



M

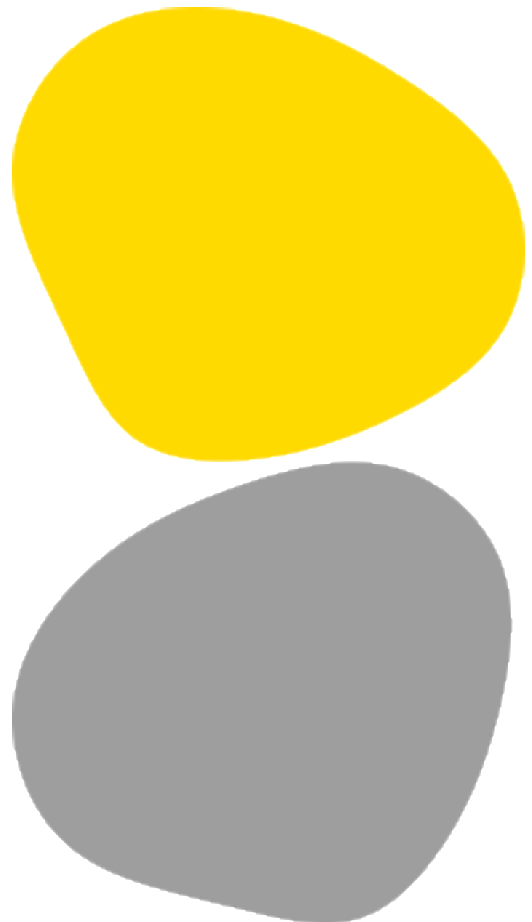
MESTRADO

ANÁLISES CLÍNICAS E SAÚDE PÚBLICA

Estudo epidemiológico das infeções por Enterovírus D68 na ULS São João

Bárbara Sofia Pinto da Costa Paula

09/2025





ESCOLA
SUPERIOR
DE SAÚDE



SÃO JOÃO

Estudo epidemiológico das infeções por Enterovírus D68 na ULS São João

Autor

Bárbara Sofia Pinto da Costa Paula

Orientadores

Prof Doutora Sandra Paula da Costa Pinto da Silva Rebelo/ Serviço de Patologia Clínica da ULS São João e Faculdade de Medicina da Universidade do Porto e Instituto de Investigação e Inovação em Saúde da Universidade do Porto

Prof Especialista Maria Manuela Amorim/ REQUIMTE/LAQV, Escola Superior de Saúde|P.Porto

Prof Doutora Sandra Marlene da Silva Mota / REQUIMTE/LAQV, Escola Superior de Saúde|P.Porto

Dissertação apresentada para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Análises Clínicas e Saúde Pública – Área de Especialização em Imunohemoterapia e Transplantação pela Escola Superior de Saúde do Instituto Politécnico do Porto.



Resumo

O Enterovírus D68 (EV-D68) tem emergido como agente de relevância em saúde pública devido à sua associação a infeções respiratórias graves e complicações neurológicas, nomeadamente a mielite flácida aguda (AFM). Este estudo analisou a circulação do EV-D68 na ULS São João entre agosto de 2022 e abril de 2025, através da avaliação epidemiológica, clínica e molecular de doentes submetidos a pesquisa de vírus respiratórios.

Foram processados 8 964 pedidos de pesquisa de Enterovírus, dos quais 8 385 corresponderam a resultados válidos. Destes, 1 599 (19,07%) foram positivos. A maioria dos casos ocorreu em idade pediátrica, sobretudo em crianças menores de 5 anos, com ligeiro predomínio do sexo masculino. O padrão sazonal observado foi compatível com a circulação descrita para Enterovírus, concentrando-se no final do verão e outono. Contudo, picos em períodos atípicos poderão refletir a deteção de Rinovírus ou surtos de outros Enterovírus.

Foram selecionadas 42 amostras de líquido cefalorraquidiano (LCR) para sequenciação genómica, mas não foi identificada nenhuma linhagem de EV-D68, mesmo em anos com surtos descritos internacionalmente. As limitações metodológicas, incluindo o tipo de amostra e a exclusão de coinfeções, podem ter condicionado estes resultados.

Os dados reforçam a necessidade de estratégias laboratoriais mais direcionadas, com inclusão de amostras respiratórias, e da sensibilização clínica para o EV-D68, visando uma vigilância mais robusta e precoce deste agente em Portugal.

