

# EVOLUȚIA ȘI MANAGEMENTUL EPIDEMIEI DE MENINGITĂ VIRALĂ CU ECHO 4 DIN BUCUREȘTI, 2007

Dr. Nicolae Ion-Nedelcu<sup>1</sup>, Dr. GrațIELA Țârdei<sup>2</sup>, Prof. Dr. Emanoil Ceaușu<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Autoritatea de Sănătate Publică a Municipiului București

<sup>2</sup>Spitalul Clinic de Boli Infecțioase și Tropicale „Dr. Victor Babeș”

## REZUMAT

**Orientare** – În cadrul supravegherii estivale a neurovirozei West Nile, în vara anului 2007, în București, s-a observat depășirea semnificativă, cu alură epidemică, a frecvențelor săptămânale așteptate de cazuri raportate de meningită virală. Întrucât testele de confirmare a etiologiei West Nile au fost constant negative, s-a presupus că epidemia ar putea fi asociată cu etiologia enterovirală, context în care s-a dispus și s-a efectuat investigarea acestei etiologii.

**Obiective** – (a) descrierea epidemiei și (b) analiza managementului acesteia.

**Metode** – Etiologia enterovirală a fost investigată prin tehnica culturală recomandată de OMS în 310 specimene clinice provenind de la 155 de pacienți cu rezidență în București.

Prevalența cazurilor de meningită virală determinate de enterovirusul ECHO serotip 4 (EV-4) a fost utilizată pentru descrierea evoluției epidemiei în profilul temporal (săptămâni calendaristice) și respectiv în profilul demografic (grupe de vârstă).

Pentru analiza managementului epidemiei s-a luat în discuție: (a) tehnica de laborator utilizată pentru investigarea etiologiei cazurilor, (b) natura și numărul speciimenelor clinice supuse testelor virusologice, (c) validitatea definiției de caz utilizată pentru includerea cazurilor în investigații virusologice și (d) valoarea măsurilor de control al transmiterii agentului patogen.

**Rezultate** – Existența unei epidemii de meningită virală în anul 2007, în București, a fost confirmată prin depășirea semnificativă ( $p < 0,05$ ) a frecvențelor săptămânale așteptate în 12 (54%) dintre cele 21 de săptămâni (începând cu săptămâna 19) în care s-a efectuat supravegherea; epidemia de meningită virală a afectat toate grupele de vârstă de peste 1 an, dar mai ales copilul mare și adultul tânăr.

Etiologia EV-4 a fost asociată cu tabloul clinic la 36 (23,2%) dintre cei 155 pacienți cu cel puțin un specimen clinic testat virusologic. În profilul temporal, prevalența infecției EV-4 a evoluat secvențial, rata de pozitivitate EV-4 fiind semnificativ mai mare ( $p < 0,05$ ) în a doua jumătate a episodului. În profilul demografic, rata cea mai mare de izolare s-a calculat la vârsta de 1-6 ani (39 %) și a diminuat odată cu înaintarea în vârstă.

S-a izolat EV-4 în 78 (25,2%) dintre cele 310 de specimene clinice testate; amplitudinea ratei de izolare a variat între 24,3% (LCR) și 29,4% (exudat faringian) ( $p > 0,05$ ). Combinația cea mai prolifică de specimene clinice a fost LCR + exudat faringian (31,3%), fără totuși ca valoarea ratei de izolare în această combinație să fie semnificativ diferită de rata de izolare numai din LCR. Corelația între numărul de specimene clinice prelevate de la un pacient (1-4) și pozitivitatea EV-4 a fost de numai 8%. Valoarea predictivă pozitivă și specificitatea definiției clinice de meningită virală au fost de 23,9% și respectiv 11,3%. Anchetarea cazurilor a sugerat existența unei asociații (OR: 2,94;  $p > 0,05$ ) între ingerarea de fructe sau legume nespălate și pozitivitatea EV-4.

**Concluzii** – Epidemia de meningită virală a fost determinată de EV-4 și aparent a afectat toate grupele de vârstă, cu excepția copilului în vârstă de  $< 1$  an. Valoarea managementului epidemiei a fost umbră în primul rând de utilizarea tehnicii culturale, selectată pentru investigarea etiologiei, pe toată durata de evoluție a episodului, adică și după ce etiologia enterovirală fusese indubitabil demonstrată până la nivel de serotip.

