

Brote epidémico de meningitis por virus Echo serotipo 13 en la isla de Gran Canaria

Carmen Pérez^a, María José Pena^a, Lourdes Molina^a, Gloria Trallero^b, Amós García^c, Fayna Álamo^d y Bernardo Lafarga^a

^aServicio de Microbiología. Hospital General de Gran Canaria Dr. Negrín. Las Palmas de Gran Canaria. ^bServicio de Virología. Centro Nacional de Microbiología. Instituto de Salud Carlos III. Madrid. ^cServicio de Epidemiología. Servicio Canario de Salud. Las Palmas de Gran Canaria.

^dUnidad de Investigación. Hospital General de Gran Canaria Dr. Negrín. Las Palmas de Gran Canaria. España.

INTRODUCCIÓN. Desde la introducción de la vacuna de la parotiditis, los enterovirus son la causa más frecuente de meningitis viral en niños. En España, los más frecuentemente aislados son los virus Echo serotipo 30, 9, 6 y 4.

OBJETIVOS. Describir las características clícoepidemiológicas de un brote de meningitis por virus Echo serotipo 13.

MÉTODOS. Se detectaron 152 casos de meningitis por virus Echo serotipo 13 durante el año 2000. Las muestras fueron sembradas en fibroblastos de pulmón de feto humano (MRC-5) y células de rhabdomiosarcoma. Los virus se identificaron con anticuerpos monoclonales y se tipificaron por neutralización.

RESULTADOS. El aislamiento en líquido cefalorraquídeo (LCR) del virus fue positivo en 131 de 152 (86,2%). En los 21 pacientes con cultivo de LCR negativo, el diagnóstico se realizó por cultivo del frotis faríngeo y/o heces. El efecto citopático se detectó en todos los casos en rhabdomiosarcoma. La edad media de los pacientes fue de 67 meses (intervalo, 1-350) y la relación varón:mujer 2:1. La mayoría presentaron fiebre, cefalea y otros signos meníngeos. El 52,6% de los niños requirieron ingreso. La evolución fue buena en todos los casos. La mayor incidencia se produjo de abril a junio.

CONCLUSIONES. No había constancia de la circulación del virus Echo serotipo 13 en España en los últimos años hasta la aparición de nuestro brote. El aislamiento del virus de otras localizaciones diferentes del LCR ayudan en el diagnóstico y manejo del paciente. La tipificación del virus es esencial para conocer la actividad enteroviral en la población, que puede ocurrir de forma esporádica o epidémica.

Palabras clave: Meningitis. Virus Echo serotipo 13. Brote. Cultivo de virus.

Epidemic outbreak of meningitis due to Echovirus type 13 on the island of Gran Canaria (Spain)

INTRODUCTION. Since the implementation of routine vaccination against mumps, enteroviruses have become the commonest cause of viral meningitis. In Spain the most frequently isolated echoviruses are serotypes 30, 9, 6 and 4.

OBJECTIVES. Determine the clinical-epidemiological characteristics of a meningitis outbreak due to echovirus type 13.

METHODS. We studied 152 cases of enteroviral meningitis diagnosed in the year 2000. Viral isolation was performed on fibroblast MRC-5 and human rhabdomyosarcoma cells. The viruses were identified with monoclonal antibodies and serotyped by neutralization.

RESULTS. Echovirus was isolated in 131 out of 152 CSF samples (86.2%). In 21 patients with negative CSF culture, the diagnosis was made by echovirus isolation from upper respiratory tract and/or feces samples.

The cytopathic effect was seen in all cases in monolayers of rhabdomyosarcoma cells. The average age of the patients was 67 months (range: 1-350) and the male:female ratio was 2:1. Most of the patients had fever, headache and other signs of meningitis. Hospitalization was required in 52.6%. All patients were discharged without sequelae. The highest incidence was recorded from April to June.

CONCLUSIONS. There had been no record of the presence of echovirus 13 in Spain in recent years until the emergence of this outbreak. Isolation of the virus from sites other than CSF is often helpful in establishing the diagnosis and patient management. Enterovirus isolates must be specifically serotyped to determine enteroviral activity in the population, which can be sporadic or epidemic.

Key words: Meningitis. Echovirus 13. Outbreak. Viral culture.

