

Brote epidémico de meningitis viral causado por echovirus tipo 4 en la provincia de Misiones

S. L. GRENÓN¹, M. L. ROBLEDO¹, M. H. von SPECHT^{1*}, D. M. CISTERNA², C. L. LEMA², M.C. FREIRE²

¹Hospital Provincial de Pediatría, Departamento de Microbiología Facultad de Ciencias Exactas, Químicas y Naturales (FCEQyN), Universidad Nacional de Misiones. Av. Mariano Moreno 110 (3300) Posadas, Misiones; ²Servicio de Neurovirosis, Departamento de Virología, INEI-ANLIS "Dr. Carlos G. Malbran". Av. Vélez Sarsfield 563 (1281)

Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina.

*Correspondencia. E-mail: marthatovs@yahoo.com.ar

RESUMEN

Se realizó un estudio retrospectivo a fin de describir un brote epidémico de meningitis causado por enterovirus, que comprometió a 143 niños de 1 mes a 14 años internados en el Hospital Pediátrico de Posadas (Misiones) con diagnóstico de meningitis aséptica, entre agosto y diciembre de 2005. Se observó un aumento de casos entre las semanas 33 a 50, con un pico máximo entre las semanas 47 y 48, lo que confirmó el brote. La mediana de edad de los niños afectados fue de 8 años y el 55,2% fueron varones. El 80% de los casos se observó entre escolares (5 a 14 años). El promedio del tiempo de internación fue de $4,5 \pm 1,7$ días, y no se registraron fallecidos. Los LCR se estudiaron mediante examen citoquímico y estudios bacteriológicos y virológicos (aislamiento viral, RT-PCR anidada e identificación molecular mediante secuenciación génica). Los recuentos de células en LCR variaron entre 6 y 5040 células/mm³, el 92% fueron inferiores a 500 células/mm³ y el 43,5% mostró predominio linfocitario. El 56% presentó concentraciones de glucosa normal, con proteínas ligeramente elevadas. El 28% de las muestras estudiadas por cultivo (17/60) mostró efecto citopático, compatible con enterovirus. La RT-PCR anidada permitió detectar enterovirus en un 73% de las muestras (43/59), con 6 casos que se tipificaron como echovirus tipo 4. El índice de positividad al combinar ambas técnicas alcanzó el 83%.

Palabras clave: meningitis viral, ECHO 4, brote

ABSTRACT

Outbreak of viral meningitis caused by echovirus type 4 in Misiones province. A descriptive retrospective study was carried out to describe an epidemic outbreak of enteroviral meningitis in Misiones. We reviewed records of 143 children from 1 month to 14 years of age who were hospitalized with aseptic meningitis in the Pediatric Hospital of Posadas from August to December 2005. Increased number of cases was observed between weeks 33 to 50 which reached a maximum peak in weeks 47 and 48, confirming an outbreak. The median of age was 8 years old, 55.2% were males. Eighty percent of cases were in 5 to 14 years old children. The average length of time spent in the hospital was 4.5 ± 1.7 days, no deaths were reported. We performed cell counts, chemical and bacterial studies of CSF, and culture or RT-Nested/PCR for enteroviruses. Isolates were serotyped by RT-PCR amplification and genetic sequencing. Cell counts were from 6 to 5040 cells/mm³. Ninety two percent had less than 500 cells/mm³ and 43.5% had lymphocyte predominance. Glucose levels were normal with slightly elevated protein counts in 56% of cases. Of the cultured samples, 28% (17/60) showed cytopathic effect compatible with enterovirus. RT-n-PCR detected enterovirus in 73% (43/59) of the analyzed CSF. Echovirus type 4 was identified in 6 of them. The positive indicator obtained by combining both techniques was 83% (58/70).

Key words: viral meningitis, ECHO 4, outbreak

INTRODUCCIÓN

La meningitis viral o aséptica es considerada una de las afecciones más frecuentes del sistema nervioso central y constituye un síndrome que puede ocurrir en forma esporádica o en grandes epidemias. Es de rápida difusión y afecta fundamentalmente a la población infantil (13, 36, 40, 42, 43). Los principales agentes causales son los diferentes miembros del género *Enterovirus* (EV) (familia *Picornaviridae*), principalmente los enterovirus no polio (EVnP).

