq, H. 2001; Ferreira *et al*, 2010).

Estes pequenos agentes patogénicos têm tamanhos compreendidos entre os 20 e os 400nm, pelo que apenas são visíveis quando observados com recurso a microscopia eletrónica. Os vírus podem ter no seu genoma moléculas de RNA ou DNA, de cadeia simples ou dupla, em torno do seu material genético apresentam uma cápside de natureza proteica. Os vírus podem ainda apresentar ou não um envelope. Trata-se de um componente de natureza lipídica, muitas vezes originário da membrana celular da célula onde foram produzidos. A presença de envelope pode constituir uma vantagem significativa para o vírus, já que, esta teve origem na membrana da célula do hospedeiro, a sua presença no exterior da estrutura vírica permite que as proteínas víricas da cápside

estejam camufladas do sistema imunológico do hospedeiro, escapando assim do sistema de defesa do hospedeiro. Desta forma, o vírus será mais dificilmente reconhecido como um elemento estranho por parte do sistema imunológico do organismo infetado, facilitando o escape viral às defesas imunológicas de cada organismo (Ferreira *et al*, 2010).

Os vírus são parasitas intracelulares obrigatórios (Ferreira, 2010). Com efeito, para que um vírus se consiga replicar, ele necessita de parasitar uma célula hospedeira uma vez que não possui a maquinaria enzimática para realizar a replicação do seu material genético ou para a transcrição e tradução da informação nele contida. Para o vírus ganhar acesso ao interior da célula alvo, necessita de realizar uma ligação específica às células do hospedeiro, ou seja, necessita que a célula hospedeira tenha uma proteína que sirva de recetor para a ligação específica do vírus e que promova ou facilite a entrada do vírus (ou pelo menos do seu genoma) para o interior da célula, facultando-lhe o acesso à maquinaria genética do hospedeiro. Desta forma, o vírus irá canalizar, manipular e utilizar a maquinaria enzimática da célula para seu próprio proveito, levando à replicação, transcrição e tradução da informação do seu genoma, produzindo novas partículas virais que serão excretadas (com ou sem lise da célula infetada) e que irão propagar a infeção em novo ciclo infeccioso em outras células do mesmo ou de outro hospedeiro. (Ferreira, 2010).

2. Enterovírus

2.1. Proteínas virais

O genoma dos Enterovírus codifica para três proteínas precursoras a P1, P2 e P3. A P1 dá origem a quatro proteínas estruturais denominadas de VP1, VP2, VP3 e VP4 que em conjunto darão origem à totalidade da cápside viral (a estrutura proteica que reveste na totalidade o genoma viral, protege o genoma do ambiente externo, e permite a interação com os recetores celulares promovendo a entrada do genoma na célula alvo). A cápside organiza-se em doze pentâmeros, cada um formado por cinco protómeros (cada protómero é composto pelas proteínas virais estruturais acima mencionadas). A VP4 localiza-se no interior da cápside tendo assim uma ligação com o RNA viral. As restantes proteínas estruturais (VP1, VP2, VP3) localizam-se no lado exterior da cápside viral, sendo por isso as responsáveis pela ligação às células alvo, bem como as responsáveis pelos principais antígenos reconhecidos pelo sistema imunológico do hospedeiro. A VP1, VP2 e VP3 formam um triângulo na parte exterior da cápside (Figura 1), formando com a repetição desta estrutura um icosaedro. (Yuan *et al.*, 2018; Cabeda *et al.*, 2014).

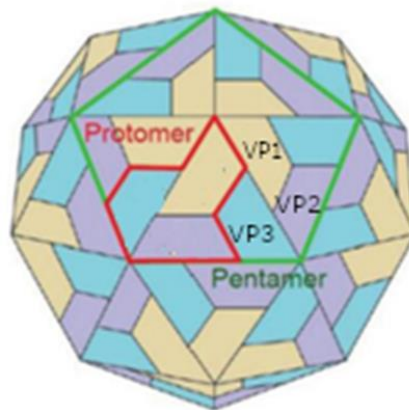


Figura 1- A estrutura do virião, representado pelas três proteínas estruturais (VP1-VP3) (adaptado de Yuan *et al.*, 2018).

2.2. Classificação dos Enterovírus

De acordo com o Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus os Enterovírus são classificados em quinze espécies distintas e distribuídos de acordo com as suas propriedades e características. As diferentes espécies são classificadas de Enterovírus de A-L e rinovírus de A-C (Tabela 1), sendo que cada espécie tem vários subtipos.

Tabela 1 – Enterovírus com capacidade de infectar seres humanos

Enterovírus	Enterovírus A	Ex: EV-A71
	Enterovírus B	Ex: CV-B
	Enterovírus C	Ex: PV
	Enterovírus D	Ex: EV-D68
Rinovírus	Rinovírus A	Ex: RV-A1
	Rinovírus B	Ex:RV-B3
	Rinovírus C	Ex:RV-C1

As únicas espécies capazes de infectar os seres humanos são: 1) as três espécies de rinovírus, ou seja rinovírus A, o rinovírus B e o rinovírus C; 2) as quatro espécies de enterovírus, o enterovírus A, o enterovírus B, o enterovírus C e o enterovírus D (Brown *et al.*, 2020)

2.2.1 Variabilidade genética

Inicialmente as subespécies agora denominadas de tipos foram classificadas sorologicamente através de testes de neutralização cruzada, porém com o uso alargado da sequenciação do genoma viral, a classificação nos dias de hoje faz-se através da sequenciação de uma proteína hipervariável contida na cápside viral: a proteína VP1. Os

Enterovírus são classificados e divididos entre espécies e tipos com base na semelhança dos seus nucleótidos e aminoácidos (Brown *et al.*, 2020; Oberste *et al.*, 1999).

2.2.2 Espécies de Enterovírus

O Rinovírus apresenta uma restrição de infecções pois apresenta um tropismo para o trato respiratório superior exceto em situações em que haja a disseminação da infecção. Os Enterovírus apresentam uma diversidade de forma de infecção pois estes têm a capacidade de se ligarem a diferentes células e provocar doenças e patologias diversificadas. Os Enterovírus são responsáveis por um grande número de infecções de meningite viral, já os rinovírus são os agentes mais frequentes de provocar uma constipação. Os Rinovírus apresentam uma maior sensibilidade a pH ácidos, não sobrevivendo ao pH estomacal e também apresentam uma instabilidade a temperaturas acima dos trinta e quatro graus, não sobrevivendo a temperaturas altas (Royston e Tapparel, 2016; Santos, 2019; Rodrigues, 2019).

2.2.2.1 Enterovírus A-L

De acordo com o Comitê Internacional de Taxonomia de vírus de 2021, os Enterovírus apresentam-se distribuídos de A-L e assim comportam 12 espécies e numerosos serotipos, que se encontram representados na tabela 2.

O Enterovírus A apresenta 25 tipos, mais concretamente o coxsackievirus (CV) A2 a coxsackievirus A8, CV-A10, CV-A12, CV-A14, CV-A16, Enterovírus (EV)-A71, EV-A76, EV-A89, EV-A90 a EV-A92, EV-A114, EV-A119 a EV-A125. Os Enterovírus A são responsáveis pela maior parte das infecções causadoras de doença do Pé mão boca (HFMD). A HFMD é uma patologia caracterizada por uma erupção da pele com vesículas e bolhas, as lesões na pele podem ser dolorosas ou assintomáticas localizadas na boca, nas mãos ou nos pés. Associado a este quadro clínico há também uma sintomatologia de febre e dores de garganta. Epidemias de HFMD são mais frequentes no continente asiático (Brown *et al.*, 2020; Muehlenbachs *et al.*, 2015).

O Enterovírus B apresenta 63 tipos distintos começando pelo coxsackievirus (CV) B1-CV-B6, CV-A9, echovirus (E) desde o E1 a E9, E11 a E21, E24 a E27, E29 a E33, Enterovírus (EV) B69, EV-B73 a EV-B75, EV-B77 a EV-B88, EV-B93, EV-B97 a EV-B98, EV-B100 a EV-101, EV-B106 a EV-B107, EV-B110 a EV-B114. Uma das patologias mais graves causadas pelo Enterovírus B é a paralisia flácida aguda. Os EV-B têm uma característica diferenciadora que é o facto de crescerem facilmente in vitro, em culturas celulares, o que permite que sejam identificados mais facilmente e se estivermos perante um caso isolado de paralisia flácida aguda, torna-se mais fácil a sua identificação se esta tiver origem em infeção pelo EV-B (Brown *et al.*, 2020).

Tabela 2 - Diferentes espécies de Enterovírus de A a L e respetivos serotipos de acordo com o ICTV (ICTV, 2020)

Enterovírus A	CV-A2, CV-A3, CV-A4, CV-A5, CV-A6, CV-A7, CV-A8, CV-A10, CV-A12, CV-A14, CV-A16, EV-A71, EV-A76, EV-A89, EV-A90, EV-A91, EV-A92, EV-A114, EV-A119, EV-A120, EV-A121, EV-A122, EV-A123, EV-A124 e EV-A125
Enterovírus B	CV-B1, CV-B2, CV-B3, CV-B4, CV-B5, CV-B6, CV-A9, E1, E2, E3, E4, E5, E6, E7, E8, E9, E11, E12, E13, E14, E15, E16, E17, E18, E19, E20, E21, E24, E25, E26, E27, E29, E30, E31, E32, E33, EV- B69, EV-B73, EV-B74, EV-B75, EV-B77, EV-B78, EV-B79, EV-B80, EV-B81, EV-B82, EV-B83, EV-B84, EV-B85, EV-B86, EV-B87, EV-B88, EV-B93, EV-B97, EV-B98, EV-B100, EV-B101, EV-

	B106, EV-B107, EV-B110, EV-B111, EV-B112, EV-B113, EV-B114
Enterovírus C	PV1, PV2, PV3, CV-A1, CV-A11, CV-A13, CV-A17, CV-A19, CV-A20, CV-A21, CV-A22, CV-A24, EV-C95, EV-C96, EV-C99, EV-C102, EV-C104, EV-C105, EV-C109, EV-C113, EV-C116, EV-C117, EV-C118
Enterovírus D	EV-D68, EV-D70, EV-D94, EV-D111, EV-D120
Enterovírus E	EV-E1, EV-E2, EV-E3, EV-E4, EV-E5
Enterovírus F	EV-F1, EV-F2, EV-F3, EV-F4, EV-F5, EV-F6, EV-F7
Enterovírus G	EV-G1, EV-G2, EV-G3, EV-G4, EV-G5, EV-G6, EV-G7, EV-G8, EV-G9, EV-G10, EV-G11, EV-G12, EV-G13, EV-G14, EV-G15, EV-G16, EV-G17, EV-G18, EV-G19, EV-G20, EV-G21, EV-G20
Enterovírus H	EV-H
Enterovírus I	EV-I1, EV-I2
Enterovírus J	EV-J1, EV-J103, EV-J108, EV-J112, EV-J115, EV-J121
Enterovírus K	EV-K1, EV-K2
Enterovírus L	EV-L1

O Enterovírus C contém 23 tipos e notavelmente entre estes encontra-se o poliovírus. O Enterovírus C comporta as subespécies de poliovírus (PV) PV1 a PV3, os coxsackievirus (CV) A1, CV-A11, CV-A13, CV-A17, CV-A19 a CV-A22, CV- A24, e os Enterovírus (EV) C95 a EV-C96, EV-C99, EV-C102, EV-C104 a EV-C105, EV-C109, EV-C113, EV-C116 a EV-C118. Os subtipos não polio, ou seja, o coxsackievirus e os Enterovírus são menos frequentes, porém o CV-A24 está associado a alguns casos de conjuntivite, sendo as infecções por parte deste Enterovírus mais frequentes em climas tropicais como o Brasil e a Índia. A sua transmissão ocorre entre pacientes devido às secreções oculares. Para diminuir os surtos deste tipo de doenças é fundamental a higienização das mãos e não partilhar itens de higiene como toalhas. Este quadro clínico é acompanhado por lacrimação e dor, tornando-se incomodativo para o utente (Brown *et al.*, 2020); (Cabeda *et al.*, 2014).