Introducción

Desde la introducción de la vacuna de la parotiditis, los virus del género *Enterovirus* son la causa más frecuente de meningitis viral en niños. Estos virus causan entre el 80 y el 92% de los casos en los que ha sido posible

Correspondencia: Dra. C. Pérez.
Servicio de Microbiología.
Hospital General de Gran Canaria Dr. Negrín.
Barranco de la Ballena, s/n. 35020 Las Palmas de Gran Canaria. España.
Correo electrónico: mcpergon@gobiernodecanarias.org

Manuscrito recibido el 14-06-2002; aceptado el 11-12-2002.

demonstrar la etiología¹. A lo largo del año suelen aparecer casos esporádicos, pero lo habitual es que se produzcan brotes durante el verano y el otoño, principalmente en los climas templados^{2,3}.

Los enterovirus tienen una distribución mundial. En determinadas áreas geográficas algunos serotipos pueden ser endémicos, con ligeros cambios de un año a otro, mientras que otros pueden introducirse de forma periódica, causando epidemias o casos esporádicos⁴. Los ciclos epidémicos típicos reflejan la relación entre el virus y la susceptibilidad de la población.

Los serotipos de enterovirus con patrones de endemidad, con una elevada incidencia anual, son los que más afectan a la población infantil, principalmente a niños menores de 2 meses y al comienzo de la escolarización, debido a la ausencia de inmunidad y de una exposición previa. En cambio, los niños de mayor edad son más susceptibles a aquellos serotipos que no han circulado durante varios años.

Las meningitis por enterovirus son dependientes del serotipo. Los virus con mayor neurotropismo y neurovirulencia son los virus Echo serotipos 30, 7, 9 y 11, Coxsackie B5 y Enterovirus 70/71, y los de menor son los virus Echo 4, 6 y 18, Coxsackie B3, B4 y A9⁵.

Los virus Echo aislados más frecuentemente de brotes o casos esporádicos son los serotipos 4, 6, 9, 11, 14, 16, 25, 30, 31 y 33⁶ y, en España, 30, 9, 6 y 4⁷, y dependiendo del enterovirus que predomine, el número de brotes y de pacientes implicados puede variar cada año.

El diagnóstico rápido y diferencial de estas infecciones es importante para el manejo terapéutico del paciente y para conocer las características epidemiológicas de esta infección.

El objetivo del presente estudio fue analizar las características clínicas y epidemiológicas de un brote de meningitis por virus Echo serotipo 13 en 152 pacientes, en la isla de Gran Canaria, durante el año 2000.

Métodos

Durante el año 2000 se procesaron 1.400 muestras de líquido cefalorraquídeo (LCR), 181 de heces y 165 de frotis faríngeos, de 1.400 pacientes (950 niños menores de 14 años y 450 pacientes adultos) en que se solicitó descartar una infección viral del sistema nervioso central (SNC).

Las muestras se sembraron en las líneas celulares de fibroblastos de pulmón de feto humano (MRC-5) (Vircell, Granada), rabdomiosarcoma humano (RD) (Centro Nacional de Microbiología) y riñón de mono verde (Vero) (Vircell, Granada) mediante cultivo celular convencional en tubo. Las muestras de LCR se inocularon directamente, y los exudados faríngeos y heces fueron previamente descontaminados por métodos convencionales. Los cultivos se incubaron en rotación continua a 37 °C durante 14 días, con lectura diaria de los tubos los primeros 5 días y cada tercer día la segunda semana. Los cultivos que presentaron un efecto citopático característico de los enterovirus (destrucción y desprendimiento de la monocapa), se identificaron por técnica de inmunofluorescencia con anticuerpos monoclonales específicos de género frente al péptido VP1 (Dako, Diagnósticos S.A., Denmark) y de los siguientes grupos de virus: de la poliomielitis, Echo y Coxsackie B (Poliovirus Blend, Echovirus Blend, Coxsackievirus B Blend Light Diagnostics, Chemicon International, Inc, Temecula). La tipificación se realizó por el método estándar de neutralización con mezclas de antisueros de caballo (Lim-Benyeesh-Melnick)⁸.

Se diagnosticaron 296 casos (21,14%) de meningitis virales, 291 (98,3%) en pacientes menores de 14 años. Los agentes etiológicos

aislados por orden de frecuencia fueron: 152 virus Echo serotipo 13 (51,35%); 72 virus de la parotiditis (24,32%) y 72 de otros enterovirus (24,32%). Estos últimos 72 aislados se distribuyeron del siguiente modo: virus Echo serotipos 6 (43), 30 (9), 18 (8), 17 (3), 33 (2) y 4 (1); y virus Coxsackie B4 (3), B5 (2) y A9 (1).