Los enterovirus incluyen más de 70 serotipos, pero solamente unos pocos causan meningitis aséptica en una comunidad dada y durante un tiempo, probablemente por la diferencia entre el nivel de infección en esa comunidad (inmunidad poblacional), la inmunidad del huésped y, tal vez, el neurotropismo de la cepa viral (1, 15, 17, 27, 32, 39). Dentro del grupo de EVnP, los echovirus 4, 6, 9, 11 y 30 son reconocidos como productores de grandes epidemias y los coxsackievirus A y B como productores de brotes, aunque con menor incidencia en la población. Estos agentes presentan un comportamiento endemo-

epidémico; existen serotipos que persisten epidémicos durante uno o dos años y coexisten con otras cepas de menor circulación (1, 15, 29, 32, 37).

Usualmente uno a tres serotipos de EVnP predominan en cada estación, y esto varía de una región a otra. Algunos serotipos se aíslan con baja frecuencia en una misma localidad durante años, mientras que otros han producido epidemias, para desaparecer en la siguiente temporada y a lo largo de varios años (21).

Los brotes de meningitis por enterovirus no se asocian con secuelas (excepto en inmunodeprimidos), causan enfermedades de corta duración, afectan a un elevado número de personas y producen grandes pérdidas económicas (34).

La meningitis viral se observa con mayor frecuencia en niños de nivel socioeconómico bajo, fundamentalmente asociada a condiciones higiénicas y sanitarias deficientes, aunque puede presentarse en cualquier estrato social (28).

En Argentina, las meningoencefalitis son enfermedades sujetas a notificación obligatoria desde 1960 (ley N° 15.465). Las meningitis virales ocurren como casos esporádicos a lo largo de todo el año y presentan un componente estacional regular que se corresponde con un aumento de la notificación de casos durante el otoño y la primavera (período en el cual se manifiestan los brotes) (19).

Se reconoce que los mecanismos de transmisión de EV no están totalmente dilucidados y que la especie y la dosis infectante condicionan las vías y el período de eliminación del virus por secreciones orofaríngeas y heces. La vía fecal-oral a través de las manos, de persona a persona, es la forma predominante y es el mecanismo de transmisión que mejor explica la distribución de casos en el brote que describimos, donde se evidencia un patrón de transmisión más escolar que familiar, aunque no puede excluirse el contagio por secreciones faríngeas (9, 21, 23).

En nuestro país se detectaron varios brotes de meningitis por enterovirus en distintas provincias; entre ellas, Buenos Aires (echovirus 30, año 2003 y 2004); Mendoza, Córdoba y Neuquén (echovirus 30, año 2004) (11, 19, 35, 39).

Si bien el echovirus tipo 4 ha sido detectado como agente causal de brotes epidémicos en todo el mundo en décadas pasadas (12, 15, 24, 33, 42), su circulación en nuestro país no había sido denunciada hasta 1996, año en que se informó el primer brote por este agente en la Argentina, en la provincia de Tucumán (10). Misiones no había informado brotes hasta la fecha.

El estudio virológico es excepcional en nuestra provincia, razón por la cual se desconoce la real importancia de los virus como agentes productores de casos esporádicos y de brotes de meningitis. Esta situación dificulta la aplicación de acciones destinadas a lograr un

mejor control de los casos una vez que han aparecido y a prevenir la aparición de nuevos eventos, para contribuir a evitar el uso incorrecto de antibióticos.

Con el objeto de dar a conocer este hecho presentamos los aspectos epidemiológicos de un brote de meningitis aséptica que motivó la hospitalización de 143 niños en el Hospital Provincial de Pediatría "Dr. Fernando Barreyro" de la ciudad de Posadas, Misiones, entre agosto y diciembre de 2005.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se realizó un estudio descriptivo de carácter retrospectivo, analítico y observacional, avalado por el Comité de Ética del Hospital de Pediatría de Misiones.

Definición de caso

Caso sospechoso: síndrome caracterizado por fiebre de comienzo repentino, con signos y síntomas de irritación meníngea, pleocitosis en líquido cefalorraquídeo (LCR), aumento o no de proteínas, con glucosa normal y ausencia de bacterias piógenas.

Caso confirmado: caso sospechoso en el cual se detecta enterovirus en LCR, materia fecal o hisopado rectal (41).

La pleocitosis se definió por la presencia de más de 5 leucocitos/mm³.

Población estudiada

La población en estudio estuvo constituida por 143 niños de edades comprendidas entre 1 mes y 14 años y 11 meses, que requirieron ser hospitalizados y que cumplían con la definición de caso.