**Recomandări** – În epidemiile viitoare de meningită virală, un management adecvat ar trebui să se întemeieze pe investigarea etiologiei prioritar bazată pe metode de diagnostic molecular.

**Cuvinte cheie:** meningita, ECHO 4, evoluție, management

## ABSTRACT

**Orientation** – An unusual rising, above the expected limits, and with a clear epidemic trend, in the viral meningitis reported cases weekly frequencies, has been observed during the 2007 year's routine summer West Nile neuroinfection surveillance, conducted in Bucharest. As the confirmatory tests for West Nile etiology were constantly negative it was supposed that the outbreak might be of enteroviral origin, and consequently the investigation of this etiology was decided and performed.

**Objectives** – (a) outbreak description and (b) analysis of outbreak's management

**Methods** – enteroviral etiology was ascertained through WHO recommended cultural technique in 310 clinical specimens sampled from 155 patients.

The prevalence of viral meningitis cases caused by the enterovirus ECHO serotype 4 (EV-4) has been used in order to describe the outbreak course in time (calendar weeks) and also in demographic terms (age groups) respectively.

For the outbreak management analysis the following was taken in consideration: (a) laboratory technique used for cases' etiology investigation, (b) nature and number of clinical specimens cultured, (c) validity of case definition used for cases' enrolment in virological tests and (d) interventions taken to control the pathogen transmission.

**Results** – the existence of an aseptic meningitis outbreak was confirmed through significant ( $p < 0.05$ ) overpassing in 2007 of the expected weekly frequencies in 12 (57%) out of a set of 21 consecutively weeks (starting with the week 19) during which surveillance has been conducted; viral meningitis cases affected all ages groups over one year, but mainly the older children and young adults.

EV-4 etiology has been associated with the clinical picture in 36 (23.2%) of the 155 patients with at least one cultured clinical specimen. In time prophile, the prevalence of EV-4 infection evolved sequentially, the positivity rate being significantly higher (RR: 2.49) in the last half of the outbreak. In demographic terms the highest EV-4 isolation rate was found in the 1-6 years old age group (39%), and it decreased steadily with older ages.

EV-4 has been isolated from 78 (24.2%) out of 310 clinical specimens; the isolation rate ranged from 24.3% (CSF) to 29.4% (throat swab) ( $p > 0.05$ ). The most prolific combination of clinical specimens was CSF + throat swab (31.3%), although this rate was not significantly higher than those associated to CSF only. Correlation between the number of clinical specimens (1-4) sampled from a single patient and the isolation rate counted for only 8%. Predictive positive value and specificity of the clinical case definition provided, were both of modest values (23.9% and 11.3% respectively). Case investigation suggested (OR: 2.94;  $p > 0.05$ ) an association between recent eating of unwashed fruits/vegetables and EV-4 positivity.

**Conclusions** – the viral meningitis outbreak has been provoked by EV-4 and apparently involved all ages, except infants. The value of the outbreak management was shaded primarily by using the cultural technique selected for etiology investigation all along the duration of episode's evolution, i.e. beyond the time when the enteroviral etiology had been indubitably demonstrated up the serotype level.

**Recommendations** – In the future viral meningitis outbreaks an adequate management should be based primarily on molecular methods of diagnosis.

**Key words:** meningitis, ECHO 4, evolution, management

## INTRODUCERE

Enterovirusurile sunt virusuri ARN care aparțin familiei picornaviridae și includ virusurile polio, ECHO, Coxsackie A și B, enterovirusurile 68-71. O nouă clasificare împarte enterovirusurile umane în 4 grupe (A-D) (1).

După introducerea vaccinării antiurliene de rutină, virusurile Coxsackie și ECHO sunt agenții etiologici majori ai meningitei virale, cu aproximativ 80% dintre cazurile raportate la copii și adulți (2-4). Manifestările clinice ale infecției enterovirale merg de la portajul asimptomatic la afecțiuni amenințătoare de viață; alte manifestări includ: boli febrile ușoare, boli respiratorii (faringita, bronșita, bronșiolita), rashuri, „hand, foot and mouth disease“, miocardita, encefalita și sepsisul neonatal (5,6).