De las 152 cepas aisladas, se tipificaron 72 y en las 80 restantes no fue necesario serotipificar ya que se aislaron en los meses de mayor pico de incidencia y porque presentaban el mismo patrón inmunológico que los virus Echo 13 serotipificados, es decir, positivo frente al anticuerpo de género y negativos frente al de grupo echovirus que detecta los serotipos 4, 6, 9, 11, 30 y 34.

Estudiamos el brote de meningitis causado por virus Echo serotipo 13, en 152 pacientes atendidos en el Servicio de Urgencias del Hospital Materno-Infantil de Las Palmas, único hospital pediátrico de la isla.

Se revisaron retrospectivamente las historias clínicas de los pacientes en los que se aisló el serotipo 13 y se recogieron los datos epidemiológicos, clínicos, de tratamiento y de evolución de la enfermedad.

Para el análisis estadístico de los resultados se utilizó el programa SPSS versión 10.0 para Windows. Las variables cuantitativas se muestran como media y desviación estándar. La normalidad de estas variables se contrastó mediante el test de Kolmogorov-Smirnov. La asociación entre variables cualitativas se contrastó mediante la prueba χ^2 con la corrección exacta de Fisher cuando fuera necesario. La diferencia de medias de las variables continuas en función de una variable cualitativa se contrastó mediante el test de la t de Student para muestras independientes o su alternativa no paramétrica U de Mann-Whitney. Para el análisis de la correlación entre variables cuantitativas se utilizó el coeficiente de correlación de Pearson o Spearman (ρ) según corresponda. Se aceptó la significación estadística para $p < 0,01$. Para aquellas categorías con una frecuencia absoluta inferior a cinco no se acompaña con un contraste estadístico debido a la falta de potencia estadística, dado el bajo tamaño muestral.

Resultados

De los 152 pacientes, se procesaron 278 muestras (152 LCR; 69 frotis faríngeo y 57 heces) y se aisló virus Echo serotipo 13 en 230 (82,7%). De los 152 LCR cultivados, 131 (86,2%) fueron positivos y de éstos, en 46 (35,1%) se aisló el mismo virus en otra muestra (frotis faríngeo y/o heces). En los 21 niños con cultivo de LCR negativo, el diagnóstico se realizó por cultivo del frotis

TABLA 1. Aislamiento de virus Echo serotipo 13 por tipo de muestra

| Nº de pacientes | Tipo de muestra | | |
|-----------------|-----------------|-----------------|-------|
| | LCR | Frotis faríngeo | Heces |
| 80 | + | NM | NM |
| 22 | + | + | + |
| 14 | + | - | + |
| 8 | + | + | NM |
| 3 | + | - | NM |
| 1 | + | - | - |
| 2 | + | NM | + |
| 1 | + | NM | - |
| 10 | - | + | + |
| 4 | - | + | NM |
| 1 | - | + | - |
| 6 | - | - | + |

LCR: líquido cefalorraquídeo; NM: no hay muestra disponible.

TABLA 2. Datos clínico-epidemiológicos de los 152 pacientes con meningitis por virus Echo serotipo 13