En todos los pacientes se estudiaron muestras de LCR obtenidas mediante punción lumbar por personal médico especializado. Se enviaron al laboratorio en tres porciones: a) tubo para estudios citoquímicos; b) tubo estéril para bacteriología, y c) tubos cónicos de plástico de 1,5 ml estériles, con certificación como libres de RNAsas y DNAsas, para estudio virológico.

Análisis clínicos y bacteriológicos

El examen citoquímico incluyó la detección de glucorraquia, proteinorraquia y celularidad (número de células/mm³ y porcentaje de mononucleares y polimorfonucleares). El estudio bacteriológico consistió en observación del Gram del sedimento y el cultivo en medios enriquecidos para la búsqueda de agentes etiológicos habituales (16).

La tercera alícuota fue congelada de inmediato a -20 °C para ser enviada al Servicio de Neurovirosis (Centro de Referencia Nacional) del Departamento de Virología del Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas - Administración Nacional de Laboratorios e Institutos de Salud (INEI-ANLIS) "Dr. Carlos G. Malbrán", para la detección viral por las metodologías clásica (7, 43, 44) y molecular (27, 28).

Diagnóstico y caracterización virológica

El aislamiento viral se realizó mediante la inoculación de células Rd provistas por el Servicio de Cultivo de Tejidos (Departamento de Virología INEI-ANLIS "Dr. Carlos G. Malbrán"). Las muestras fueron tratadas con una mezcla de antibióticos y antimicóticos, y después de la inoculación fueron incubadas durante 7 días a 37 °C en una atmósfera con 5% de CO₂. Siempre se realizó un nuevo pasaje a ciegas. Los tubos con efecto citopático fueron conservados a -70 °C y reservados para su uso posterior en la identificación.

También se realizó la detección de enterovirus mediante PCR anidada con transcripción reversa de la región 5' no codificante del genoma viral (RT-n-PCR) (4, 5). La extracción del ácido

nucleico viral de las muestras clínicas y de los virus aislados se realizó utilizando el reactivo comercial Trizol, siguiendo las indicaciones del fabricante (6).

La identificación molecular de los serotipos detectados por PCR y cultivo se realizó mediante secuenciación génica (5). Se amplificó la región terminal 5' de la proteína VP1 mediante PCR anidada con transcripción reversa. El producto de la amplificación se secuenció en ambos sentidos con el sistema comercial Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Applied Bio system Inc., Foster City, California). Las secuencias obtenidas se alinearon con el programa MegAlign (DASTar Inc., Madison, Wisconsin). El serotipo se determinó mediante la comparación de la secuencia parcial de la VP1 del virus aislado con la base de datos del Gene Bank, con el programa CLUSTAL X (versión 1.8). Se consideró que un virus aislado era de un determinado serotipo cuando su secuencia nucleotídica coincidía en por lo menos 75% con la de un EV prototípico (27).

Los datos clínico-epidemiológicos, así como los resultados de los análisis, fueron extraídos de los registros del Laboratorio, de las historias clínicas de los pacientes y del Servicio de Estadísticas del Hospital. Se analizaron las variables edad, género, tiempo de internación, fecha de internación y hallazgos de laboratorio mediante el programa EPI info, versión 6. Las variables cualitativas se analizaron mediante las pruebas de Chi cuadrado con la corrección de Yates. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas con un $p < 0,05$. La asociación se midió a través del riesgo relativo (RR) con IC 95%; se estableció tal asociación cuando el límite inferior no contenía a la unidad.

RESULTADOS

Datos epidemiológicos

El aumento del número de casos de meningitis aséptica por encima de lo observado en los últimos 20 meses se detectó en el año 2005 a partir de la semana 33 (14 de agosto) y continuó hasta la semana 50 (11 de diciembre), dos semanas después de finalizado el año lectivo. El 72% de los casos ocurrió entre el 16 de octubre y el 11 de diciembre (Figura 1).

De los 143 niños, el 55,2% (79) fueron varones (relación V:M = 1,2:1). La mediana de edad fue de 8 años y la media de 7 años y 8 meses (DE: 3 años y 8 meses).

El análisis de los datos por grupo de edad permitió determinar que casi el 80% de los casos se observó en niños en edad escolar (5 a 14 años) (RR 5-14 años = 1,18; IC 95%: 1,08-1,28) (Tabla 1). Sin embargo, no se detectaron diferencias significativas en la incidencia de casos entre los niños menores de 1 año, los de 5 a 9 años y los de 10 a 14 años (14, 15 y 16 casos/10.000 años-niños, p (0-1 año vs. 5-9 años) = 0,88; p (0-1 año vs. 10-14 años) = 0,72; p (5-9 años vs. 10-14 años) = 0,72, respectivamente. Estas tasas de ataque son superiores y estadísticamente significativas respecto de las observadas para el grupo etario de 1 a 4 años (10 casos /10.000 años-niños; p (0-1 año vs. 1-4 años) = 0,02; p (1-4 años vs. 5-9 años) = 0,001, p (1-4 años vs. 10-14 años) = 0,0005).