În climatul temperat, deși cazuri sporadice apar în tot cursul anului (7), infecția enterovirală este mai frecventă vara și toamna, ceea ce explică frecvența crescută a meningitei virale în cursul fiecărei veri. Mărimea acestei creșteri variază în fiecare an, în funcție de serotipul de enterovirus predominant (8-10). Variabilitatea în creșterea frecvenței nu implică în mod necesar diferențe în severitatea clinică (11).

În comparație cu anii precedenți, în anul 2007, în municipiul București, s-a observat o creștere semnificativă, cu alură epidemică, a numărului de cazuri spitalizate de meningită virală. Descrierea epidemiei și analiza managementului acesteia sunt prezentate în această lucrare.

## METODE

**Epidemia** – Verificarea existenței, în vara anului 2007, în București, a unei epidemii de

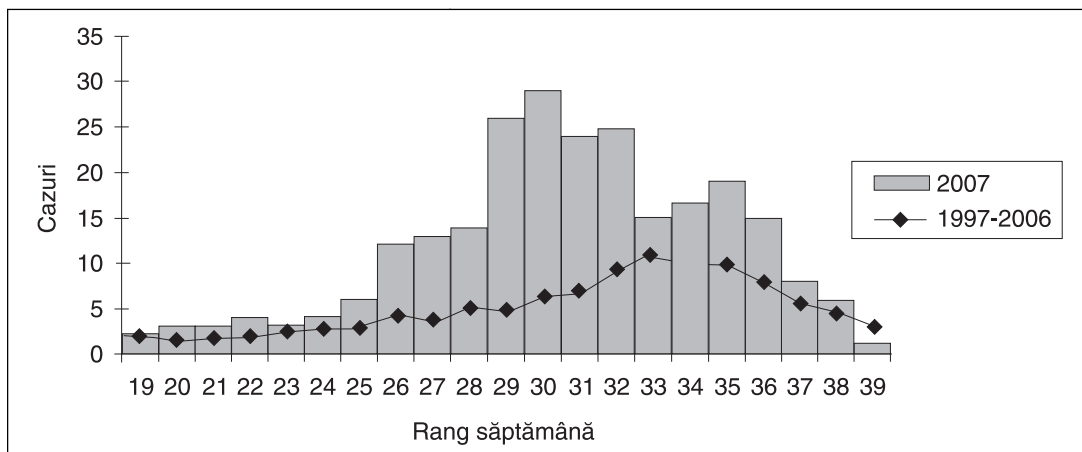
meningită virală s-a efectuat prin compararea statistică a frecvenței cazurilor noi de meningită virală spitalizate în fiecare săptămână de supraveghere din acel an, cu frecvență medie (plus o abatere standard) din săptămâna cu rang corespunzător a perioadei 1998-2006.

**Cazurile** – În studiu au fost înrolate cazurile de meningită acută virală spitalizate în cele două clinici universitare de boli infecțioase din București, cazuri ce au fost investigate pentru etiologia enterovirală prin tehnica culturală (12) și evaluate prin ancheta epidemiologică pentru depistarea de factori de risc asociați cu infecția enterovirală.

**Managementul datelor** – Caracteristicile esențiale ale pacienților cu rezidență în București: (a) demografice (vârstă, sex), (b) clinice (diagnostic la internare, stare la ieșire), (c) paraclinice (specimene recoltate, probe pozitive, agent etiologic) și epidemiologice (timp, loc, persoană) au fost introduse într-o bază de date Epi Info (Epi Info, 3.4.3 CDC, Atlanta, GA, USA); la sfârșitul perioadei de supraveghere, prin interogarea bazei de date, au fost generate proporții și s-a efectuat compararea statistică. Regresia lineară a fost utilizată pentru estimarea corelației între numărul de specimene recoltate de la pacienți (1 la 4) și izolarea de EV-4 (pozitiv=1; negativ=0) în cel puțin unul, indiferent care, din speciamentele testate iar regresia logistică s-a utilizat pentru analiza asociației dintre factorii de risc de infecție și etiologia EV-4.