O Enterovírus D apresenta cinco tipos diferentes. É de realçar o Enterovírus D68, uma vez que a maior parte dos Enterovírus têm uma predisposição para se ligarem aos enterócitos, ou seja células que parte do tubo gastrointestinal, no caso do Enterovírus D68 ele apresenta uma maior predisposição para se ligar e afetar o trato respiratório e não o digestivo. O Enterovírus D é composto por 5 tipos e são eles então o EV-D68, EV-D70, EV-D94, EV-D111 e o EV-D120. O Enterovírus D68 é um vírus que afeta o sistema respiratório, com um quadro de congestão nasal, dor de garganta e tosse. Como o local de replicação deste Enterovírus é diferente dos observado nos outros Enterovírus a sua eliminação ou secreção ocorre também por via diferente dos restantes pelo que este tipo de enterovírus não é detetado nas fezes (Brown *et al.*, 2020).

O Enterovírus E é composto por 5 tipos, todas elas são classificadas de EV-E1 a EV-E5.

O Enterovírus F apresenta 7 tipos, neste caso todas as espécies também são Enterovírus como o caso dos Enterovírus E, e são classificadas de EV-F1 a EV-F7.

O Enterovírus G contém 20 tipos, tal como o Enterovírus E e o Enterovírus F todas elas Enterovírus, as espécies de Enterovírus G são classificadas de EV-G1 a EV-G20.

O Enterovírus H apresenta 1 tipo, o EV-H.

O Enterovírus I é composto por 2 tipos, o EV-I1 e o EV-I2.

O Enterovírus J contém 6 tipos, sendo elas o EV-J1, o EV-J103, o EV-J108, EV-J112, EV-J115, o EV-J121.

O Enterovírus K apresenta 2 tipos, o EV-K1 e o EV-K2.

O Enterovírus L apresenta 1 tipo, o EV-L1.

2.2.2.2 Rinovírus A-C

Os Rinovírus são agentes patogênicos responsáveis por cerca de cinquenta por cento das infecções do trato respiratório superior, demonstrando uma grande morbidade, sendo que a sintomatologia é mais visível e afeta principalmente a população infantil e geriátrica. Sintomatologia como espirros, tosse, obstrução nasal, febre ligeira também pode estar associada a uma infecção por rinovírus (Cabeda *et al.*, 2014).

A infecção por Rinovírus ocorre devido a presença de um ligante denominado de canyon presente na cápside viral que se irá ligar a célula do hospedeiro e assim provocar uma infecção. A maior parte dos Rinovírus A e o Rinovírus B liga-se a célula do hospedeiro através de uma molécula denominada de ICAM-1 presentes nas células ciliadas e não ciliadas, que é o recetor principal que permite a entrada para o interior da célula do hospedeiro e outros rinovírus ligam-se em menor parte através de uma lipoproteína de baixa densidade, (LDL-R) sendo este o recetor de ligação ao vírus considerado menor. Após a ligação ao recetor, de forma a permitir a entrada do genoma viral este sofre algumas alterações conformacionais de forma a entrar para a célula hospedeira (Royston e Tapparel, 2016).

O período de incubação é de cerca de dois a três dias, porém os sinais e sintomas clínicos só são perceptíveis cerca de cinco dias após a infecção, ou seja, desde que ocorreu o contacto com o agente viral provocador de infecção. A síntese do vírus no hospedeiro humano só ocorre num intervalo de dez a catorze dias após a infecção, porém o RNA viral pode ser detetado cerca de duas a três semanas após o aparecimento da sintomatologia. Porém muitas vezes não estão associados quaisquer sintomas o que dificulta a identificação do período de incubação. As infecções provocadas por Rinovírus como por Enterovírus são autolimitadas e de resolução espontânea quando não muito graves (Santos, 2019) .

O Rinovírus comporta três espécies distintas (tabela 3), o Rinovírus A, o Rinovírus B e o Rinovírus C, na tabela 3 estão descritas as três espécies e os distintos subtipos destes vírus. O Rinovírus encontra-se associado a infecções do trato respiratório superior, sendo que as constipações são as patologias mais frequentes provocadas por Rinovírus, o Rinovírus têm uma maior prevalência durante as estações amenas como a primavera e outono (Rodrigues, 2019; Royston e Tapparel, 2016).

O Rinovírus A apresenta 80 serotipos (ICTV 2020) e afeta o trato respiratório superior e a sintomatologia quando observada passa pela obstrução nasal, rinorreia e espirros. Este Rinovírus é apontado como o maior agente causador de infecção do trato respiratório superior em adultos.

O rinovírus B contém 32 serotipos (ICTV 2020) apresenta uma frequência mais baixa de infecções, o que torna uma infecção por rinovírus B uma infecção mais rara do que as espécies de rinovírus A e C.

Tabela 3-Diferentes espécies de Rinovírus de A a C e respectivos serotipos de acordo com o ICTV (ICTV, 2020).

Rinovírus A	RV-A1, RV-A1B, RV-A2, RV-A7 a RV-A13, RV-A15, RV-A16, RV-A18 a RV-A25, RV-A28 a RV-A34, RV-A36, RV-A38 a RV-A41, RV-A43, RV-A45 a RV-A47, RV-A49 a RV-A51, RV-A53 a RV-A68, RV-A71, RV-A73 a RV-A78, RV-A80 a RV-A82, RV-A85, RV-A88 a RV-A90, RV-A94, RV-A96, RV-A100 a RV-A108
Rinovírus B	RV-B3 a RV-B6, RV-B14, RV-B17, RV-B26, RV-B27, RV-B35, RV-B37, RV-B42, RV-B48, RV-B52, RV-B69, RV-B70, RV-B72, RV-B79, RV-B83, RV-

	B84, RV-B86, RV-B91 a RV-B93, RV-B97, RV-B99, RV-B100 a RV-B104
Rinovírus C	RV-C1 a RV-C51, RV-C54 a RV-C57

O Rinovírus C apresenta 57 estirpes (ICTV 2020) é um vírus que tem maior capacidade de atingir o trato respiratório inferior face ao Rinovírus A e o pico da infecção é visível nos meses mais frios (Rodrigues, 2019). Dada esta sua capacidade, este tipo de vírus além de provocar uma nova patologia, pode ir mais além disso pois devido a capacidade de atingir o trato respiratório inferior poderá interferir e piorar quadros clínicos anteriores de doenças respiratórias como a asma ou a doença pulmonar obstrutiva crónica por exemplo, que são patologias mais perigosas e severas para a população mais vulnerável como a população mais velha podendo levar a uma possível hospitalização. A sintomatologia observada nestes utentes é a falta de ar, tosse e pieira. Uma característica do Rinovírus C é o facto de estes não crescerem in vitro em culturas celulares padrão imortalizadas como o Rinovírus A, o que atrasou a sua investigação em laboratório (Cabeda *et al.*, 2014; Santos, 2019).

2.2.3 Replicação viral

O ciclo de vida tem início nos enterócitos, no epitélio gastrointestinal, porém no caso particular do Enterovírus D68 e dos Rinovírus a sua disseminação ocorre através de secreções respiratórias, ou seja, pelo trato respiratório e não pelo gastrointestinal, replicando-se os restantes Enterovírus no epitélio gastrointestinal. Os Enterovírus de uma forma geral têm como alvo o epitélio para que possam realizar a sua replicação (Wells e Coyne, 2019).

Os Enterovírus entram na célula do hospedeiro devido a recetores presentes na célula do hospedeiro e a proteínas virais que irão permitir a ligação à célula e a posterior entrada através de mecanismos de endocitose.

Os recetores que permitem a entrada dos Enterovírus para o interior das células são distintos dependendo do tipo de Enterovírus. No caso do EV-A71 a ligação a célula

hospedeira é feita devido a presença de um recetor denominado de SCARB2, do ligante 1 da glicoproteína seletiva P (PSGL-1). A PSGL-1 facilita a entrada do Enterovírus do tipo EV-A71 quando sofre sulfatação da tirosina na região N-terminal promovendo assim de forma positiva a replicação viral. A presença de ácido siálico não permite a entrada na célula nem a remoção da cápside, porém funciona como anexo da ligação para a entrada do EV-A71 para o interior da célula do hospedeiro (Wells e Coyne, 2019; Huang *et al.*, 2019; Baggen *et al.*, 2018).

No caso dos tipos de Enterovírus CV-B1 a CV-B6 a proteína usada para a ligação a célula hospedeira é a proteína CAR. No caso do EV-D68 para a entrada na célula hospedeira do epitélio respiratório, o EV-D68 usa a proteína ICAM5. No caso dos ecovirus a proteína hospedeira usada é a FcRn (recetor Fc neonatal) que permite a entrada do ecovirus para a realização da replicação viral (Figura 2) (Wells e Coyne, 2019; Baggen *et al.*, 2018).

Após esta ligação o vírus sofre alterações estruturais da sua cápside, que promovem a saída da VP4 para a parte posterior da cápside. Esta saída promove a formação de um poro que permite a libertação do RNA viral e sua entrada na célula hospedeira (Figura 2) (Wells e Coyne, 2019; Cabeda *et al.*, 2014).