| | Total (n = 152) | Virus Echo 13 tipificados | Enterovirus no tipificados | p |
|---|-----------------|---------------------------|----------------------------|-------|
| Número | | 72 (47,4) | 80 (52,6) | |
| Sexo | | | | |
| Varón | 101 (66,4) | 49 (68,1) | 52 (65) | 0,733 |
| Mujer | 51 (33,6) | 23 (31,9) | 28 (35) | |
| Edad (meses) | | | | |
| X ± DE | 66,8 ± 48,06 | 58,41 ± 49,9 | 74,38 ± 45,29 | 0,040 |
| Mediana | 63,5 | 58,5 | 68,0 | |
| Intervalo | 1-315 | 1-315 | 1-170 | |
| Parámetros LCR | | | | |
| Patológicos | | | | |
| Pleocitosis (> 10 cél./μl) | 123 (81,4) | 58 (80,5) | 65 (81,2) | 0,922 |
| Presencia de neutrófilos | 84 (68,3) | 43 (74,1) | 41 (63,1) | 0,261 |
| Hiperproteinorraquea (> 45 mg/dl > 2 años; < 80 mg/dl < 2 años) | 30 (19,7) | 18 (25,7) | 12 (15) | 0,108 |
| Leucocitosis (> 15.000 cél./μl) | 10 (6,9%) | 6 (8,8%) | 4 (5,2) | |
| Datos clínicos | | | | |
| Fiebre | 134 (88,8) | 67 (93,1) | 67 (83,8) | 0,085 |
| Cefalea (> 2 años) | 118 (98,3)* | 50 (98)** | 68 (98,6)*** | |
| Vómitos | 107 (70,4) | 46 (63,9) | 61 (76,3) | 0,111 |
| Rigidez de nuca | 82 (53,9) | 35 (48,6) | 47 (58,8) | 0,255 |
| Fotofobia | 36 (23,7) | 17 (23,6) | 19 (23,8) | 1,000 |
| Irritabilidad | 28 (18,4) | 18 (25) | 10 (12,5) | 0,060 |
| Fonofobia | 14 (9,2) | 6 (8,3) | 8 (10) | 0,785 |
| IRA | 7 (4,6) | 3 (4,1) | 4 (5) | 0,425 |
| Diarrea y/o dolor abdominal | 10 (6,6) | 6 (8,3) | 4 (5) | 0,425 |
| Duración de los síntomas (h) | | | | |
| X ± DE | 59,8 ± 40,1 | 61,7 ± 47,1 | 58,5 ± 32,6 | 0,610 |
| Intervalo | 10-240 | 10-240 | 12-168 | |
| Pacientes ingresados | 80 (52,6) | 44 (61,1) | 36 (45) | |
| Días de ingreso | | | | |
| X ± DE | 3,1 ± 2 | 3,5 ± 2,4 | 2,7 ± 1,3 | 0,249 |
| Intervalo | 1-11 | 1-11 | 1-5 | |

Los resultados se expresan en número. Las cifras entre paréntesis corresponden al porcentaje.

*De 120 niños mayores de 2 años; **de 51 niños mayores 2 años; ***de 69 niños mayores 2 años.

DE: desviación estándar; LCR: líquido cefalorraquídeo; IRA: infección del tracto respiratorio superior.

faríngeo y/o heces (en la tabla 1 se describen los aislamientos de las distintas muestras por paciente). El tiempo medio de aparición del efecto citopático en el cultivo fue de $3,6 \pm 1,4$ días (intervalo 2-10 días). El efecto citopático se observó en el 100% de los casos en RD, en el 56,8% en MRC-5 y en ningún caso en la línea Vero.

Al comparar las características clínicoepidemiológicas de los 72 pacientes tipificados con los 80 no tipificados no se encontró ninguna diferencia estadísticamente significativa, por lo que el estudio se realizó en los 152 pacientes en conjunto (tabla 2). Eran menores de 14 años 151 pacientes (99,34%) de los cuales 30 (19,7%) fueron menores de 6 meses; la relación varón:mujer fue 2:1. Los síntomas más frecuentes fueron cefalea y fiebre. De los 30 niños menores de 6 meses, 13 (43,3%) tuvieron rechazo a tomas. Creemos importante destacar que el 81,4% de los pacientes presentaron pleocitosis (> 10 cél./μl), y en el 61% de ellos el recuento celular fue superior a 100 cél./μl. Sólo el 19,7% presentó hiperproteinorraquia y la glucorraquia fue normal en todos los casos. En el estudio de correlación de las variables analíticas encontramos que los parámetros del LCR, número de células y proteínas, no estaban influidos por la edad y, sin embargo, se observó una influencia

significativa del número de células en el tiempo de duración de los síntomas ($\phi = 0,326$ [$p < 0,001$]).

Los 21 niños con cultivo de LCR negativo, de los cuales se tipificaron 9 casos (43,3%), tenían una pleocitosis > 160 cél./μl, todos presentaron signos meníngeos positivos y necesitaron ingreso.

El tiempo de evolución desde el inicio de los síntomas hasta que acudieron al hospital fue menor de 24 h en 115 casos (75,7%). De los 152 pacientes, 80 ingresaron, de los cuales 36 (46,2%) fueron dados de alta antes de las 48 h y 7 (9%) permanecieron en el hospital más de 5 días. El 98,7% de los niños que tenían una pleocitosis > 160 cél./μl fueron ingresados. La epidemia generó 252 días de hospitalización. Nueve pacientes recibieron antibióticos, cuatro de ellos completaron el tratamiento por sospecha de meningitis bacteriana y a los otros cinco se les retiró el antibiótico antes de los 3 días. La evolución fue buena en todos los casos; sólo 10 pacientes presentaron una ligera raquialgia que remitió.