## REZULTATE

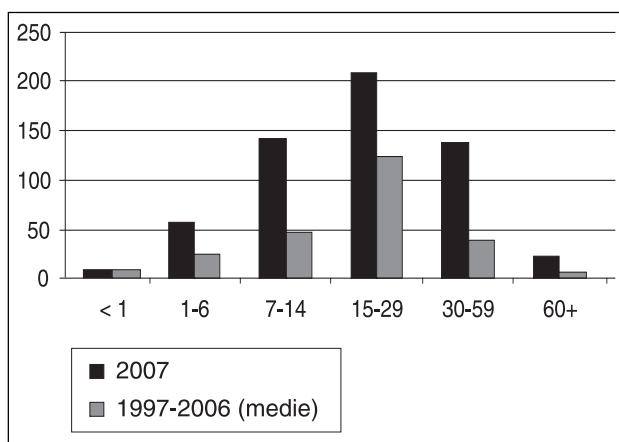
Existența unei epidemii de meningită virală în anul 2007, în București a fost confirmată prin



**Figura 1**  
Frecvențe săptămânale de cazuri de meningită virală raportate în municipiul București (2007 vs media aritmetică + 1 DS/1997-2006)

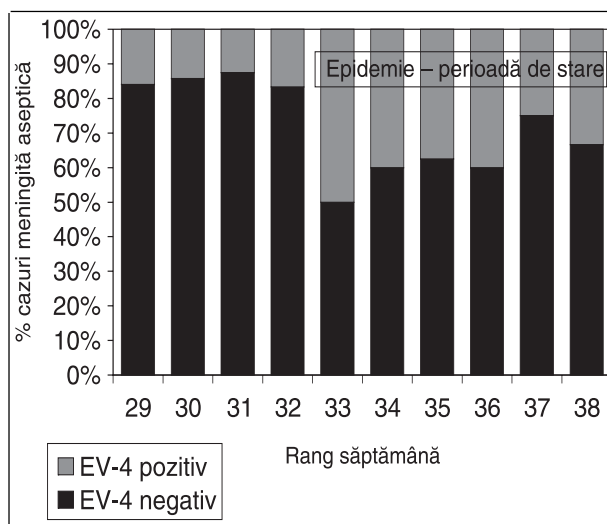
depășirea semnificativă ( $p < 0,05$ ) a frecvențelor săptămânale așteptate [media istorică + 1 deviație standard (DS)] în 12 (57%) dintre cele 21 de săptămâni (rang:19-39) în care s-a făcut supravegherea (fig. 1);

Similar anilor precedenți ( $p > 0,05$ ), în anul 2007 epidemia de meningită virală din București a afectat mai ales copilul mare și adultul tânăr (fig. 2).



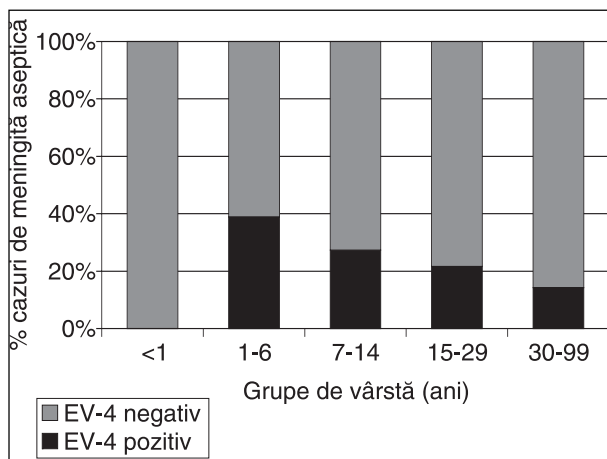
**Figura 2**  
Frecvența pe grupe de vârstă a cazurilor de meningită aseptică raportate în municipiul București (anul 2007 vs frecvența medie în perioada 1997-2006)

Luând în considerație etiologia EV-4, asociată cu tabloul clinic la 36 (23,2%) dintre cei 155 de pacienți cu cel puțin un specimen clinic testat virusologic (vezi mai jos), în profil temporal, prevalența infecției EV-4 a evoluat secvențial, cu o perioadă inițială de 4 săptămâni consecutive în care rata cumulată de pozitivitate EV-4 a fost de 15% urmată de o perioadă de 5 săptămâni în care rata indicatorului a fost de 31% ( $p < 0,05$ ) (fig. 3).



**Figura 3**  
Distribuția pe săptămâni calendaristice a ratei de izolare EV-4 în epidemia de meningită virală din anul 2007, municipiul București

În profilul demografic, rata cea mai mare de pozitivitate EV-4 s-a calculat la vârsta de 1-6 ani și a diminuat odată cu înaintarea în vârstă (fig. 4).