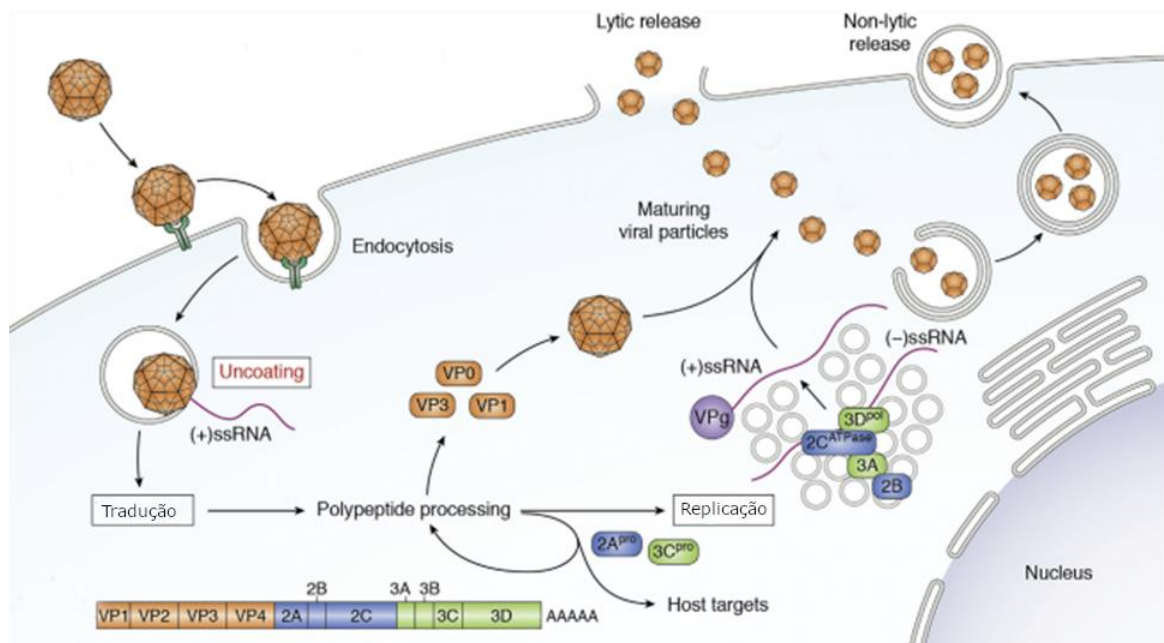


Figura 2 – Ciclo de replicação do Enterovírus (adaptado de Elrick *et al.*, 2021)

O Enterovírus entra para o interior das células do ser humano para realizar a sua replicação, em primeiro lugar há a ligação do Enterovírus aos recetores presentes na superfície das células, o virião entra para o interior da célula através de um processo de endocitose, onde há a invaginação da membrana celular.

O genoma viral é composto por uma molécula de RNA de polaridade positiva (funciona também como mRNA interagindo diretamente com os ribossomas) que por sua vez contém três regiões distintas: uma região codificante e duas regiões não traduzidas, uma em cada extremo, sendo denominadas de 5' não traduzida (5'-UTR) e 3' não traduzida (3'-UTR). A região 5'-UTR tem ligada a si uma proteína, a VPg ligada covalentemente quando esta se encontra no interior do citoplasma, esta região é responsável pela iniciação da tradução, sendo então nesta extremidade que se dá a ligação ao ribossoma e também a escolha do codão para dar início ao processo de tradução. A região 3' UTR tem ligada a si uma cauda poli-A curta, que permite que o RNA se mantenha estável resistindo parcialmente à ação das exonucleases como os mRNA celulares (Chen *et al.*, 2020; Cabeda *et al.*, 2014).

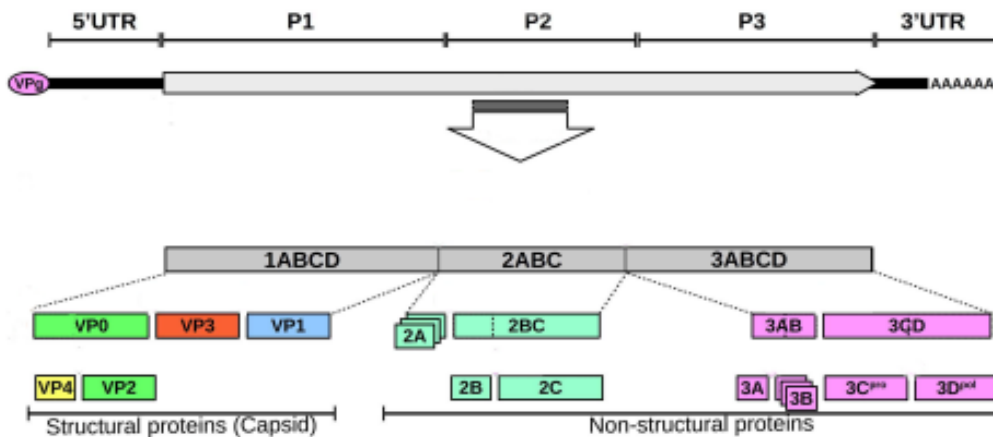


Figura 3 - Organização do genoma de picornavírus, representação da VPg e da cauda poli-A (adaptado de Cifuentes e Moratorio, 2019)

Após o processo de tradução a região codificante dá origem a uma poliproteína muito grande, que ao ser clivada proteoliticamente dá origem a várias proteínas: as proteínas estruturais e as proteínas não estruturais visíveis na figura 3. A poliproteína têm três regiões, a região P1, a região P2, e a região P3. A região P1 possui as proteínas da cápside do vírus sendo elas VP1, VP2, VP3, VP4. A região P2 contém as proteínas não estruturais 2A, 2B e 2C. A região P3 é responsável pela replicação do vírus e é constituído pelas proteínas 3A, 3B, 3C e 3D (Cifuentes e Moratorio, 2019; Cabeda *et al.*, 2014).

Após a produção de proteínas há a replicação do RNA, pela RNA polimerase, que irá produzir uma nova cadeia de RNA de polaridade negativa tendo como base para síntese a cadeia de RNA de polaridade positiva, isto irá permitir a síntese de cadeias RNA positivas, a partir da cadeia de polaridade negativa (Chen *et al.*, 2020).

Para a construção do novo vírus, primeiro tem que haver a associação das proteínas estruturais a VP1, VP3 e VP0 (VP2+VP4) irão formar um protómero porém não ligado covalentemente. As proteínas da cápside VP0 (VP2 + VP4), VP1, VP3 formam uma estrutura chamada de protómero, que em associação entre elas dão origem aos pentâmeros, dando origem a estruturas icosaédricas nuas, uma vez que não contém ainda a molécula de RNA viral, a esta estrutura denominamos de cápside. Posteriormente ocorre a entrada da nova molécula de RNA para o interior da cápside, com a sua entrada a proteína estrutural VP0 sofre clivagem dando origem a VP2 e VP4, dando uma maior estabilidade à cápside. Após o processo de replicação viral e montagem, o vírus sai da célula hospedeira, por exocitose ou lise celular. As partículas virais recentemente sintetizadas são então libertadas ficando disponível para iniciar novo ciclo infeccioso infectando outras células do mesmo hospedeiro, ou para serem excretadas pelo hospedeiro, e eventualmente promover a infecção de um novo indivíduo (figura 2) (Cabeda *et al.*, 2014; Cifuentes e Moratorio, 2019) .

3. Epidemiologia

Os Enterovírus como já mencionado são causadores de um grande número de infecções em todo o mundo, e devido à sua capacidade para causar infecções na população são relatados diversos surtos epidemiológicos em todo o mundo, sendo os agentes causadores de espécies diferentes de Enterovírus.

É importante ressaltar que muitas das vezes a maior parte destas infecções são assintomáticas afetando sobretudo crianças e que o clima tem um papel importante na disseminação do vírus em todo o mundo (Good et al., 2018; Toczyłowski et al., 2020).

3.1. Poliovírus

O Poliovírus é um agente viral da família dos Enterovírus conhecido por ser a causa de poliomielite. O Poliovírus pertence à família dos Enterovírus e é causador de uma patologia, denominada de poliomielite. Foi identificado pela primeira vez em 1908 e também foi o primeiro vírus de RNA animal com a sua sequência genômica determinada. Por norma uma infecção por Poliovírus é assintomática e afeta mais pessoas do sexo masculino (Chen et al., 2020; Silveira et al., 2019).

O Poliovírus é composto por 3 espécies distintas, o PV1, o PV2 e o PV3. O tipo de Poliovírus 1 era considerado o vírus que provocava mais quadros de poliomielite seguido dos outros dois tipos. Quando o poliovírus atinge o sistema nervoso central provoca alterações neurológicas, podendo mesmo comprometer a coordenação motora acabando por provocar uma paralisia dos membros e podendo levar mesmo à morte, isto acontece quando estamos perante uma viremia major e aí é desencadeada a doença, a poliomielite.

Anteriormente a uma viremia major, há uma viremia minor com sinais e sintomas não específicos como dores de garganta, alterações gastrointestinais, dores de cabeça. Após a sintomatologia de uma viremia major, há o aparecimento de uma sintomatologia mais concreta do atingimento do sistema nervoso central descritiva de uma meningite asséptica não paralítica com sintomas como rigidez da nuca, aumento do número de glóbulos brancos no sangue, mais concretamente de leucócitos ou uma poliomielite paralítica e aqui temos três tipos de poliomielite. A poliomielite espinal acontece quando há o

atingimento da espinal medula, há alteração dos neurónios motores e como consequência há o aparecimento de patologia (paralisia flácida aguda). A poliomielite bulbar é caracterizada pela destruição dos nervos cranianos, acompanhada por paralisia dos músculos intercostais levando a que o utente tenha que ter ventilação assistida para que consiga sobreviver. A poliomielite bulboespinal acontece quando estamos perante as duas patologias acima mencionadas em simultâneo (Silveira et al., 2019; Cabeda et al., 2014).

Em 1960 houve a introdução da vacina por parte da organização mundial de saúde contra o Poliovírus, pois era uma doença que afetava grande parte da população mundial e foram tomadas medidas para a erradicação da mesma. Com a administração da vacina, nos dias de hoje é considerada erradicada em Portugal, porém no nosso país ainda faz parte do programa nacional de vacinação (Cabeda et al., 2014).

3.2. Enterovírus A71

O Enterovírus A71 é um agente etiológico causador de doença mão pé boca. O primeiro surto registado pelo Enterovírus A71 como causador de doença neurológica foi na Califórnia no ano de 1960, sendo isolado pela primeira vez no ano 1965. Posteriormente a esse surto foram também registadas epidemias na zona da Ásia e Pacífico, já na Europa a primeira vez que foi relatado um caso de doença neurológica provocada pelo Enterovírus A71 foi na Bulgária e Hungria no ano de 1970. Este foi um grande surto levando a uma elevada morbilidade e mortalidade. Também foram registados surtos mais pequenos nos Estados Unidos, na Europa e Austrália com um quadro de meningite asséptica. Já mais recentemente foi registado um surto em março de 2016 em Espanha (Catalunha) causando encefalite do tronco cerebral e encefalomielite. Em 1998, em Taiwan foi observado o maior surto até hoje registado por este Enterovírus provocando uma série de complicações. O número de casos de febre aftosa (patologia normalmente leve e autolimitada) causada pelo Enterovírus A71 desde o ano 2012 tem aumentado em Espanha. Na Polónia foi descrito um surto pelo Enterovírus 71 associada a patologia de paralisia flácida aguda. Nos últimos vinte anos grandes surtos foram registados na região do Sudeste Asiático. O Enterovírus A71 foi o agente viral mais comum causador da

doença mão pé boca (HFMD) entre os anos de 2007 e 2012 (Baggen et al., 2018; Taravilla et al., 2019; Toczyłowski et al., 2020; Brown et al., 2020).