El tiempo promedio de internación fue de $4,5 \pm 1,7$ días y no se observaron diferencias entre los niños de los diferentes grupos de edad ($p > 0,05$). En todos los casos la evolución fue favorable y no se informaron fallecimientos.

Análisis clínicos y bacteriológicos

El análisis fisicoquímico de las muestras de LCR mostró recuentos entre 6 y 5040 células/mm³ (media: 188 células/mm³; DE: 444 células/mm³). El 92% (120/131) presentó recuentos inferiores a 500 células/mm³, con 4 casos en los que éste fue superior a 1000 células/mm³.

El 43,5% de los líquidos (62/143) presentaron inicialmente predominio linfocitario, el 40,5% (58/143) mostraron predominio de polimorfonucleares (PMN), en 11 muestras no se observó predominio y de las 12 restantes no se obtuvieron los datos. Cuarenta de los 58 pacientes

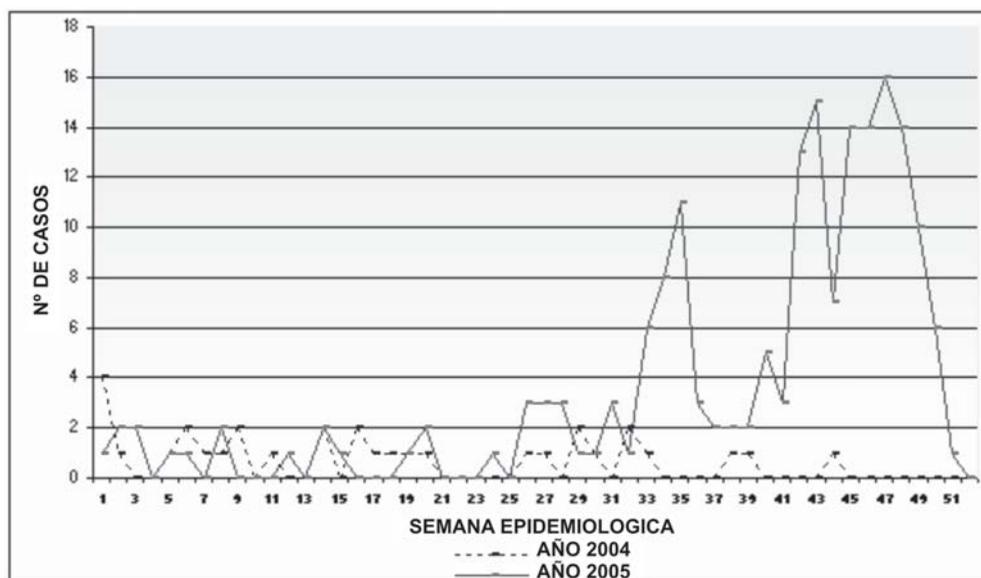


Figura 1. Curva epidemiológica de los casos de meningitis aséptica de los años 2004 y 2005. HPPPA. Posadas, Misiones.

que presentaron predominio de células PMN en los LCR de las punciones lumbares iniciales fueron repunzados dentro de las 24 horas siguientes, lo que permitió detectar en 30 casos de cambio a predominio linfocitario.

El 56% de los LCR (72/128) presentaron concentraciones de glucosa normales, con proteínas ligeramente elevadas.

Las glucorraquias oscilaron entre 0,150 y 1,25 g/l (mediana: 0,592 g/l; media: 0,623g/l; DE: 0,188g/l). Los 56 niños en los que se detectaron valores aumentados tenían valores de glucemia superiores a 1 g/l al momento de la toma de muestra, y en todos ellos la relación glucorraquia/glucemia estuvo entre 0,6 y 0,8.

Los valores de proteínas oscilaron entre 0,10 y 4,37 g/l (mediana: 0,270 g/l; media: 0,334 g/l; DE: 0,510 g/l). Todos los cultivos bacteriológicos fueron negativos. No se encontró relación entre los parámetros analizados en el LCR y la edad de los pacientes.

Diagnóstico y caracterización virológica

Se enviaron 70 muestras de LCR al Laboratorio de Referencia de Virología, 60 de las cuales se inocularon en células Rd y 59 se estudiaron por una RT-n-PCR. Cuarenta y nueve muestras fueron analizadas por ambos métodos.