**Figura 4**  
Distribuția pe grupe de vârstă a ratei de pozitivitate EV-4 în epidemia de meningită virală din anul 2007, municipiul București

Centrul Național de Enteroviroze din Institutul Cantacuzino a izolat EV-4 în 78 (25,2 %) din cele 310 de specimene clinice testate; rata de pozitivitate EV-4 a variat între 24,3% (LCR) și respectiv 29,4 % (exudat faringian) ( $p > 0,05$ ) (tabelul 1).

Combinăția cea mai prolifică de specimene clinice a fost LCR + exudat faringian (31,3%), dar fără ca valoarea ratei de pozitivitate EV-4 asociată acestei combinații să fie statistic semnificativ diferită ( $p > 0,05$ ) de rata de izolare numai din LCR (tabelul 2).

Analiza relației dintre numărul de specimene clinice prelevate de la un singur pacient și pozitivitatea EV-4 a relevat un coeficient de corelație de numai 8%.

#### Tabelul 1

Ratele de izolare a virusului ECHO4 în funcție de natura specimenelor clinice testate

Natură specimene clinice testate	Nr. (%) EV-4 pozitive
LCR (n = 148)	36 (24,3)
Cheag sanguin (n = 52)	11 (21,1)
Materii fecale (n = 93)	26 (28,0)
Exudat nas-gât (n = 17)	5 (29,4)
Total (n = 310)	78 (25,2)

Statistica:  $\chi^2 = 1,05$ ; grade de libertate = 3;  $p = 0,78$

#### Tabelul 2

Rate de izolare a virusului ECHO4 în funcție de combinații selectate dintre LCR și alte tipuri de specimene clinice testate

Combinății de specimene clinice testate	Nr. (%) EV-4 pozitive
LCR + Cheag sanghin (n = 48)	11 (22,9)
LCR + Materii fecale (n = 87)	24 (27,6)
LCR + Exudat nas-gat (n = 16)	5 (31,3)

Statistica:  $\chi^2 = 0,55$ ; grade de libertate = 2;  $p = 0,76$

Pe baza rezultatelor de laborator, etiologia enterovirală a putut fi asociată cauzal cu manifestările clinice la 36 (25,3%) dintre cei 155 de pacienți investigați virusologic, după cum urmează: (a) s-a confirmat diagnosticul de neuroinfecție cu EV-4 la 22 de pacienți la care virusul a fost izolat dintr-un situs anatomic normal steril (LCR sau/și cheag sanguin) și respectiv (b) s-a presupus, așa cum sunt uzanțele (13), diagnosticul de neuroviroză cu

virus EV-4, la alți 14 pacienți, majoritatea cu diagnostic clinic de meningită virală, la care virusul a fost izolat numai din materii fecale sau/și exudat nasofaringean. În fine, la 119 pacienți (76,8% dintre pacienții investigați virusologic) laboratorul nu a pus în evidență prezența de enterovirusuri (tabelul 3).

#### Tabelul 3

Rate de izolare EV-4, în funcție de diagnosticul clinic, în epidemia de meningită virală din anul 2007, municipiul București

Condiții medicale investigate	EV-4 prezent
Meningită virală (n = 138)	33 (23,9%)
Alte condiții medicale cu meningism* (n = 17)	3 (17,6%)
Total (n = 155)	36 (23,2%)

Statistica:  $\chi^2 = 1,16$ ; Grade libertate: 2;  $p = 0,56$

\*) angina acută, sinuzita, sindrom hiperpiretic etc.

Rata de pozitivitate EV-4 la pacienții cu diagnostic clinic de meningită virală, (adică valoarea pozitivă predictivă a definiției de caz utilizată pentru înrolarea cazurilor în investigații virusologice) a fost de 23,9%, iar rata de izolare EV-4 la pacienții cu alte diagnostice clinice la care s-au efectuat teste virusologice culturale a fost de 17,8%; diferența între cele două rate fiind statistic nesemnificativă ( $p > 0,05$ ) (tabelul 3).

Prevalența pacienților cu alte diagnostice clinice decât cel de meningită virală, la care laboratorul nu a izolat EV-4, (adică specificitatea definiției de caz utilizată) a fost de numai 11,8%.