3.3. Enterovírus D68

O Enterovírus D68, é um agente que se replica no trato respiratório e que pode levar a várias patologias a ele associadas, desde simples doenças respiratórias leves a infecções mais graves como pneumonia e bronquiolite que podem conduzir à morte. Foi isolado pela primeira vez na Califórnia nos Estados Unidos da América no ano de 1962 em crianças que apresentavam infecções respiratórias.

Foram observados surtos de Enterovírus D68 no ano 1998 na Catalunha e posteriormente em mais três regiões Aragão, Galiza e Astúrias, provocando paralisia flácida aguda sobretudo na população infantil. Até 2005 apenas foram relatados 26 casos, contudo a partir de 2008 têm surgido surtos associados a patologias respiratórias. No ano 2014, foi registado um surto nos Estados Unidos com cerca de 1153 infecções provocadas pelo Enterovírus D68, em que foram relatadas doenças respiratórias graves acarretando dificuldades na respiração dos indivíduos afetados, causando paralisia flácida aguda que é provocada devido a lesões no cérebro e medula espinhal e disfunção dos nervos cranianos, principalmente em crianças, obrigando muitas vezes a hospitalização.

Na Europa foi descrito um surto nesse mesmo ano (2014) que circulou durante o período de verão e outono. Atualmente circulam 3 subespécies (A, B, C) de Enterovírus D68. Desde 2014, tem ocorrido um aumento do número de surtos por Enterovírus D68 associados a patologias respiratórias e complicações neurológicas graves em vários países. Este vírus também foi detetado em crianças portadoras de meningite asséptica. Já em 2016 foi observado na Europa um surto em pacientes que se encontravam em unidades de saúde de forma permanente devido a complicações neurológicas. Outro surto em 2018 ocorreu nos Estados Unidos, porém com menos complicações respiratórias, mas com manifestações neurológicas mais graves que as observadas no surto ocorrido em 2014.

No entanto, no ano de 2018, as crianças eram mais novas, havia um maior número de casos de população de raça branca, e também o surto de 2018 estava mais associado a

casos de sintomatologia gastrointestinal e mais manifestações neurológicas graves. No ano de 2020 era esperado um novo surto, que, porém, não ocorreu em resultado, muito provavelmente das medidas preventivas tomadas pelas autoridades e seguidas pela população em resultado da epidemia de covid-19. Ficou assim demonstrada indiretamente a eficácia de medidas como o distanciamento social, a higienização das mãos e superfícies na prevenção da infecção por Enterovírus D68. O surto de 2014 esteve mais associado a sintomatologia respiratória e erupções cutâneas. Os surtos ocorreram durante os meses de junho e outubro (Baggen et al., 2018; Toczyłowski et al., 2020; Richter et al., 2019; Wang et al., 2019; Royston e Tapparel, 2016; Brown et al., 2020).

3.4.Coxsackievirus

O Coxsackievirus A24 é o principal agente causador de conjuntivite hemorrágica aguda provocando grandes surtos no mundo, mas também está associado a infecções como a herpangina, paralisia flácida aguda que afetam a população de forma bastante considerável. Num estudo realizado com dados de infecções respiratórias do centro e sul do Vietname, de entre os trinta e um pacientes infetados por agentes patogénicos provocadores da infecção respiratória, oito dos pacientes estavam infetados pelo coxsackievirus A24 (Baggen et al., 2018; B'Krong et al., 2018).

O Coxsackievirus (CV) B5 provocou um surto em 2017 na Polónia e outros em 2019 na China, Austrália e Estados Unidos tendo um pico no mês de julho (Toczyłowski et al., 2020).

O Coxsackievirus A10 e A3 esteve em circulação em Shijiazhuang na China entre os anos de 2010 e 2012, afetando os indivíduos de forma mais acentuada tendo um maior número de sinais neurológicos (Peng et al., 2016).

O Coxsackievirus A12 originou um surto entre os anos de 2008 e 2012 em Qingdao (Peng et al., 2016).

O Coxsackievirus A6 também foi detetado como agente causador de febre aftosa num surto em Taiwan nos anos 2004 e 2009 acompanhado por sinais como descamação das palmas das mãos e anomalias nas unhas. Outros sintomas comuns associados a infecções

por parte do coxsackievirus A6 são a febre, erupções cutâneas e lesões a nível da boca. A população mais afetada por este Enterovírus é a população mais jovem. De acordo com um estudo realizado em França num período de abril de 2014 a março de 2015, o coxsackievirus A6 foi responsável pela doença mão, pé, boca (HFMD) em cerca de 74,4%, tornando-se a causa mais comum de HFMD e cerca de 57,7% dos casos de herpangina (Peng et al., 2016; Infections et al., 2016; Brown et al., 2020).

O Coxsackievirus A16 é um dos serotipos causadores de HFMD, porém os sintomas observados quando a doença é provocada por este vírus são menos graves do que quando provocado por o Enterovírus 71. O serotipo A16 foi a estirpe que provocou um maior número de infeções entre os anos 1998 e 2010 na Ásia com surtos de HFMD (Weng et al., 2017; Infections et al., 2016).

3.5.Echovirus

O vírus Echovírus 6 (E6), é um dos Enterovírus mais identificado em todo o mundo, normalmente causador de meningite asséptica (Richter et al., 2019). Este vírus circula na Europa pelo menos desde 2006 e foi responsável por um surto na Polónia no mês de outubro do ano 2015, o qual teve origem em viagens ao Reino Unido, França e Países baixos (Toczyłowski et al., 2020)

O vírus Echovírus 30 (E30), é uma espécie de Enterovírus causador de grandes surtos de meningite e encefalite principalmente em climas amenos. Foi relatado um surto nos anos 2018 e 2019 na Alemanha e Turquia. Em 2014 no nordeste da Polónia ocorreu um surto, com quadros de meningite enteroviral na população infetada, com um grande número de crianças afetadas com necessidade de internamento hospitalar. Este surto teve um pico no início de junho, demonstrado pelo aumento de casos visualizados. Outros surtos ocorreram na Europa, em 2009 na Finlândia, em 2012 na Grécia e Itália, em 2008 e 2013 na Alemanha e Reino Unido e mais recentemente em 2018 um surto que afetou cinco países da Europa (Richter et al., 2019; Toczyłowski et al., 2020; Brown et al., 2020).

4. Patologias

4.1. Encefalite

Os enterovírus, apesar de maioritariamente originarem quadros sub-clínicos, ou quadros clínicos de resolução espontânea estão também na origem de várias patologias de gravidade significativa como a encefalite. A encefalite por enterovírus é definida como uma inflamação do sistema nervoso central causada pelo Enterovírus. A encefalite provocada por este tipo de vírus é bastante frequente em crianças sobretudo as mais pequenas. Com efeito, dos diagnósticos de encefalite realizados nos Estados Unidos, cerca de 58% dos casos são na população infantil (bebés e crianças) e 52% dos casos nos adultos são provocadas por uma infeção por Enterovírus. Das diferentes espécies de Enterovírus, o Enterovírus C que comporta o poliovírus, é o que apresenta um maior tropismo para o tecido nervoso, infetando assim mais frequentemente o sistema nervoso central. Apesar de a vacinação da população dos Estados Unidos ter permitido erradicar este tipo de Enterovírus do território Americano, os Enterovírus não-polio que também infetam o sistema nervoso central, permanecem um problema, sendo a causa mais frequente das encefalites e das meningites (Chen *et al.*, 2020; de Crom *et al.*, 2016).

4.2. Doença mão pé boca

A doença mão pé boca é uma síndrome contagiosa, provocada por Enterovírus, mais comum em crianças. Trata-se de uma patologia caracterizada por uma erupção com vesículas e bolhas. As lesões na pele podem ser dolorosas ou assintomáticas, sendo causadas em particular por infeções pelos enterovírus dos tipos Coxsackie A16, A5, A7, A9, A10, B2 e B5 e pelo enterovírus 71. Esta patologia é autolimitada, contudo pode levar ao aparecimento de sequelas como problemas cardiovasculares. A transmissão desta patologia ocorre por contacto direto com produtos biológicos contaminados como a saliva, fezes, partículas respiratórias, ou indiretamente por contacto com objetos que tenham sido contaminados por estes produtos biológicos. Esta patologia tem um período de incubação de cerca de 3 a 6 dias. Após este período de incubação ocorre o aparecimento de lesões bucais na mucosa, que são apresentadas como manchas vermelhas. Após o aparecimento destas lesões bucais há o aparecimento de máculas

eritematosas nos pés que levam ao aparecimento de vesículas na planta dos pés e zonas interdigitais das mãos e pés, sendo menos comum o aparecimento destas lesões nas nádegas e região genital, podendo ser acompanhados por quadros de febre (Franco, 2020; Baggen *et al.*, 2018; Kobayashi e Koike, 2020).

4.3. Herpangina

Herpangina é uma infecção provocada por Enterovírus do tipo Coxsackie A (como o A6, A2 e A10). Esta patologia afeta principalmente crianças pequenas, com menos de 10 anos, contudo também há relatos de casos noutras idades, sendo esta patologia mais frequente em alturas de maior calor. Esta patologia é caracterizada pelo aparecimento de múltiplas bolhas que evoluem para úlceras na cavidade bucal mais concretamente no céu da boca, na parte posterior da garganta, esta infecção viral é acompanhada por outros sintomas como, dor devido às úlceras, febre, dor de garganta. O modo de transmissão desta patologia é por contacto direto, por gotículas de saliva através do espirro por exemplo ou pela partilha de itens de higiene pessoal como escova de dentes, embora a sua transmissão também possa ocorrer através do contacto com fezes. A herpangina é um quadro que dura cerca de 10 dias não havendo um tratamento que atue de forma eficaz neste vírus do grupo A (Peng *et al.*, 2016 ;Team, 2020).

4.4. Febre aftosa

A Febre aftosa é uma infecção causada por Enterovírus, é bastante comum na Ásia sendo responsável por grandes surtos, é uma doença caracterizada pela erupção maculopapular vesicular transitória, por quadros de febre, por lesões cutâneas principalmente mãos e pés e vesículas na cavidade bucal, porém em pacientes infetados pelo CV6 há lesões na pele para além das zonas já mencionadas, como cotovelos, joelhos, cabeça, alterações nas unhas. Esta situação clínica não está relacionada e restrita a um tipo de Enterovírus, sendo que estão associadas infeções por coxsackievirus A6, A10 e A16, e o Enterovírus 71. Na China, o Enterovírus coxsackievirus A6 é o agente causador de febre aftosa mais comum. Contudo na população infantil é mais frequente o agente etiológico ser o coxsackievirus

A16. Estes surtos de febre aftosa provocados por estes Enterovírus têm o seu pico no verão, afetando sobretudo crianças com menos de 5 anos de idade. Um estudo realizado numa cidade Chinesa demonstrou que o coxsackievirus A10 apresentou um pico na primavera e verão e que o coxsackievirus A6 teve um pico no outono e inverno (Peng *et al.*, 2016; Muehlenbachs *et al.*, 2015).