El 28% de las muestras de LCR estudiadas por cultivo (17/60) mostraron efecto citopático compatible con EV, 6 de ellas se tipificaron como positivas para echovirus tipo 4. Mediante RT-n-PCR fue posible detectar echovirus tipo 4 en el 73% de los LCR analizados (43/59). El índice de positividad obtenido al combinar ambas técnicas fue del 83% (58/70) (Tabla 2).

DISCUSIÓN

Este trabajo da cuenta por primera vez de un brote de meningitis viral asociado a echovirus tipo 4 en la provincia de Misiones.

En el análisis de la ocurrencia de casos por semanas epidemiológicas se observa un aumento entre las semanas 33 y 50, con un pico máximo entre las semanas 47 y 48, lo que confirma la existencia de un brote. Este período corresponde a los meses de primavera e inicio del verano, característicamente asociados a este tipo de infecciones en estas latitudes (3, 21, 37).

El inicio de la disminución de casos coincidió con la finalización del año lectivo (semana 48), lo que podría estar relacionado con el patrón de transmisión escolar, hecho ya descrito por otros autores (2, 9, 23).

Si bien la incidencia en el género masculino fue ligeramente superior (1,2:1), estuvo por debajo de lo demostrado por diversos autores que han informado mayor incidencia en varones –del 72,7% (16), 66% (26) y 64,4% (3)–, tal vez debido a la mayor exposición de éstos a factores ambientales que favorecen la infección por

Tabla 1. Número de casos y tasas de meningitis viral según grupo etario. Semanas epidemiológicas 33-50. Posadas, Misiones, 2005, (N= 143).

Edad (en años)	Nº	%	Población	Tasa por 10 mil
0-1	12	8,39	8130	14,76
1-4	17	11,89	25698	10,50
5-9	56	39,16	36199	15,47
10-14	58	40,56	35092	16,527
Totales	143	100	105119	13,60

Tabla 2. Resultados del análisis del LCR mediante cultivo y PCR anidada. Posadas, Misiones, 2005.

	Cultivo positivo	Cultivo negativo	Cultivo NR	Totales
RT-PCR positivo	10	25	48	43
RT-PCR negativo	5	9	2	16
PCR NR	2	9	0	11
Totales	17	43	10	70

NR: No realizado

enterovirus (3, 8, 16, 26, 30). No obstante, este hecho debería ser investigado de modo más exhaustivo.

Es posible que, globalmente, la distribución por edad durante una epidemia de meningitis aséptica varíe en función de los diferentes agentes causales y la inmunidad específica de la población, la que resulta de variaciones socio-económicas, del ambiente y de otros factores (17).

El brote afectó principalmente a niños en edad escolar (5-14 años) y a los menores de 1 año, que presentaron tasas de morbilidad superiores a 140 cada 100.000 habitantes.

La tasa de ataque observada para el grupo de 10 a 14 años fue superior a la informada por otros autores para brotes con características similares, no así la de los otros grupos etarios, que en general fue inferior. Llama la atención que la de los menores de 1 año no fuera la más importante, como lo señalan otros trabajos (11, 23).

Es habitual que las tasas de infección y de meningitis vírica durante las epidemias por enterovirus sean más elevadas en los lactantes y preescolares, lo que se podría atribuir a que en estas edades existe mayor susceptibilidad ante diversas infecciones comunes, por ausencia de exposición previa y de inmunidad (23).

Se desechó la hipótesis de transmisión a través del agua de la red de abastecimiento, dada la información obtenida de su control (datos no mostrados) y la distribución del brote (9, 21, 23).

El tiempo de internación coincidió con el de otras publicaciones en las que se establece que la duración de la enfermedad es usualmente menor a una semana. Asimismo, no se observaron diferencias entre los distintos grupos etarios. Muchos pacientes mejoraron en forma notable después de la punción lumbar, presumiblemente debido a la reducción de la presión intracraneana (14, 17, 22, 30, 31, 37).

Con respecto al número de células en el LCR al ingreso, hubo coincidencia con otros estudios en relación con el predominio de células mononucleadas. Sin embargo, el líquido extraído al principio de la enfermedad puede mostrar predominio de células polinucleadas y descenso de éstas a menos del 50% después de 24 horas de evolución, como lo observado en nuestros resultados (15, 18, 20, 23, 25, 38, 44).