În privința factorilor de risc de infecție EV-4, anchetarea a 144 (93%) dintre cele 155 de cazuri investigate virusologic a identificat prin regresie logistică un risc de infecție comparativ mai mare (OR = 2,94), dar statistic nesemnificativ ( $p > 0,05$ ), asociat cu consumul recent de fructe sau/și legume nespălate (tabelul 4).

## DISCUȚII

Tehnic vorbind, în condiții epidemice (frecvența peste așteptări de mare de cazuri similare privind clinica, timpul și locul de apariție) izolarea de la o parte din cazuri a unui singur serotip de enterovirus se constituie în evidență obiectivă a

#### Tabelul 4

Asociații între infecția cu EV-4 și factori de risc surveniți într-o perioadă de 10 zile înainte de debutul clinic al cazurilor

Factori de risc	Odds ratio	IC95%	Coeficient	Valoare p
Consum fructe/legume nespălate	2,94	0,17-49,46	1,0787	0,45
Deplasare în afara Bucureștiului	1,27	0,53-2,99	0,2363	0,59
Scăldat în lac/ștrand/piscină/râu	0,67	0,27-1,69	- 0,3933	0,40

asocierii etiologice cu acel serotip, virtual a tuturor cazurilor episodului epidemic respectiv.

În ultimii ani, epidemii determinate mai ales de virusul ECHO 30 sau virusul ECHO 13 au fost raportate în statele din Europa, inclusiv România (7,8,10,14-16). Epidemii de meningită virală determinate de EV-4 au fost raportate până la începutul anilor 2000 (11, 17-21) context în care izolarea în anul 2007 a acestui serotip în România îi conferă atributul de patogen re-emergent.

Pentru lucrătorii din sănătatea publică, demonstrarea etiologiei enterovirale a unei epidemii de meningite virale are importanță pentru structurarea specifică a măsurilor de control a transmiterii, în vederea reducerii numărului de cazuri și consecutiv a probabilității de apariție a sechelelor, cum ar fi în cazul infecției cu virusul ECHO 4, inducerea mecanismului autoimun în diabetul zaharat (22).

Pentru clinicieni este suficientă confirmarea de către laborator a etiologiei enterovirale a cazurilor de meningită virală pe care le îngrijesc, întrucât aflarea serotipului nu alterează deciziile lor terapeutice.

În prezent, satisfacerea nevoii de a ști a celor două grupuri citate poate fi susținută prin: (a) tehnici de laborator tradiționale care implică izolarea virală în cultura celulară urmată de identificare prin reacții serologice (imunofluorescență, seroneutralizare etc.); metoda culturală este asociată cu un redus beneficiu clinic datorită sensibilității joase și a tardivității accesului la rezultate; (b) tehnici moleculare bazate pe amplificarea enzimatică a acizilor nucleici (PCR); aceste tehnici sunt tot mai frecvent utilizate în ultimul timp (10,14, 15,26,27), întrucât sunt superioare ca sensibilitate și rapiditate tehnicii culturale și au specificitate comparabilă cu identificarea izolatelor virale prin metode serologice. În plus, aceste metode de diagnostic au costuri mult mai mici decât izolarea virală în cultura celulară și permit obținerea unui material biologic ce poate fi utilizat pentru informații suplimentare precum ar fi tiparea moleculară și alcătuirea arborilor filogenetici, informații deosebit de importante pentru epidemiologia moleculară modernă (28).

În managementul unei epidemii de meningită virală literatura de specialitate din ultimii 15 ani sugerează că utilizarea PCR este operațional superioară altor tehnici, întrucât prin rapiditatea orientării asupra etiologiei ajută atât la structurarea măsurilor efective de control a transmiterii agentului patogen în populație, cât și la orientarea strategiei terapeutice a cazurilor de îmbolnăvire, diminuând

astfel durata spitalizării și costul medicației (29,30,31).