4.5.Miocardite enteroviral

A miocardite enteroviral é uma patologia autolimitada caracterizada por uma inflamação do miocárdio, podendo conduzir a morte cardíaca súbita, é mais comum em população com idades compreendidas entre os 20 e os 40 anos. Os tipos de Enterovírus mais comuns a causarem quadros de miocardite são os Enterovírus B sendo os echovírus, e principalmente os coxsackievirus B (CV-B) os principais agentes causadores de miocardite (Muehlenbachs *et al.*, 2015; Brown *et al.*, 2020).

4.6.Mielite flácida aguda

A mielite flácida aguda (MFA) é uma patologia neurogénica comum em crianças com cerca de 5 anos de idade sendo mais frequente no sexo masculino que no sexo feminino. Apesar de a infeção do SNC por parte dos Enterovírus não-polio normalmente não acarretar complicações de maior, evoluindo favoravelmente de modo espontâneo, o prognóstico depende do tipo de Enterovírus envolvido na infeção. Os casos de mielite flácida aguda mais frequentes estão associados a infeção pelo Enterovírus 71 (EV-71), pelo Enterovírus D68 (EV-D68), e pelos echovirus 11 e 13 (E-11 e E-13). Esta patologia causa lesões na espinal medula podendo provocar diminuição dos reflexos motores, fraqueza muscular, paralisia ou mesmo levar à total disfunção do membro. A extensa e rápida mobilidade da população mundial, que se acentuou de modo particular nos séculos XX e XXI em virtude da popularidade das viagens aéreas tem promovido a circulação destes vírus, facilitando a sua difusão e aumentando a associação do Enterovírus D68 como agente causador de mielite flácida aguda. Nos Estados Unidos no ano de 2016 e

2018, o EV-D68 foi o microrganismo que provocou um maior número de casos de mielite flácida aguda (Sun *et al.*, 2019; Nascimento, 2019; Vyas, 2018; Bisseux *et al.*, 2018).

4.7.Pleurodínia

A Pleurodínia ou doença de Bornholm, conhecida dessa forma devido a um surto que ocorreu nessa ilha, situada na Dinamarca, é uma doença epidémica que é descrita por causar uma dor aguda na região inferior torácica ou na zona do abdómen superior, esta patologia é mais comum em crianças. De entre os diferentes tipos de Enterovírus os que estiveram envolvidos em surtos, pode-se destacar o coxsackievirus B (CVB), echovírus (E) e o coxsackievirus A (CVA). Os surtos desta doença são mais comuns na Europa e América do norte, sendo muito menos frequente no Sudeste Asiático (Huang *et al.*, 2010).

4.8.Sépsis Neonatal

A Sépsis Neonatal tem por norma origem bacteriana, mas em casos raros pode envolver Enterovírus. São vários os tipos de Enterovírus que podem estar associados a esta patologia como é o caso dos echovírus e do coxsackievírus B. Os Enterovírus provocam infeções mais graves em recém-nascidos do que em jovens crianças. De entre os Enterovírus que infetam os recém-nascidos destaca-se o echovírus 11, o coxsackievírus B2 (CVB-2), o coxsackievírus B5 (CVB-5), o echovírus 6, o echovírus 9 e o coxsackievírus B4 (CVB-4). Mais recentemente no ano de 2018, ocorreu um surto na cidade de Taiwan provocada pelo serotipo Echovirus 11 (Chuang e Huang, 2019).

4.9.Conjuntivite hemorrágica

Conjuntivite hemorrágica é uma patologia caracterizada por uma dilatação das pálpebras acompanhado por um quadro de lacrimação e dor. Com o agravamento da patologia surge o aparecimento de hemorragias na zona subconjuntival. Um dos agentes virais causadores de conjuntivite hemorrágica é o Enterovírus 70. A sua forma de transmissão deve-se sobretudo ao uso de utensílios oftalmológicos indevidamente esterilizados e também ao

facto da não correta higienização das mãos que muitas vezes são levadas ao rosto (Cabeda *et al.*, 2014).

4.10. Poliomielite

A poliomielite é uma patologia contagiosa, causada pelo vírus da poliomielite, que comporta 3 subespécies distintas, pertencentes ao Enterovírus C, embora a maior parte dos casos de infecção sejam assintomáticos, as principais manifestações da doença são a febre, dor de cabeça, fraqueza, dores musculares, rigidez na nuca, vômitos. Quando o Poliovírus atinge o sistema nervoso central, provoca alterações neurológicas, comprometendo a coordenação motora, mas apenas 0.1% a 1% das infecções provocadas por poliovírus provocam este quadro, que pode levar a paralisia dos membros (Minor, 1996; SNS, 2018; Silveira, B., *et al*, 2019).

Esta doença é transmitida principalmente pela via fecal-oral, de pessoa para pessoa, através de secreções respiratórias e também ainda embora que menos frequente através de alimentos contaminados (Silveira, B., *et al*, 2019; SNS, 2018).

Esta doença tem um período de incubação de 3 a 6 dias para quadros de meningite não paralítica. No caso de um quadro de uma paralisia por atingimento do sistema nervoso central, o início deste quadro ocorre entre o 7º e o 21º dia após o contágio com o vírus. O período de transmissão da patologia, pode ocorrer mesmo sem que haja sintomas (SNS, 2018; Silveira, B., *et al*, 2019).

A poliomielite afeta sobretudo crianças, com uma maior taxa de incidência em crianças com idade inferior a dois anos, sendo evidentes picos desses surtos em climas amenos. Não existindo terapia curativa eficaz (SNS, 2018), o que torna a prevenção com recurso às vacinas a única estratégia eficaz. Entre os anos de 1965 e 1966 Portugal iniciou a administração da vacina contra a poliomielite em massa (SNS, 2018). A comprovada elevada eficácia das vacinas, aliada à inexistência de reservatórios animais conhecidos permite que as vacinas tenham o potencial para erradicar a doença, tendo este propósito sido assumido pela campanha mundial da OMS para a vacinação da poliomielite (De Souza Verani e Laender, 2020; SNS, 2018). Em 1988 Portugal juntamente com muitos

outros países aderiram à iniciativa da OMS para uma campanha massiva de vacinação da população, com vista à erradicação da poliomielite tendo a doença sido considerada erradicada em Portugal no ano de 2002 (De Souza Verani e Laender, 2020; SNS, 2018). O programa de vacinação implementado em Portugal inclui, para além da vacinação contra a poliomielite, uma atenta vigilância e deteção precoce dos casos, que se mantém em vigor até aos dias de hoje em virtude de a erradicação mundial ainda não estar atingida. Com efeito, e apesar de a campanha mundial de vacinação promovida pela OMS ter permitido que em quase todo o mundo a poliomielite seja considerada erradicada, resta, ainda um muito pequeno número de países (sobretudo o Afeganistão, Nigéria e Paquistão) em que as condições sociais, religiosas e de guerra impediram a eficácia dos esforços de vacinação levando a que a patologia permaneça endémica nestas regiões. Esta situação, leva a que ocasionalmente tenham sido registados surtos noutros países, que têm origem em casos importados das zonas em que a doença permanece endémica atrasando ainda mais a efetiva erradicação da doença (Souza, V., *et al*, 2020; SNS, 2018).

No ano de 1988, a poliomielite era considerada endémica em 125 países com cerca de 350 000 casos anuais, foi então lançada uma iniciativa pioneira global de erradicação contra a poliomielite, atualmente a doença apenas é endémica em 3 países.(Cabeda *et al.*, 2014; Silveira, B., *et al* 2019).

Sendo assim, a vacinação é uma medida preventiva de extrema importância. Na década de 1960, desenvolveram-se duas vacinas distintas contra a poliomielite, a VOP (vacina oral contra a poliomielite) e a VIP (vacina inativa contra a poliomielite) esta última é constituída pelo poliovírus mas de forma inativa. A vacina de vírus vivos atenuados Sabin (VOP) e a vacina de vírus inativado Salk (VIP) são ambas vacinas trivalentes, ou seja, têm atividade contra o poliovírus 1, 2 e 3. Contudo mais tarde foi revelado que os vírus que constitui a VOP, vírus vivos atenuados, tem a possibilidade de se tornar virulentos para o sistema nervoso central, podendo mesmo causar paralisia nos indivíduos. Nos dias de hoje está em prática o plano de Endgame, plano esse que foi reformulado e teve início no ano de 2019 até ao ano 2023, com o plano de continuar a vacinação da população e substituir a administração da VOP pela VIP (Souza, V., *et al*, 2020 Cabeda *et al.*, 2014).

O poliovírus do tipo 3 não estando em circulação desde o ano 2012, foi considerado erradicado no ano de 2019, assim como o poliovírus do tipo 2, que foi considerado

mundialmente erradicado em 2015. Com isto, a vacina VOP trivalente, sofreu várias alterações passando a ser uma vacina monovalente, constituída e tendo ação contra o vírus PV1, contudo esta vacina só é usada em zonas endêmicas (Souza, V., *et al*, 2020 ; Silveira, B., *et al* 2019).

Mais recentemente perante o aparecimento de alguns surtos em zonas endêmicas foram desenvolvidas duas vacinas com o vírus vivo (nVOP e nVOP2), a nVOP, que durante o estudo e desenvolvimento da mesma foram usadas técnicas para diminuir a capacidade de o vírus se tornar neurovirulento (Souza, V., *et al*, 2020).

O surgimento de alguns casos de poliomielite em alguns países africanos, ressaltou a importância da vacinação sobretudo com a VIP (Cabeda *et al.*, 2014).

4.11. Meningite

A meningite é uma patologia onde há um processo inflamatório nas meninges, este processo inflamatório pode ter origem numa infecção viral, bacteriana ou mais raramente fúngica. Esta infecção nas membranas que protegem o cérebro e a medula tem um quadro variado de sintomas como febre, náuseas e vômitos, fadiga, dor de cabeça fortes, confusão mental entre outros (Nogueira J., *et all*, 1999; Peres LVC *et al.*, 2006).

Quando a meningite é de origem viral, a via de transmissão mais habitual é a via fecal-oral. A população mais propensa, e que apresenta um maior risco é a população infantil sobretudo em crianças com idade inferior a 5 anos (Peres LVC *et al.*, 2006).

A meningite quando resultante de um uma infecção bacteriana é bastante grave, podendo, se não tratada rapidamente, ter desfecho fatal. Contudo, uma meningite viral, provocada por vírus do grupo herpes ou por enterovírus apresenta o mesmo quadro clínico tornando virtualmente impossível o diagnóstico diferencial apenas com base nos sinais e sintomas clinicamente observáveis. Contudo, o tratamento da meningite nestas 3 situações é totalmente diferente exigindo antibioterapia quando a causa é bacteriana, antivirais quando a causa é uma infecção herpética e não requerendo qualquer terapia quando a se trate de uma infecção por enterovírus por esta ser de resolução espontânea não

necessitando assim nem de hospitalização nem de tratamento farmacológico (Nogueira, J., *et al.*, 1999; Pires *et al.*, 2017; CUF, 2013).