Los hallazgos de los demás parámetros citoquímicos fueron similares a lo detectado por otros autores. Los valores de glucorraquia hallados estuvieron dentro del rango normal, excepto en aquellos casos donde se los encontró elevados debido a las condiciones de los pacientes al momento de la punción lumbar, que posiblemente no eran las adecuadas (ayuno), y a que el equilibrio glucorraquia/glucemia se produce recién luego de las 2 h de la última ingesta.

No se encontró relación entre los parámetros analizados en el LCR y la edad de los pacientes, lo que coincide con otros informes (34).

Debido a la dificultad que existe en nuestra zona para que el laboratorio confirme la etiología viral de esta enfermedad, se envió al Centro de Referencia Nacional una muestra significativa durante todo el brote a fin de monitorear la correlación clínico-etiológica, especialmente cuando el número de casos comenzó a disminuir. En todo momento la clínica de los pacientes y el informe inicial de los parámetros citoquímicos de los líquidos extraídos guió el manejo del brote, ya que no fue posible esperar el resultado confirmatorio para tomar conductas adecuadas y oportunas.

Los resultados de la detección e identificación viral en las muestras enviadas al laboratorio de referencia (Tabla 2) evidencian la mayor sensibilidad de las técnicas moleculares sobre el cultivo celular al momento del diagnóstico virológico de la enfermedad, lo cual ya había sido demostrado por Casas *et al.*, quienes evaluaron la sensibilidad y especificidad del método de RT-PCR usado frente al cultivo celular (17). El porcentaje de positividad global informado al combinar ambas técnicas es similar al obtenido por diversos autores (11, 25). Los resultados negativos para la detección de EV por RT-n-PCR en muestras de LCR de pacientes con meningitis aséptica típica y cultivos negativos pueden deberse a muy bajas concentraciones en LCR, a una inadecuada conservación de la muestra, o al hecho de que algunas infeccio-

nes del SNC pueden no estar acompañadas por la presencia de virus en LCR (25).

Los resultados falsos negativos de esta técnica con cultivos positivos podrían obedecer a la presencia de sustancias inhibitorias que interfieren con la función de las enzimas usadas en la PCR (25).

El mal manejo inicial de las repercusiones sociales del brote tornó difícil su control y originó una reacción exagerada por parte de la comunidad, hecho que se pudo revertir informando a la población acerca de la existencia del brote, de su etiología y de las medidas de prevención para su control, con precauciones de tipo entérico. Esto fue posible, sobre todo, gracias a la participación de la comunidad educativa.

Dado que la expresión clínica de las infecciones por enterovirus es diversa y variada, con frecuentes casos asintomáticos o cuadros febriles inespecíficos, resulta difícil evaluar la extensión de la infección por echovirus tipo 4 en la población durante este brote y el resultado de las medidas que se adoptaron para su control, aunque seguramente la dispersión de la población escolar producida por el inicio de las vacaciones de verano contribuyó a la finalización del mismo.

Agradecimientos: los autores agradecen a las profesoras Mary Moore Kuhlman (Kalkaska Public Schools, Kalkaska, Michigan, EE.UU.) y Melina Ignazzi (INEI ANLIS - Dr. Carlos G. Malbrán) por las correcciones del idioma inglés.

M. L. Robledo es becaria CEDIT.

BIBLIOGRAFIA

1. Ackerman AD. Meningitis, encefalopatías infecciosas y otras infecciones del sistema nervioso central. En: Rogers MC, Healfaer MA, editores. Cuidados intensivos en Pediatría. 2ª ed. México DF, McGraw, 1997, p. 492-502.
2. Artieda J, Larrañaga I, Basterretxea M, Vicente D, Cilla G, Artola E, *et al.* Brote epidémico de meningitis linfocitaria en Gipuzkoa. Salud Pública. Boletín epidemiológico de la Comunidad Autónoma del País Vasco, 16, 3ª y 4ª trimestre 2003, p. 4-5.
3. Bernit E, de Lamballerie X, Zandotti C, Berger P, Veit V, Schlenitz N, *et al.* Prospective investigation of a large outbreak of meningitis due to echovirus 30 during summer 2000 in Marseilles, France. *Medicine (Baltimore)* 2004; 83: 245-53.
4. Casas I, Klapper PE, Cleator GM, Echevarría JE, Tenorio A, Echevarría JM. Two different PCR assays to detect enteroviral RNA in CSF samples from patients with acute aseptic meningitis *J Med Virol* 1995; 47: 378-85.
5. Casas I, Palacios G, Trallero G, Cisterna D, Freire M, Tenorio A. Molecular characterization of human enteroviruses in clinical samples: comparison between VP2, VP1, and RNA polymerase regions using RT-nested PCR assays and direct sequencing of products. *J Med Virol* 2001; 65: 138-48.
6. Casas I, Powell L, Klapper PE, Cleator GM. New method for the extraction of viral RNA and DNA from cerebrospinal fluid for use in the polymerase chain reaction assay. *J Virol Methods* 1995; 53: 25-36.
7. Chonmaitree T, Baldwin CD, Lucia HL. Role of virology laboratory in the diagnosis and management of patients