Totuși, în epidemia descrisă aici, după demonstrarea cu rezultate de virusologie culturală a etiologiei EV-4 la primele cazuri din episodul epidemic, s-a continuat utilizarea acestei tehnici, pe tot parcursul epidemiei, adică și după ce devenise clar că îmbolnăvirile aparțineau aceluiași fenomen. Adicional, decizia de investigare virusologică exhaustivă, prin prelevarea a 4 tipuri de specimene clinice, LCR, cheag, materii fecale, exudat faringean, a fiecărui caz compatibil cu definiția de caz, a fost neinspirată, întrucât rata de izolare EV-4 a fost asemănătoare ( $p > 0,05$ ), indiferent de natura specimenului clinic testat, iar corelația între numărul de specimene prelevate de la un pacient și pozitivitate a fost modestă. În setul de date analizate de noi cea mai „prolifică” asociere de specimene clinice a fost LCR + exudat faringian (rata de izolare: 31,9%). În ceea ce privește definirea coortei de cazuri supuse investigațiilor virusologice, utilizarea unei definiții de caz restrictive, ținând seama de diversitatea manifestărilor clinice a infecției enterovirale (32), a fost asociată, paradoxal în condiții de epidemie, cu o valoare predictivă pozitivă și specificitate extrem de scăzute. Noi explicăm rata mică de pozitivitate atât prin faptul binecunoscut că numărul de particule enterovirale din LCR este mult mai redus decât în materiile fecale (33,34), cât și prin multitudinea de forme clinice asociate cu enterovirozele nonpolio, forme care nu au fost investigate, prin restricționările din definiția de caz. În plus, poate intra în discuție și calitatea prelevărilor, precum și cea a conservării și transportului produselor biologice prelevate de la pacienți, toate acestea fiind în măsură să influențeze semnificativ succesul izolării virale.

În fine, în planul sănătății publice, informația acumulată prin investigarea epidemiei nu a alterat conținutul intervenției de sănătate publică; ba mai mult, una dintre măsurile decise empiric la începutul epidemiei, precum restricționarea îmbăierilor în bazine neamenajate, nu a fost suprimată ulterior, când anchetarea cazurilor nu a evidențiat un risc semnificativ în acest sens, validând astfel observații raportate de CDC încă din 1995 (35).

## CONCLUZII ȘI RECOMANDĂRI

Supravegherea epidemiilor estivale de meningită virală trebuie să aibă în vedere utilizarea metodelor moleculare ca principal instrument de diagnostic etiologic, aplicat pe scară largă. Considerente virusologice și epidemiologice legate de

posibilele emergente în afara spectrului de diagnostic al instrumentelor moleculare utilizate la un moment dat, justifică menținerea izolării virale sau a serologiei ca instrumente alternative de utilizare

în cazuri selecționate în baza unor criterii bine definite și în limitele unor costuri care să nu prejudicieze îndeplinirea obiectivelor supravegherii epidemiologice.