El primer caso apareció en el mes de febrero en el sur de la isla, donde se detectaron 34 casos, extendiéndose el brote hacia el municipio de Las Palmas con 71 casos. El resto de los casos se detectaron en la zona centro de la isla (28 casos) y en la zona norte (19 casos) (fig. 1) y uno de los casos procedía de la isla de Fuerteventura. Todos los casos

fueron autóctonos y no habían viajado en los últimos meses. La distribución temporal de los casos se observa en la figura 2. El pico máximo de la incidencia se produjo en las semanas epidemiológicas 22 y 23, con 24 y 22 casos, respectivamente. El 89,5% de los casos se detectaron en la primavera durante los meses de abril (21 casos), mayo (56 casos) y junio (59 casos). Los últimos casos se produjeron en el mes de octubre.

Discusión

El virus Echo serotipo 13 es uno de los enterovirus menos frecuentemente aislados durante las estaciones con mayor número de aislamientos de enterovirus (verano-otoño), en los países con climas templados⁵. En los últimos años no se había detectado ningún serotipo 13 en España⁷; dentro de Europa en los últimos 10 años sólo se aislaron 19 cepas en Inglaterra⁹ y en Estados Unidos sólo 65 cepas en los últimos 30 años¹⁰.

A pesar de que es un serotipo que aparentemente no había circulado ni en España ni en la comunidad canaria, lo cual podría haber creado un número elevado de adultos susceptibles, todos los pacientes eran menores de 14 años, excepto una mujer de 26 años, madre de uno de los niños estudiados. La relación varón:mujer para la enfermedad fue de 2:1, coincidiendo con los datos publicados¹¹.

Los pacientes presentaban los síntomas y signos de meningitis aseptica, como se describe en estudios previos de brotes producidos por otros virus Echo^{2,3,12,13} y cabe destacar la baja frecuencia de síntomas gastrointestinales, a diferencia de otros estudios^{2,14-16} y la ausencia de erupción cutánea.

Aunque el aislamiento del enterovirus del LCR constituye la prueba diagnóstica confirmatoria, los aislamientos a partir de frotis faríngeos y heces tienen valor cuando coinciden con una sintomatología compatible o cuando están asociados a una pleocitosis del LCR¹⁶⁻¹⁹. En

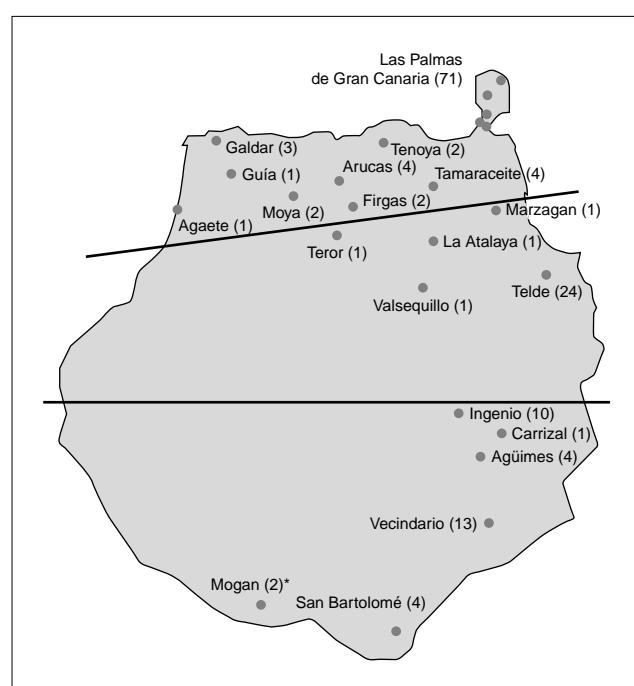


Figura 1. Distribución de los casos de meningitis por virus Echo serotipo 13 en la isla de Gran Canaria. *Primer caso (14/02/2000).