Os Enterovírus causam frequentemente meningites assépticas, que são mais frequentes durante as estações mais amenas. Além dos enterovírus, outros vírus como o Herpes Simplex, vírus Epstein-Barr provocam meningite, porém estes podem causar complicações neurológicas. No caso do vírus Herpes Simplex além de serem vírus com capacidade de provocar meningite asséptica, podem também levar ao desenvolvimento de uma encefalite herpética, que pode ter desfecho fatal (Nogueira, J., *et al.*, 1999).

Uma vez que o diagnóstico diferencial clínico não é possível, e que se trata de quadros clínicos emergentes e potencialmente fatais, o diagnóstico diferencial laboratorial assume especial relevância. Das técnicas disponíveis, pela sua sensibilidade, especificidade e rapidez, as técnicas de biologia molecular assumem especial relevância para a identificação do agente causador de meningite, permitindo uma intervenção terapêutica dirigida e em tempo clinicamente útil mesmo em ambiente de emergência hospitalar (Pires *et al.*, 2017).

5. Transmissão

A transmissão por parte dos Enterovírus é disseminada por diferentes tipos de contacto, como o contacto direto, indireto e concretamente através de aerossóis. A principal via de transmissão é através da via fecal-oral, por contacto com objetos ou então através de alimentos e água que se encontrem contaminados (Puenpa *et al.*, 2019; Bisseux *et al.*, 2018).

5.1. Aerossóis

Os aerossóis são um meio de transmissão usado por parte dos Enterovírus. Este contacto ocorre devido a presença de partículas que são eliminadas frequentemente através de espirros e tosse que formam uma espécie de aerossol. Quando este aerossol é inalado ele atinge o epitélio respiratório, podendo infectar os tecidos atingidos, e após replicação nestes tecidos, propagar-se a outros tecidos do hospedeiro, dando assim continuidade ao

ciclo de vida do Enterovírus e eventualmente a patologias clinicamente significativas (Puenpa *et al.*, 2019).

5.2.Contacto direto

O contacto direto ocorre quando o vírus (neste caso o Enterovírus) é transmitido de uma pessoa para a outra, sem envolver veículo inanimado. A transmissão é feita diretamente de uma pessoa para outra, através das mãos, sangue ou saliva.

5.3.Contacto indireto

O contacto indireto, ocorre quando a transmissão do vírus é efetuada através de um veículo inanimado sendo ele um objeto ou uma superfície. A transmissão do agente infeccioso pode ocorrer por exemplo através de termómetros, ou outros objetos comuns em meio hospitalar, que são usados por pessoas diferentes e que quando não devidamente higienizados podem levar a propagação do vírus. Este contacto indireto também ocorre fora do ambiente hospitalar através de outros objetos ou superfícies que não se encontram devidamente higienizadas, promovendo o desencadeamento de mais infeções e a transmissão do Enterovírus entre diferentes pessoas, alguns exemplos destes objetos e superfícies são os corrimões, as maçanetas das portas. Logo medidas de higienização e esterilização de superfícies são medidas fundamentais, que devem ser tomadas.

6. Tratamento

Para o tratamento das infeções por parte dos diferentes Enterovírus são usados distintos fármacos antivirais, corticoides, vacinas e administração intravenosa de imunoglobulinas.

6.1. Medidas de prevenção

Os cuidados de higiene são fundamentais para reduzir a prevalência por parte de muitas destas doenças, pois as classes socioeconómicas menos favorecidas são as mais afetadas, sendo o cuidado e a higiene muito revelantes. De ressaltar que a higienização das mãos é muito importante para diminuir a transmissão da doença. Outra medida de prevenção é a vacinação quando está disponível e é possível a sua administração de forma a prevenir, uma doença provocada pela infeção por parte de um dos Enterovírus (L'Huillier *et al.*, 2015).

6.2. Vacinas

Para travar a poliomielite provocada pelo poliovírus foi produzida uma primeira vacina contra a poliomielite, constituída por o vírus inativo da qual resultou numa diminuição da incidência da patologia de cerca de 90%. No entanto na tentativa da produção de uma vacina, mas com o vírus atenuado (vírus com a capacidade de se replicar dentro do organismo, mas não provocar alterações neurológicas) levou a que se desenvolvessem inúmeras vacinas. Porém a vacina oral com o vírus atenuado demonstrou facilidade na administração, segurança na utilização, mas sobretudo uma extrema eficácia, diminuindo assim os números de uma doença endémica. Em Portugal a vacina contra a poliomielite ainda é administrada embora a doença esteja erradicada em Portugal. A vacinação contra a poliomielite é composta por 5 doses, a primeira aos 2 meses, a segunda aos 4 meses, a terceira aos 6 meses, a quarta aos 18 meses e a quinta e última aos 5 anos de idade. Trata-se de uma vacina VIP ou seja uma vacina de vírus inativo contra a poliomielite (Cabeda *et al.*, 2014; Silveira *et al.*, 2019)

O Enterovírus A71 é um dos Enterovírus que provoca vários surtos em vastos países, sendo que no continente asiático, são relatados vários surtos. (Baggen *et al.*, 2018). A

vacinação é uma medida de prevenção muito importante. No maior país do continente asiático, mais concretamente na China foram estudadas e desenvolvidas duas vacinas de Enterovírus A71 que foram aprovadas para uma infeção mais gravosa sobretudo na população mais nova, mais concretamente a população infantil, uma vez que este tipo de vírus afeta sobretudo a população mais nova (Taravilla *et al.*, 2019). No final de 2015 na China, uma vacina para o EV-A71 estava ao dispor para vacinar a população, demonstrando ter uma eficácia de 80% face a HFMD grave e cerca de 90% de proteção e eficácia face ao HFMD mas num estado menos gravoso ou seja uma infeção mais branda. Contudo com a diminuição dos casos de HFMD provocada por o EV-A71, irá levar a um aumento dos casos de HFMD provocado por CV-A6, uma vez que não há vacina até ao momento que trave esta infeção (Brown *et al.*, 2020).

6.3. Inibidores do ciclo de vida

Uma das formas de travar e assim impedir a replicação do vírus em concreto do Enterovírus A71 é a inibição dos recetores celulares na qual este se liga para entrar na célula hospedeira, por exemplo utilizando anticorpos que bloqueiem esses recetores. São eles o SCARB2, PSGL-1 e DC-SIGN. O uso destes anticorpos mostra ser eficaz e assim impedir a infeção por EV-A71 (Lin *et al.*, 2019).

A proteína viral 2BC e a proteína viral 2B depois de clivada demonstrou provocar alterações na membrana e inibir a libertação de proteínas celulares de células infetadas. A proteína viral 2C tem um papel importante uma vez que está envolvida na replicação viral, e também assegura a atividade da trifosfatase do nucleósido e está envolvido na síntese de cadeias de RNA de carga negativa. Duas moléculas semelhantes ao nucleótido adenosina, (o metrifudil e N6-benziladenosina) têm a capacidade de inibir a proteína 2C e assim travar a infeção por EV-A71 (Lin *et al.*, 2019).

O rupintrivir tem a capacidade de inibir a proteína 3C e desta forma não há à formação da proteína 3C_{pró}, e como esta proteína está envolvida no processo de replicação acaba por ser inibido e impedir a infeção por Enterovírus A71. Este fármaco também inibe o EV-A a EV-D, e RV-A a RV-C (Lin *et al.*, 2019).

6.4.Fármacos

O pleconaril é um fármaco capaz de inibir o EV-B, EV-C, EV-D68, RV-A e RV-B. Um fármaco similar, o vapendavir demonstrou inibir EV-A71, EV-C, EV-D68, RV-A e RV-B. O pirodavir é capaz de inibir o EV-A a EV-D e também demonstra inibir o RV-A e RV-B. O pocapavir é capaz de inibir o EV-B e EV-C (Baggen *et al.*, 2018; Lin *et al.*, 2019).

Um dos fármacos que inibem a replicação viral é a fluoxetina, contudo este fármaco apesar de inibir a replicação dos Enterovírus da espécie B e D não impede a replicação dos Enterovírus A, C revelando assim não ser eficaz no tratamento destas espécies bem como de rinovírus. Outro fármaco antiviral usado é o pleconaril este fármaco impede a entrada dos Enterovírus para o interior das células, impedindo uma infecção por parte deste vírus, contudo este fármaco não consegue impedir uma infecção por parte do Enterovírus A71 e também uma infecção provocada pelo Enterovírus D68. Há outros fármacos no entanto não são tão eficazes quanto os fármacos acima mencionados (Taravilla *et al.*, 2019).

7. Diagnóstico molecular

Um diagnóstico rápido é essencial para fornecer informações acerca do vírus que provocou a infecção, mas também para direcionar a terapêutica de forma a que o tratamento tenha mais probabilidades de ser bem-sucedido.

Cerca de 50% das infecções por Enterovírus são assintomáticas e de resolução espontânea sem necessidade de tratamento e de hospitalização. Contudo os casos de infecção grave e a similaridade dos sinais e sintomas das infecções graves obrigam à utilização de diagnósticos rápidos e sensíveis como o diagnóstico molecular. Também os casos sintomáticos, mas de resolução espontânea necessitam de um diagnóstico rápido para discriminar outras patologias (graves) com sintomas idênticos. Um bom exemplo é a meningite: se por Enterovírus tem resolução espontânea, mas se bacteriana ou vírica tem que ser tratada com fármacos específicos ou pode ser fatal (Faleye *et al.*, 2016).

A detecção e o diagnóstico podem ser feitos através de testes de serologia como a técnica de ELISA e testes de neutralização. Também as culturas celulares são outra técnica de detecção, porém esta é mais usada em investigação e não tão usual em diagnóstico, uma vez que exige que haja o crescimento dos vírus, e sendo este mais demorando, limita a rapidez do diagnóstico. Outra técnica usada é o PCR (polymerase chain reaction). Esta permite a detecção através de técnicas de biologia molecular como a detecção de moléculas de RNA viral utilizando como alvo sequências virais específicas, como a do gene estrutural VP1 e a região 5' não codificada. Devido à sua enorme sensibilidade e especificidade tornou-se a técnica de eleição para o diagnóstico viral em geral e dos Enterovírus em particular (Santa Casa; Harvala *et al.*, 2018).

No caso de a amostra utilizada ser o LCR além de as amostras usadas nos testes PCR serem naturalmente reduzidas, ainda menores são no caso de serem amostras de LCR de crianças e neonatos. Uma vez que os Enterovírus afetam sobretudo a população infantil, estando normalmente associado a quadros de meningite. Dada a dimensão da amostra pode-se correr o risco de a amostra não ser representativa da situação clínica. Uma alternativa ao uso do LCR é usar amostras de fezes, sangue ou secreções respiratórias. As amostras de fezes permitem a detecção de Enterovírus sendo uma alternativa ao uso do LCR em casos de infecção do sistema nervoso central por parte do Enterovírus (Toczyłowski *et al.*, 2020; Puenpa *et al.*, 2019; Harvala *et al.*, 2018).