## BIBLIOGRAFIE

1. Pringle CR – Virus taxonomy at the XI<sup>th</sup> International Congress of Virology, Sydney, Australia, 1999. *Arch Virol* 1999; 144: 2065-2070.
2. Robart HA – Enteroviral infections of the central nervous system. *Clin Infect Dis* 1995; 20: 971-981
3. Robart HA – Viral meningitis. *Semin Neurol* 2000; 20: 277-292.
4. Henquell C, Chambon M, Bailly JL, et al – Prospective analysis of 61 cases of enteroviral meningitis: interest of systematic genome detection in cerebrospinal fluid irrespective of cytologic examination results. *J Clin Virol* 2001; 21: 29-35.
5. Cherry J – Enteroviruses, coxsackieviruses, echoviruses and polioviruses. 4<sup>th</sup> ed. Philadelphia: Saunders, 1998.
6. Pichichero ME, McLinn S, Rotbart HA, et al – Clinical and economic impact of enterovirus illness in private pediatric practice. *Pediatrics* 1998; 102:1126-1134.
7. Diedrich S, Schreier E – Aseptic meningitis in Germany associated with echovirus type 13. *BMC Infect Dis* 2001; 1: 14.
8. Ozkaya E, Hizel K, Uysal G, et al – An outbreak of aseptic meningitis due to echovirus type 30 in two cities of Turkey. *Eur J Epidemiol* 2003; 18 : 823 – 826.
9. Avellon A, Casas I, Trallero G et al – Molecular analysis of echovirus 13 isolates and aseptic meningitis, Spain. *Emerg Infect Dis* 2003; 9: 934-941
10. Thoelen I, Lemey P, Van Der Donck I, et al – Molecular typing and epidemiology of enteroviruses identified from an outbreak of aseptic meningitis in Belgium during the summer of 2000. *J Med Virol* 2003; 70 : 420 – 429.
11. Reeves WC, Quiroz E, Brenes MM, et al – Aseptic meningitis due to echovirus 4 in Panama City, Republic of Panama. *Am J Epidemiol.* 1987; 125: 562-575.
12. WHO Manual for the virological investigation of polio. WHO/EPI/GEN/97.01; 1997: 44-51
13. Kao CH, Lee S SJ, Liu YC, et al – Outbreak of aseptic meningitis among adults in southern Taiwan. *J Microbiol Immunol Infect* 2003; 367:102-196.
14. Richter J, Koptides D, Tryfonos C, Christodoulou C – Molecular typing of enteroviruses associated with meningitis in Cyprus, 2000-2002. *J Med Microbiol.* 2006; 55 : 1035 – 1041.
15. Chomel JJ, Antona D, Thouvenot D, Lina B – Three ECHOvirus serotypes responsible for outbreak of aseptic meningitis in Rhone-Alpes region, France. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2003; 22: 191-193.
16. Cernescu C, Tardei G, Ruta S, et al – An outbreak of aseptic meningitis due to ECHO 30 virus in Romania during the 1999 summer. *Rom J Virol.* 1999; 50: 99-106.
17. Gallacher K, Ghosh K, Patel A, Walker E – An outbreak of echovirus type 4 infections and its implications for diagnosis and management in general practice. *J Infect* 1993; 26: 321-324.
18. Handsheer R, Shulman LM, Abramovitz B, et al – A new variant of echovirus 4 associated with a large outbreak of aseptic meningitis. *J Clin Virol.* 1999; 13: 29-36.
19. Portolani M, Pecorari M, Pietrosemoli P, et al – Outbreak of aseptic meningitis by echo 4: prevalence of clinical cases among adults. *New Microbiol.* 2001; 24: 11-15.
20. Sharp JC, Bell EJ – Echovirus type 4 infections in Scotland, 1971-72. *Scand J Infect Dis.* 1975; 7: 239-242.
21. Sarmiento L, Mas P, Goyenechea A, et al – First epidemic of echovirus 16 meningitis in Cuba. *Emerg Infect Dis.* 2001; 7: 887-889.
22. Diaz-Horta O, Bello M, Cabrera Rode E, et al – Echovirus 4 and type 1 diabetes mellitus. *Autoimmunity* 2001; 34: 275-281.
23. Carrol ED, Beadsworth MJB, Jenkins N, et al – Clinical and diagnosis findings of an echovirus meningitis outbreak in the north west of England. *Postgrad Med J* 2006; 82: 60-64.
24. Frantzidou F, Dumaidi K, Spiliopoulou A, et al – Echovirus 15 and autumn meningitis outbreak among children, Patras, Greece, 2005. *J Clin Virol.* 2007; 40 : 77-79.
25. Bouzlama L, Rezig D, Ben Yahia A, Aouni M, Triki H – Phylogenetic analysis of echovirus 11 in the 3' end of the VP1. *Intervirology* 2007; 50: 108-114.
26. Ramers BS, Billman G, Martin M, et al – Impact of a diagnostic cerebrospinal fluid enterovirus polymerase chain reaction test on patient management. *JAMA* 2000; 283; 2680-2685
27. King RL, Lorch SA, Cohen DM, et al – Routine cerebrospinal fluid enterovirus polymerase chain reaction testing reduces hospitalization and antibiotic use for infants 90 days of age or younger. *Pediatrics* 2007; 120: 489-496.
28. Schlesinger Y, Sawyer MH, Storch GA – Enteroviral meningitis in infancy: potential role of polymerase chain reaction in patient management. *Pediatrics* 1994; 94: 157-162.
29. Chin J – Viral meningitis. In Control of Communicable diseases Manual. 17<sup>th</sup> eds. 2000. American Public Health Association. Washington DC. 800 I Street NW; 338-339.
30. Morens DM, Pallansch MA – Epidemiology. In Rotbart HA, editor. Human enterovirus infections. Washington: American Society for Microbiology Press: 1995. p. 3-23
31. Anderoletti L, Damman NB, Dewilde A, et al – Comparison of use of cerebrospinal fluid, serum and throat swab specimens in diagnosis of enteroviral acute neurological infection by a rapid RNA detection PCR assay. *J Clin Microbiol* 1998; 36: 589-591
32. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Outbreak of aseptic meningitis – Whiteside County, Illinois, 1995. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 1997; 46:221-224.