- with central nervous system disease. *Clin Microbiol Rev* 1989; 2: 1-14.
8. Cobos PV, Gutiérrez Melendez P, Yañez Ortega JL, Palacios JR, Montero Alonso R, Lozano A. Estudio epidemiológico de un brote por echovirus tipo 9. *Rev San Hig Púb* 1994; 68: 607-15.
 9. Connolly KJ, Hammer SM. The acute aseptic meningitis syndrome. *Infect Dis North Am* 1990; 4: 599-622.
 10. Freire MC, Cisterna DM, Rivero K, Palacios GF, Casas I, Tenorio A, *et al.* Análisis de un brote de meningitis viral en la provincia de Tucumán, Argentina. *Rev Panam Salud Pública* 2003; 13: 246-51.
 11. Garber HJ, Glick TH, Joseph JM, Dupont H, Eichler S. Aseptic epidemic involving ECHO 4 and Coxsackie B5 viruses. *Public Health Rep* 1970; 85: 59-65.
 12. Hammer SM, Connolly KJ. Viral aseptic meningitis in the United States: clinical features, viral etiologies, and differential diagnosis. *Curr Clin Trop Infect Dis* 1992; 12: 1-25.
 13. Jaffe M, Sugro I, Tirosh E, Collin AA, Tal Y. The ameliorating effect of lumbar puncture in viral meningitis. *Am J Dis Child* 1989; 143: 682-5.
 14. Katz SL, Gershon AA. Enfermedades infecciosas pediátricas, 10ª ed. Madrid, Ediciones Hancourt, 1999, p. 659-64.
 15. Lamarão LM, Contente GM, Alves Ferreira LL, Fonseca CM, Araújo LCB, Santana Marquete B, *et al.* Pesquisa de enterovirus em casos de síndrome de meningite aséptica de Belem, PA. *Rev Soc Bras Med Trop* 2005; 38: 391-5.
 16. Lee KY, Burgner D, Lee HS, Hong JH, Lee MH, Kang JH, *et al.* The changing epidemiology of pediatric aseptic meningitis in Daejeon, Korea from 1987 to 2003. *BMC Infect Dis* 2005, 5: 97.
 17. Loval RE, Rivadeneira S. Meningitis zosteriana: revisión de 12 enfermos. *Rev Chil Infectol* 1990; 7: 87-90.
 18. Más Lago P, Comellas MM, Marrero M, Jacobo M, Palomera R. Meningoencefalitis por enterovirus en Cuba. Estudio de 14 años. *Rev Cubana Pediatr* 1992; 64: 16-21.
 19. Meriño Arribas JM, Palacios RJ, Gil Rivas MT, Alvarez Martín T, Montero Alonso MR. Meningitis por echovirus serotipo 30. *Rev Esp Pediatr* 1997; 53: 27-9.
 20. Modlin JF. *Picornaviridae*. Introduction. En: Principles and practice of infectious diseases, 5th ed. Mandell G, Bennett JE, Dolin R, editors. New York, Churchill Livingstone, 2000, p. 1888-95.
 21. Montegui Raso S, Sánchez Echaviz J, Fernández BJ, Vázquez Ronco MA, Rubio Fernández G, Capope Zache S. Tratamiento extrahospitalario de los niños con meningitis viral. *An Esp Pediatr* 2000; 52: 430-4.
 22. Montero Alonso MR, Rodrigo Palacios J, Merino Arribas JM, Blanco Labín J, García-Pardo Necio JG, Vicente Cobos P, *et al.* Brote epidémico de meningitis por echovirus 9. *An Esp Pediatr* 1995; 43: 391-4.
 23. Moses EB, Dean AG, Hatch MH, Barron AL. An outbreak of aseptic meningitis in the area of Fort Smith, Arkansas, 1975, due to echovirus type 4. *J Ark Med Soc* 1977; 74: 121-5.
 24. Otero JR, Gimeno C, Bravo MG, Rodríguez G, Prieto C, Miguel C, *et al.* Meningitis por enterovirus en invierno. *An Esp Pediatr* 1994; 40: 48-52.
 25. Ozkaya F, Hizel K, Uysal G, Akman S, Terzinglu S, Kuyuku N. An outbreak of aseptic meningitis due to echovirus type 30 in two cities of Turkey. *Eur J Epidemiol* 2003, 18: 823-6.