7.1.PCR / RT-PCR

Esta técnica usada no diagnóstico de Enterovírus tem uma sensibilidade e especificidade elevadas, além de ser uma técnica rápida torna-se assim uma vantagem o uso desta técnica, contudo esta técnica tem um custo elevado, sendo uma desvantagem. Sendo assim é considerada a técnica de eleição para o diagnóstico de infecções provocadas por Enterovírus, agentes virais causadores de infecções no sistema nervoso central (SNC) (Amorim *et al.*, 2003; Osterback *et al.*, 2013; Faleye *et al.*, 2016).

Uma técnica PCR implica a presença de uma molécula de DNA termoestável, primers específicos para uma zona do DNA, e a Taq polimerase. Os primers ligam-se por emparelhamento a cadeia de DNA. O PCR é um método *in vitro*, é um processo repetitivo

em que ocorrem três reações em três temperaturas distintas, passando por três ciclos distintos: a desnaturação a uma temperatura de 96°C, anelamento a uma temperatura de 55-65°C, e extensão a uma temperatura de 72°C (Wilkin, 2016).

A técnica RT-PCR, apenas implica o uso da transcriptase reversa (RT), uma vez que o Enterovírus é um vírus de cadeia de RNA implicando o uso desta para a passagem para uma molécula de DNA complementar denominada de cDNA. A transcriptase reversa é formulada para transcrever a molécula de RNA em DNA, a temperatura desta etapa é realizada entre os 50°C e os 55°C, havendo assim um maior rendimento da cadeia de DNA complementar. A replicação com a enzima DNA polimerase é realizado inicialmente a uma temperatura elevada, de forma a reduzir a amplificação de produtos não específicos. Sendo este um ensaio de diagnóstico essencial para a detecção de Enterovírus (Donia, 2018).

7.1.1 RT-qPCR

O RT-qPCR, permite ver o resultado à medida que a ampliação da sequência de ácidos nucleicos está a ser realizada, daí o nome de PCR em tempo real. A técnica de PCR permite amplificar regiões específicas do genoma do agente viral (Трушкин *et al.*, 2013).

O RT-qPCR é o diagnóstico molecular mais usado pois é mais sensível do que uma cultura viral para a detecção de RNA viral, outra vantagem é a rapidez de realizar este diagnóstico face a culturas. Esta técnica de amplificação pode ser usada em diferentes amostras como líquido cefalorraquidiano, fluido da nasofaringe, urina, fezes e também sangue. A elevada sensibilidade, especificidade e a rapidez faz da técnica, uma técnica de eleição para a detecção de DNA ou RNA, neste caso é detecção de RNA microbiano nas amostras clínicas (de Crom *et al.*, 2016).

O método RT-qPCR tem várias vantagens face ao PCR convencional tais como a maior sensibilidade, a maior rapidez na obtenção da resposta do diagnóstico (Osterback *et al.*, 2013; Faleye *et al.*, 2016; Amorim *et al.*, 2002).

7.2.Nested PCR

Neste ensaio a amostra usada é o produto de uma reação de PCR usando um segundo par de primers. Esta técnica permite aumentar a sensibilidade e a especificidade do ensaio. Num estudo realizado (Amorim *et al.*, 2003), é demonstrado os resultados do diagnóstico de infecção enteroviral do SNC, usando dois métodos de diagnóstico, o RT-PCR e o Nested-PCR. A amostra utilizada é o LCR, o estudo demonstrou que quando comparados os resultados do ensaio RT-PCR e do Nested-PCR é avaliado que com as mesmas amostras, a percentagem de resultados positivos num RT-PCR é de 13%, mas, no entanto, num ensaio Nested-PCR a percentagem de casos positivos é de 44%. Demonstrando assim, que com o ensaio RT-PCR há 36% de falsos negativos, ou seja 36% dos casos que quando diagnosticados com a ajuda do ensaio RT-PCR deram negativo para o Enterovírus. Contudo com o uso do ensaio de diagnóstico Nested-PCR demonstrou que esses casos eram casos positivos. Demonstrando assim ser o método de diagnóstico mais adequado para o diagnóstico de infecções por Enterovírus, uma vez que este tem uma maior sensibilidade (Amorim *et al.*, 2003).

7.3.Multiplex PCR

O ensaio multiplex PCR é uma técnica de biologia molecular, que amplifica várias regiões alvo das moléculas de DNA num único tubo, usando distintos primers na mesma mistura, permitindo assim amplificar distintos fragmentos de DNA. Esta estratégia permite assim amplificar simultaneamente vários alvos do mesmo agente (ganhando fiabilidade) ou amplificar o DNA do agente em paralelo com um DNA exógeno introduzido na amostra como controlo interno da extração e amplificação. O multiplex PCR pode ainda ser implementado com deteção em tempo real (multiplex qPCR) ou utilizando técnicas de deteção pós- amplificação (hibridização ou eletroforese por exemplo) (Huang *et al.*, 2018).

De acordo com Meggiolaro, (Meggiolaro *et al.*, 2020) a sensibilidade do ensaio RT-qPCR é superior a do Multiplex PCR, uma das causas apontadas é a diminuição da eficácia na amplificação de distintas partes da cadeia de DNA (Meggiolaro *et al.*, 2020).

Porém num estudo onde foram usadas as duas técnicas de diagnóstico, o RT-qPCR e o Multiplex PCR para a detecção de Enterovírus, foi observado uma maior sensibilidade por parte do Multiplex PCR. Com uma sensibilidade de 80.7% a técnica de Multiplex PCR e uma sensibilidade de 65.9% por parte de RT-qPCR. Contudo este estudo aliou a técnica Multiplex PCR com a detecção por separação por eletroforese capilar, sendo essa técnica de detecção apontada como a possível causa do aumento da sensibilidade (You *et al.*, 2021)

Uma das principais vantagens do ensaio multiplex PCR é permitir a detecção de distintos vírus como o Enterovírus e o vírus Epstein-Barr. Dado que maior parte das infecções por Enterovírus são encefalites e meningites, que afetam as crianças, a amostra utilizada para o diagnóstico é o LCR. Esta amostra em crianças tem sempre um volume bastante reduzido, pelo que a capacidade desta técnica de Multiplex PCR, para detetar vários alvos de ácidos nucleicos numa mesma amostra de reduzido volume apresenta a vantagem de permitir, não apenas a detecção de Enterovírus mas também de outros vírus que possam estar a causar a infecção no SNC como os vírus do grupo herpes (You *et al.*, 2021; Wells e Coyne, 2019).

III. Discussão

A utilização de técnicas de diagnóstico é essencial para a detecção de infecções provocadas por enterovírus, pois grande parte destas infecções não requerem cuidados hospitalares pelo que o seu diagnóstico precoce contribui para a diminuição das hospitalizações.

Das distintas técnicas de PCR, o multiplex PCR é uma mais valia, pois permite não só averiguar a presença de uma infecção provocada por enterovírus, mas também permite detetar a presença de outros vírus e até bactérias, possibilitando o diagnóstico preciso mesmo em situações em que os sinais clínicos são similares como é o caso das meningites.

Uma medida para travar estas infecções é a vacinação, porém apenas algumas vacinas estão disponíveis para impedir a transmissão de algumas doenças provocadas por Enterovírus, não controlando a presença de muitas outras infecções provocadas por outros enterovírus. Sendo as medidas de prevenção, como as de higienização, fundamentais para prevenir o aparecimento destas infecções, que afetam sobretudo a população infantil, sendo que estas infecções são mais frequentes nas estações com temperaturas mais amenas.

Outra alternativa para além das vacinas são alguns fármacos que têm a capacidade de inibir a replicação dos enterovírus, e assim travar a infecção.

A patologia provocada por enterovírus mais frequente nas idades pediátricas é doença mão pé boca é uma patologia autolimitada, assim como maior parte das infecções provocadas por enterovírus. Porém uma infecção enteroviral pode também provocar quadros de meningite, sendo que os enterovírus são responsáveis por cerca de 90% das meningites provocadas por vírus, sendo fundamental o diagnóstico destas patologias, para direcionar a terapêutica.

IV. Conclusão

A frequência das infecções por enterovírus apresentam variações sazonais, com os surtos a apresentarem-se mais frequentes e mais graves nos períodos de verão-outono, o que pode estar associado à temperatura mais amena, sem que, contudo, esta relação esteja demonstrada. Contudo, e apesar da evidente sazonalidade, as infecções podem ocorrer durante todo o ano e o mesmo se verifica quanto ao aparecimento de surtos.

As infecções provocadas por enterovírus estão identificadas como causadoras de múltiplas patologias como Meningite, Encefalite, Doença mão-pé-boca, Poliomielite, Herpangina, Febre aftosa, Miocardite, Mielite flácida, Pleurodinia, Sepsis neonatal e Conjuntivite hemorrágica. Das patologias causadas por estes vírus, com a erradicação da poliomielite do mundo desenvolvido, assume particular relevo, pela sua frequência em idades pediátricas, a meningite. Este relevo ocorre, não pela gravidade da patologia causada, a qual no caso da infecção por Enterovírus é autolimitada e de resolução espontânea, mas porque a infecção por Enterovírus origina um quadro clinicamente indistinguível dos quadros clínicos associados à meningite bacteriana ou à meningite por vírus do grupo herpes. Assim, o diagnóstico laboratorial com a identificação rápida, sensível e específica destas infecções é essencial para a correta gestão clínica destes casos.

É, pois, importante realçar que uma boa disponibilização de modos de diagnóstico adequados é essencial para a boa gestão clínica destas infecções.

A rapidez do método de diagnóstico é uma característica essencial para a sua utilidade clínica em situações consideradas de emergência médica como são as meningites. Só um método rápido permitirá aos clínicos basearem a sua escolha terapêutica nos resultados laboratoriais. Como a escolha terapêutica é diferente nos casos das meningites bacterianas, das meningites herpéticas e nas meningites por enterovírus, resulta que a rapidez do método (minutos a horas) é crítica para a sua utilidade.

Também a sensibilidade e especificidade do método laboratorial afeta de modo significativo a utilidade do ensaio. Com efeito, o facto de a amostra disponível (Líquido Cefalo-raquidiano) ser uma amostra de complexidade muito variável, diluída e colhida à distância do local da infecção (meninge) apresenta desafios analíticos substanciais. Por um

lado, qualquer partícula viral é clinicamente significativa numa amostra que já não é necessariamente representativa da concentração vírica no local da infeção (meninge).

Por outro lado, a identificação correta do vírus em causa deverá ocorrer, mesmo quando existem mais de 100 variantes de enterovírus com sequências genéticas distintas e que ainda assim importa identificar.

Neste cenário, os métodos baseados no PCR assumem uma grande relevância pela sua elevada rapidez, reprodutibilidade, sensibilidade e especificidade. Contudo não chega executar um ensaio de PCR simples já que: 1) O facto de se tratar de vírus de RNA obriga à realização de ensaios de RT-PCR; 2) A necessidade de rapidez obriga à realização de ensaios de PCR em Tempo Real (qPCR); 3) A variabilidade genética dos enterovírus exige que os primers sejam degenerados; 4) a extrema sensibilidade exigida aconselha a realização de ensaios nested. Por este motivo o ensaio ideal para realizar estes diagnósticos diferenciais será um Nested-RT-qPCR recorrendo a primers degenerados, seguido ou não de qPCR para cada um dos vírus herpes (ou multiplex-PCR que identifique os vários tipos de vírus herpes) e de um PCR para o gene 16SRNA para identificar bactérias.