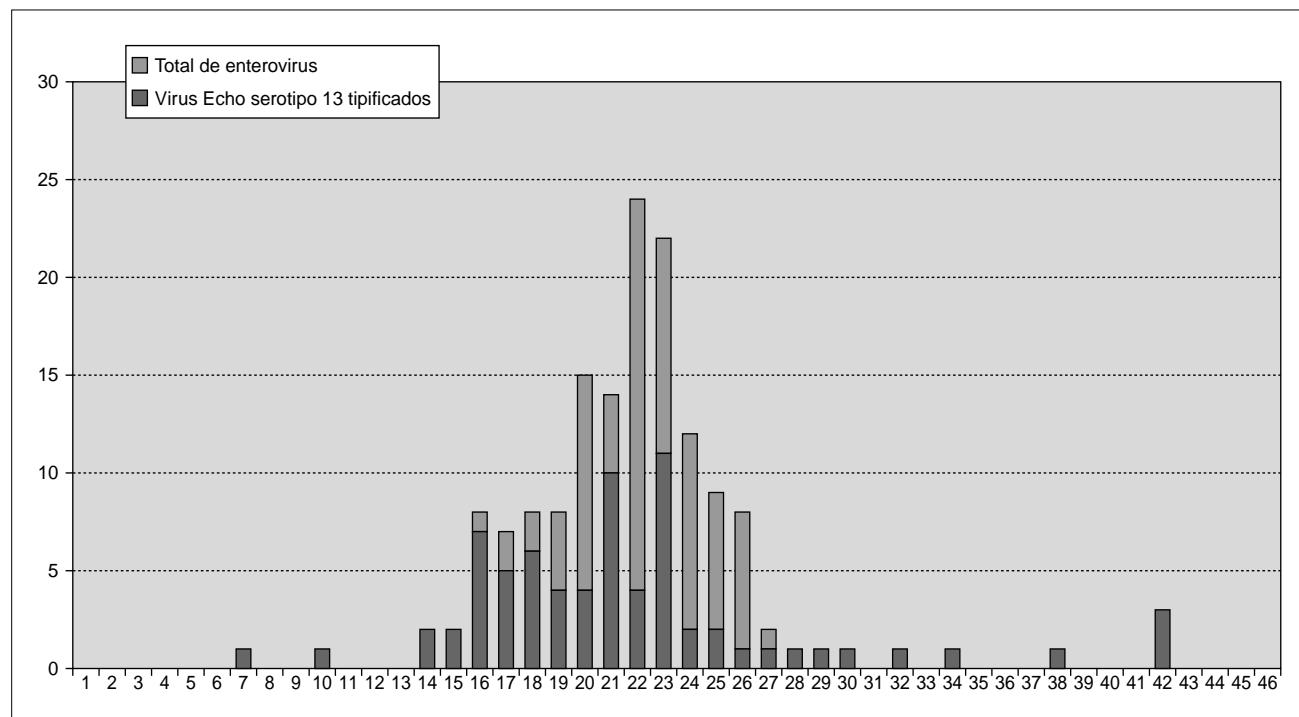


Figura 2. Curva epidémica del brote de meningitis por virus Echo serotipo 13.

nuestro brote, el frotis faríngeo permitió el diagnóstico en 15 pacientes y las heces en 6 pacientes. En estos casos el LCR fue patológico, aunque estéril en el cultivo, y además todos ingresaron debido a las manifestaciones clínicas, y a la elevada pleocitosis del LCR. Por lo tanto, creemos conveniente la obtención de muestras de diferentes localizaciones (LCR, frotis faríngeos, heces, etc.) en casos de meningitis asépticas, para mejorar el diagnóstico virológico y definir situaciones epidemiológicas.

Como describen otros autores²⁰, la línea RD fue de gran ayuda diagnóstica ya que todos nuestros aislamientos se produjeron en ella, por lo que es imprescindible su utilización, en la siembra de las muestras de aquellos pacientes con sospecha de meningitis viral, y así poder obtener un mayor rendimiento diagnóstico.

El brote no presenta el patrón clásico de incidencia estacional¹¹. Resulta evidente el predominio de casos en la primavera (abril-junio), como ha sido señalado en Cataluña²¹, aunque esta estacionalidad tan temprana podría deberse al clima más templado que tenemos en nuestra isla con respecto al resto de Europa, temperaturas que oscilaron entre 18,9° C (febrero-marzo) y 20,4° C (abril-mayo) durante el año del brote en estudio. El conocimiento del patrón estacional de los enterovirus, especialmente en climas templados, es un indicio diagnóstico importante que se deberá tener en cuenta para mantener una alta sospecha durante esos meses de prevalencia, lo cual permitirá un mejor manejo del paciente.