 26. Palacios G, Casas I, Tenorio A, Freire C. Molecular identification of enterovirus by analyzing a partial VP1 genomic region with different methods. *J Clin Microbiol* 2002; 40: 182-92.
 27. Palacios Poggio G, Cisterna D, Freire MC, Cello J. RT-nested PCR for the detection of enterovirus in biological samples from patients with suspected enteroviral infections. *Rev Argent Microbiol* 2000; 32: 165-72.
 28. Palomeque A. Meningitis aséptica y encefalitis. Síndrome de Reyé. En: Cruz Hernández M. Tratado de Pediatría 7ª ed. Barcelona, Espaxs, p. 1841-9.
 29. Pérez Méndez C, Oña Navarro M, García Ballesteros S, Leoneza Ruíz J, Lagunilla Herrero. Meningitis por enterovirus. *An Esp Pediatr* 2001; 55: 11-4.
 30. Prieto Apesteagua A, Fonseca Hernández M, Cruz NEJ, Corona Martínez LA. Caracterización clínico-epidemiológica de los menores de 15 años afectados por la epidemia de meningoencefalitis viral en Cienfuegos. *Rev Cubana Pediatr* 2003; 75: 0-0 [En línea].
 31. Prober CG. Infecciones del sistema nervioso central. En: Behrman RE. Tratado de Pediatría. 15ª ed. Madrid, Mc Graw, 1997; p. 894-6.
 32. Reeves WC, Quiroz E, Brenes MM, Centeno R, Campos G. Aseptic meningitis due to echovirus 4 in Panama City, Republic of Panama. *Am J Epidemiol* 1987; 125: 562-75.
 33. Rice SK, Henil RE, Thornton LL, Opal SM. Clinical characteristics, management strategies, and cost implications of statewide outbreak of enterovirus meningitis. *Clin Infect Dis* 1995; 20: 931-7.
 34. Roque L, Pedroni E, Cabrera A. Brote de meningitis por virus ECHO 4. Ulapes, La Rioja, enero 2006. Boletín epidemiológico periódico. Ministerio de Salud de la República Argentina, 2006; 29: 7-11.
 35. Rotbart HA. Enteroviral infections of the central nervous system. *Clin Infect Dis* 1995; 20: 971-81.
 36. Rotbart HA. Viral meningitis and the aseptic meningitis syndrome. En: Scheld WM, Whitley RJ, Durack DT, editors. Infection of the central nervous system. New York, Raven Press, 1991, p. 19-40.
 37. Rubio G, Montegui S, Gaztelurrutia L, Sánchez J. Meningitis por enterovirus en Pediatría. Características clínicas y diagnóstico virológico. *Enf Infecc Microbiol Clín* 1998; 16: 14-8.
 38. Salas de situación: meningitis viral. Boletín Epidemiológico Periódico. Ministerio de Salud de la República Argentina, 2006; 29: 14-6.
 39. Sawyer MH, Holland D, Aintablian N, Connor JD, Keyser EF, Waecker NJ, Jr. Diagnosis of enteroviral central nervous system infection by polymerase chain reaction during a large community outbreak. *Pediatr Infect Dis J* 1994; 13: 177-82.
 40. Sharp JC, Bell EJ. Echovirus type 4 infections in Scotland, 1971-72. *Scand J Infect Dis* 1975; 7: 239-42.
 41. Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiología, SINAVE, Manual de Normas y Procedimientos del Ministerio de Salud de la Nación, 2000. Disponible en: www.direpi.vigia.org.ar/publicaciones.htm.
 42. Tunkel, AR, Scheld WM. Meningitis agudas. En: Mandell GL, Bennet JE, Dolin R. Enfermedades infecciosas, principios y práctica; 4ª ed. Buenos Aires, Editorial Médica Panamericana, 1997, p. 922-58.
 43. Wildin S, Chonmaitree T. Importance of the virology laboratory in the diagnosis and management of viral meningitis. *Am J Dis Child* 1987; 141: 454-7.
 44. Zantis T, Klein JD. Infecciones por enterovirus. *Ped Rev* 1998; 19: 183-91.