V. Bibliografia

Amorim, M. L. *et al.* (2002). EVALUATION OF REAL-TIME-PCR BASED ASSAYS FOR THE DETECTION OF HERPESVIRUS AND ENTEROVIRUS, p. 6.

Amorim, M. L. *et al.* (2003). NESTED RT-PCR VERSUS SINGLE RT-PCR IN THE DIAGNOSIS OF ENTEROVIRAL INFECTION OF THE CNS, p. 36.

B'Krong, N. T. T. C. *et al.* (2018). Enterovirus serotypes in patients with central nervous system and respiratory infections in Viet Nam 1997-2010. *Virology Journal*. *Virology Journal*, 15(1), pp. 1–8.

Baggen, J. *et al.* (2018). The life cycle of non-polio enteroviruses and how to target it. *Nature Reviews Microbiology*. Springer US, 16(6), pp. 368–381.

Bisseux, M. *et al.* (2018). Monitoring human enteric viruses in wastewater and relevance to infections encountered in the clinical setting: A one-year experiment in central France, 2014 to 2015. *Eurosurveillance*, 23(7), pp. 1–11.

Brown, D. M., Zhang, Y. e Scheuermann, R. H. (2020). Epidemiology and sequence-based evolutionary analysis of circulating non-polio enteroviruses. *Microorganisms*, 8(12), pp. 1–23.

Cabeda, J. M. *et al.* (2014). Picornavírus. em *Microbiologia Médica - vol.2*, pp. 116–128.

Chen, B. S. *et al.* (2020). Enterovirus and Encephalitis. *Frontiers in Microbiology*, 11(February), pp. 1–15.

Chuang, Y. Y. e Huang, Y. C. (2019). Enteroviral infection in neonates. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*. Elsevier Taiwan LLC, 52(6), pp. 851–857.

Cifuentes, J. O. e Moratorio, G. (2019). Evolutionary and Structural Overview of Human Picornavirus Capsid Antibody Evasion. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 9(August), pp. 1–11.

de Crom, S. C. M. *et al.* (2016). Enterovirus and parechovirus infection in children: a brief overview. *European Journal of Pediatrics*. *European Journal of Pediatrics*, 175(8), pp. 1023–1026.

CUF (sem data). Meningite. [Em linha]. Disponível em <<https://www.cuf.pt/saude-a-z/meningite>>.

Donia, D. T. (2018). qRT-PCR for enterovirus detection: Conversion to ultrafast protocols. *Journal of King Saud University - Science*. King Saud University, 30(2), pp. 180–184.

Elrick, M. J., Pekosz, A. e Duggal, P. (2021). Enterovirus D68 molecular and cellular biology and pathogenesis. *Journal of Biological Chemistry*. Elsevier B.V, 296, p. 100317.

Faleye, T. O. C., Adewumi, M. O. e Adeniji, J. A. (2016). Defining the enterovirus diversity landscape of a fecal sample: A methodological challenge? *Viruses*, 8(1), pp. 1–11.

Ferreira, W. et al (2010). *Microbiologia*. Editado por Lidel.

Franco, S. (2020). *DOENÇA MÃO-PÉ-BOCA NA PRIMEIRA INFÂNCIA – RELATO DE CASO*. *SELL Journal*. Faculdade Sete Lagoas.

Good, C., Wells, A. I. e Coyne, C. B. (2018). Enteroviruses: A Gut-Wrenching Game of Entry, Detection, and Evasion. *bioRxiv*, (March), pp. 1–12.

Harvala, H. *et al.* (2018). Recommendations for enterovirus diagnostics and characterisation within and beyond Europe. *Journal of Clinical Virology*, 101, pp. 11–17.

Huang, H. S. *et al.* (2018). Multiplex PCR system for the rapid diagnosis of respiratory virus infection: systematic review and meta-analysis. *Clinical Microbiology and Infection*, 24(10), pp. 1055–1063.

Huang, S. W., Cheng, D. e Wang, J. R. (2019). Enterovirus A71: Virulence, antigenicity, and genetic evolution over the years. *Journal of Biomedical Science*. Journal of Biomedical Science, 26(1), pp. 1–9.

Huang, W. T. *et al.* (2010). Epidemic Pleurodynia Caused by Coxsackievirus B3 at a Medical Center in Northern Taiwan. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*. Taiwan Society of Microbiology, 43(6), pp. 515–518.

ICTV (sem data). Enterovirus. [Em linha]. Disponível em <https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_online_report/positive-sense-rna-

viruses/w/picornaviridae/681/genus-enterovirus>.

J. Aguiar Nogueira, J. simões, N. Pontinha, A. Pinto, A. Freitas - Fonseca, H. L. (1999). Diagnóstico Etiológico da Meningite Viral, 23, pp. 341–344.

Kobayashi, K. e Koike, S. (2020). Cellular receptors for enterovirus A71. *Journal of Biomedical Science*. *Journal of Biomedical Science*, 27(1), pp. 1–12.

L’Huillier, A. G. *et al.* (2015). Survival of rhinoviruses on human fingers. *Clinical Microbiology and Infection*, 21(4), pp. 381–385.

Lecoq H (2001). Découverte du premier virus, le virus de la mosaïque du tabac: 1892 ou 1898?

Lin, J. Y., Kung, Y. A. e Shih, S. R. (2019). Antivirals and vaccines for Enterovirus A71. *Journal of Biomedical Science*. *Journal of Biomedical Science*, 26(1), pp. 1–7.

Meggiolaro, M. N. *et al.* (2020). Since January 2020 Elsevier has created a COVID-19 resource centre with free information in English and Mandarin on the novel coronavirus COVID- 19 . The COVID-19 resource centre is hosted on Elsevier Connect , the company ’ s public news and information , (January).

Minor, P. D. (1996). Poliovirus biology. *Structure*, 4(7), pp. 775–778.

Muehlenbachs, A., Bhatnagar, J. e Zaki, S. R. (2015). Tissue tropism, pathology and pathogenesis of enterovirus infection†. *Journal of Pathology*, 235(2), pp. 217–228.

Nascimento, O. J. (2019). Enterovirus D68 é uma possível causa de paralisia flácida aguda - PEBMED. [Em linha]. Disponível em <<https://pebmed.com.br/enterovirus-d68-e-uma-possivel-causa-de-paralisia-flacida-aguda/>>. [Consultado em 27/01/2021].

O Sterback, R. *et al.* (2013). Simultaneous detection and differentiation of human rhino- and Enteroviruses in clinical specimens by real-Time PCR with locked nucleic acid probes. *Journal of Clinical Microbiology*, 51(12), pp. 3960–3967.

Oberste, M. S. *et al.* (1999). Molecular Evolution of the Human Enteroviruses: Correlation of Serotype with VP1 Sequence and Application to Picornavirus Classification. *Journal of Virology*, 73(3), pp. 1941–1948.

Peng, Q. *et al.* (2016). Molecular epidemiology of the enteroviruses associated with hand, foot and mouth disease/herpangina in Dongguan, China, 2015. *Archives of Virology*. Springer Vienna, 161(12), pp. 3463–3471.

Peres LVC, C. T., Barbosa HA, G. M. e Timenetsky MCST, C. A. (2006). Meningite viral. *Boletim Epidemiológico Paulista (Bepa)*, 30, pp. 9–12.

Pires, F. R. *et al.* (2017). Comparison of enterovirus detection in cerebrospinal fluid with Bacterial Meningitis Score in children. *Einstein (Sao Paulo, Brazil)*, 15(2), pp. 167–172.

Puenpa, J. *et al.* (2019). The History of Enterovirus A71 Outbreaks and Molecular Epidemiology in the Asia-Pacific Region. *Journal of Biomedical Science*. Journal of Biomedical Science, 26(1), pp. 1–11.

Richter, J., Tryfonos, C. e Christodoulou, C. (2019). Molecular epidemiology of enteroviruses in Cyprus 2008-2017. *PLoS ONE*, 14(8), pp. 1–18.

Rodrigues, A. (2019). Influência de Polimorfismos em Genes do Sistema Imunológico na Infecção por Rinovírus.

Royston, L. e Tapparel, C. (2016). Rhinoviruses and respiratory enteroviruses: Not as simple as ABC. *Viruses*, 8(1).

Santos, A. M. (2019). Detecção de Rinovírus em amostras de ar interior e exterior.

Silveira, B., *et al* (2019). Atualização em poliomielite Update on poliomyelitis, 29(Supl 13), pp. 74–79.

SNS (2018). Poliomielite. [Em linha]. Disponível em <<https://www.sns24.gov.pt/tema/doencas-infecciosas/poliomielite/>>.

Souza, V., *et al* (2020). Poliomyelitis eradication in four stages. *Cadernos de Saude Publica*, 36, pp. 1–10.

Sun, J., Hu, X. Y. e Yu, X. F. (2019). Current understanding of human enterovirus D68. *Viruses*, 11(6).

Taravilla, C. N. *et al.* (2019). Enterovirus A71 infection and neurologic disease, Madrid, Spain, 2016. *Emerging Infectious Diseases*, 25(1), pp. 25–32.

Team, M. K. (2020). Herpangina | Causa | Sintoma | Tratamento caseiro | Ada. [Em linha]. Disponível em <<https://ada.com/pt/conditions/herpangina/>>. [Consultado em 25/01/2021].

Toczyłowski, K. *et al.* (2020). Pediatric enteroviral central nervous system infections in Białystok, Poland: Epidemiology, viral types, and drivers of seasonal variation. *Viruses*, 12(8), pp. 1–18.

Vyas, J. M. (2018). Mielite flácida aguda - Enciclopédia - 2021. [Em linha]. Disponível em <<https://pt.cc-inc.org/007743.html>>. [Consultado em 27/01/2021].

Wells, A. I. e Coyne, C. B. (2019). Enteroviruses: A gut-wrenching game of entry, detection, and evasion. *Viruses*, 11(5), pp. 1–20.

Wilkin, D. (2016). The Polymerase Chain Reaction - Advanced | CK-12 Foundation. 9.3 *The Polymerase Chain Reaction - Advanced*.

You, D. *et al.* (2021). Prospective case-control study of enterovirus detection differences in children's cerebrospinal fluid between multiplex PCR and real-time RT-PCR assay. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, 35(2), pp. 1–5.

Yuan, J. *et al.* (2018). Enterovirus A71 proteins: Structure and function. *Frontiers in Microbiology*, 9(FEB), pp. 1–12.

Трушкин, Е. В. *et al.* (2013). Современные Технологии in Vitro Тестирования Лекарств in Vitro: Использование Микробиореакторов. *Биотехнология*, (1), pp. 51–58.