Nuestro brote coincide en el tiempo con otros brotes de virus Echo serotipo 13 detectados en España y otros países europeos. El número de casos tipificados en nuestro país fue de 145; el 49,6% procedentes de nuestro brote, el 15,8% en el País Vasco, el 11,7% en Madrid y el 22,7% en el resto de las Comunidades Autónomas (Andalucía, Aragón, Comunidad Valenciana, Cantabria, Castilla-León, Cataluña, Galicia y Murcia) (G.Trallero, datos no publicados). En Inglaterra y Gales diagnosticaron en las primeras 30 semanas del año 2000, 67 casos (38 de meningitis), de los cuales el 68% se presentó en mayores de 15 años⁹. En Alemania se detectaron 55 casos en niños menores de 15 años, con el mayor pico de incidencia en el mes de octubre y, posteriormente, un nuevo pico en septiembre-octubre del año 2001¹⁴. En Holanda se diagnosticaron 47 casos en el año 2000 y más del doble de casos durante el año 2001 y en Francia el brote de virus Echo 13 representó el 32% de los 1.262 casos de enterovirus diagnosticados en el año 2000²². Asimismo, como se ha podido comprobar, en el año 2001 han seguido produciéndose nuevos brotes por virus Echo serotipo 13, no sólo en Europa, sino en otras partes del mundo, como en Estados Unidos, que declararon 76 casos entre los meses de enero y agosto¹⁰, 16 casos en Australia^{23,24} y por último, 36 casos (24 meningitis asépticas) en Japón entre los meses de septiembre y noviembre¹⁵.

Todos estos datos sugieren cómo estos brotes epidémicos por un tipo específico de virus Echo se dispersan de una manera mucho más amplia de lo esperada, es decir, no sólo en un mismo continente sino en continentes diferentes, lo cual, probablemente esté influido por los movimientos de la población por diversos motivos (turismo, actividades comerciales, etc.). Teniendo en cuenta que

todos los pacientes recogidos en este brote eran autóctonos, que no habían viajado en los últimos meses, y que el primer caso diagnosticado fue en el mes de febrero en la zona sur de nuestra isla, que recibe turismo fundamentalmente de Alemania, Inglaterra y Países Nómadas durante el invierno, cabría la posibilidad de que nuestro brote pudiera haber sido el origen del resto de los brotes habidos en Europa (año 2000) y en Estados Unidos (año 2001) y Australia (año 2001) o que el origen de nuestro brote fuera un turista procedente de alguno de los países de los que recibimos turismo. Para demostrar esta hipótesis sería necesario la realización de estudios moleculares (actualmente en fase de desarrollo) para conocer la posible fuente de infección y su implicación epidemiológica.

Aunque la presentación de nuestro brote ha sido muy benigna, con recuperación de todos los pacientes, sería de gran ayuda disponer de una terapia antiviral específica para aquellos casos de infecciones por enterovirus que tuvieran una mayor afectación neurológica y así prevenir posibles complicaciones^{25,26}.

Por último, sólo nos queda señalar que la vigilancia de los enterovirus es importante para conocer los patrones con que circulan estos virus en España (esporádica-epidémica) y que, además, esta información puede ser de gran ayuda, no sólo para la evaluación de potenciales antivirales frente a estos virus sino también para comprender la vinculación de los enterovirus con la enfermedad.

Bibliografía

- Connolly KJ, Hammer SM. The acute aseptic meningitis syndrome. *Infect Dis Clin North Am* 1990;4:599-622.
- Ashwell MJS, Smith DW, Phillips PA, Rouse I L. Viral meningitis due to echovirus types 6 and 9: Epidemiological data from Western Australia. *Epidemiol Infect* 1996; 117:507-12.
- Schumacher JD, Chuard C, Renevey F, Matter L, Regamey C. Outbreak of Echovirus 30 meningitis in Switzerland. *Scand J Infect Dis* 1999;31:539-42.
- Moore M, Kaplan MH, McPhee J, Bregman DJ, Klein SW. Epidemiologic, clinical and laboratory features of Coxsackie B1-B5 infections in the United States, 1970-1979. *Public Health Rep* 1984;99:515-22.
- Rotbart H. Meningitis and encefalitis. En: Rotbart H, editor. *Human Enterovirus Infections*. 1st ed. Washington: ASM Press, 1995; p. 271-89.
- Melnick JL. Enterovirus: Polioviruses, coxsackieviruses, echoviruses, and newer enteroviruses. En: Fields BN, Knipe DM eds. *Virology*. 2nd ed. New York: Raven Press, 1990; p. 549-50.
- Trallero G, Casas I, Tenorio A, Echevarría JE, Castellanos A, Lozano A, et al. Enterovirus in Spain: Virological and epidemiological studies over 10 years (1988-97). *Epidemiol Infect* 2000;124:497-506.
- Melnick JL, Wimberly IL. Lyophilized combination pools of enterovirus equine antisera. New LBM pools prepared from reserves of antisera stored frozen for two decades. *Bull WHO* 1985;63:543-50.
- Communicable Disease Surveillance Centre. Viral meningitis associated with increase in echovirus type 13. *Commun Dis Rep CDR Wkly* 2000; 10:277-80.
- Centre Diseases Control. Echovirus Type 13 - United States, 2001. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2001;50:777-80.
- Morens D, Pallansch M. Epidemiology. En: Rotbart H, editor. *Human Enterovirus Infections*. 1st ed. Washington: ASM Press, 1995; p. 3-23.
- Vieth VC, Kunzelmann M, Diedrich S, Timm H, Ammon A, Lyytikäinen O, et al. An echovirus 30 outbreak with a high meningitis attack rate among children and household members at four day-care centers. *Europ J Epidemiol* 1999;15:655-8.
- Reintjes R, Pohle M, Vieth UC, Lyytikäinen O, Timm H, Schreier E, et al. Community-wide outbreak of enteroviral illness caused by echovirus 30: A cross sectional survey and a case-control study. *Pediatr Infect Dis J* 1999; 18:104-8.

14. Diedrich S, Schreier E. Aseptic meningitis in Germany associated with echovirus type 13. *BMC Infect Dis* 2001;1:14.
15. Keino M, Kanno M, Hirasawa K, Watari T, Mikawa M, Saito K, et al. Isolation of echovirus type 13 from patients of aseptic meningitis. *Jpn J Infect Dis* 2001;54:249-305.
16. Wildin S, Chonmaitree T. The importance of the virology laboratory in the diagnosis and management of viral meningitis. *Am J Dis Child* 1987;141:454-7.
17. Johnson GM, McAbee GA, Seaton ED, Lipson SM. Suspect value of non-CSF viral cultures in the diagnosis of enteroviral CNS infections in young infants. *Dev Med Child Neurol* 1992;34:876-84.
18. Chonmaitree T, Menegus MA, Powel KR. The clinical relevance of "CSF viral culture". A two-year experience with aseptic meningitis in Rochester, NY. *JAMA* 1982;247:1843-7.
19. Rubio G, Mintegui S, Gaztelurrutia L, Sánchez J. Meningitis por enterovirus en pediatría. Características clínicas y diagnóstico virológico. *Enferm Infect Microbiol Clin* 1998;16:14-6.
20. Otero JR, Jimeno C, Bravo MG, Rodríguez G, Prieto C, Miguel C, et al. Meningitis por enterovirus en invierno. *An Esp Pediatr* 1994;40:48-52.
21. Valdezate S, Mesa F, Otero J. Meningitis por enterovirus en un hospital pediátrico: experiencia en 1996. *Enferm Infect Microbiol Clin* 1998;16:135-7.
22. Noah N, Ried F. Recent increases in incidence of echovirus 13 and 30 around Europe. *Eurosurveillance Weekly* 2002;14:7.
23. McMinn P. Echovirus 13 & 30 in relation to aseptic meningitis in Western Australia. *ProMED-mail [revista electrónica]* 2001;17 September [consultado 14/05/2002]. Disponible en: (<http://www.promedmail.org/pls/askus/f?p=2400:1202:9358> PUB MAIL ID: X14479).
24. Leroi M. Meningitis, echovirus 9, 13 & 30 – Australia (NSW). *ProMED-mail [revista electrónica]* 2001; 26 September [consultado 14/05/2002]. Disponible en: (<http://www.promedmail.org/pls/askus/f?p=2400:1202:9358> PUB MAIL ID: X14553).
25. Robart HA, O'Connell JF, McKinkay MA. Treatment of human enterovirus infections. *Antiviral Res* 1998;38:1-14.
26. Robart HA, Webster AD, Pleconaril Treatment Registry Group. Treatment of potentially life-threatening EV infections with pleconatil. *Clin Infect Dis* 2001;32:228-35.