Palavras-chave: Enterovírus D68, vigilância epidemiológica, infeções respiratórias, mielite flácida aguda



Abstract

Enterovirus D68 (EV-D68) has emerged as a public health concern due to its association with severe respiratory infections and neurological complications, particularly acute flaccid myelitis (AFM). This study analyzed the circulation of EV-D68 at the ULS São João between August 2022 and April 2025, through epidemiological, clinical, and molecular evaluation of patients tested for respiratory viruses.

A total of 8,964 enterovirus testing requests were processed, of which 8,385 yielded valid results. Among these, 1,599 (19.07%) were positive. Most cases occurred in pediatric patients, especially in children under 5 years, with a slight predominance of males. The observed seasonal distribution was broadly consistent with that described for enteroviruses, peaking in late summer and autumn. However, additional peaks at atypical periods may reflect rhinovirus detection or outbreaks of other enteroviruses,

Forty-two cerebrospinal fluid (CSF) samples were selected for genomic sequencing, but no EV-D68 lineages were identified, even in years when international outbreaks were reported. Methodological limitations, including the sample type and the exclusion of co-infections, may have influenced these results.

These results highlight the need for more targeted laboratory strategies, particularly the inclusion of respiratory samples, and for increased clinical awareness of EV-D68 to enable stronger and earlier surveillance of this putative emerging pathogen in Portugal.

Keywords: Enterovirus D68, epidemiological surveillance, respiratory infections, acute flaccid myelitis



Índice

1.	Introdução.....	1
1.1.	Caracterização dos Enterovírus Humanos	1
1.2.	Enterovírus D68	3
1.2.1.	Replicação viral.....	5
1.3.	Epidemiologia.....	7
1.4.	Manifestações Clínicas.....	8
1.4.1.	Mielite flácida aguda.....	9
1.4.2.	Relação entre o Enterovírus D68 e a Mielite Flácida Aguda	10
1.5.	Patogénese	12
1.6.	Diagnóstico Laboratorial.....	15
2.	Objetivos	17
3.	Metodologia	17
3.1.	Ética.....	17
3.2.	População e amostra	17
3.3.	Procedimentos.....	17
4.	Resultados.....	19
4.1.	Caracterização do ano de 2022.....	22
4.2.	Caracterização do ano de 2023.....	26
4.3.	Caracterização do ano de 2024.....	30
4.4.	Caracterização do ano de 2025.....	34
4.5.	Caracterização das amostras processadas.....	38
5.	Discussão.....	40
6.	Conclusão.....	47
	Referências Bibliográficas	48



Índice de Abreviaturas

- AFM** – Mielite Flácida Aguda, do inglês *Acute Flaccid Myelitis*;
- AFP** – Paralisia Flácida Aguda, do inglês *Acute Flaccid Paralysis*;
- CD55** – *Cluster of Differentiation 55*;
- COVID-19** – *Coronavirus Disease 2019*;
- DAF** – *Decay-accelerating factor*;
- DNA** – Ácido desoxirribonucleico, do inglês *Deoxyribonucleic Acid*;
- eIF4G** – Fator de iniciação eucariótico, do inglês *eukaryotic translation initiation factor 4G*;
- EUA** – Estados Unidos da América;
- EV-A** – Enterovírus A;
- EV-A71** – Enterovírus A71;
- EV-B** – Enterovírus B;
- EV-C** – Enterovírus C;
- EV-D** – Enterovírus D;
- EV-D68** – Enterovírus D68;
- EVNP** – Enterovírus Não-Polio;
- HFMD** – Doença do Pé, Mão, Boca, do inglês *Hand, Foot, Mouth Disease*;
- ICAM-5** – *Intercellular Adhesion Molecule 5*;
- INSA** – Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge;
- IRES** – *Internal ribosome entry site*;
- ITAFs** – *IRES trans-acting factors*;
- LCR** – Líquido cefalorraquidiano;
- mRNA** – RNA mensageiro, do inglês *Messenger RNA*;
- ORF** – *Open reading frame*;
- PABP1** – *Poly-A binding protein 1*;
- PCR** – Reação de Polimerização em Cadeia, do inglês *Polymerase Chain Reaction*;
- PRRs** – *Pattern recognition receptors*;
- Q1** – Primeiro Quartil;
- Q2** – Segundo Quartil;
- Q3** – Terceiro Quartil;
- RNA** – Ácido ribonucleico, do inglês *Ribonucleic Acid*;



RT-PCR – Transcriptase reversa seguida de Reação de Polimerização em cadeia, do inglês *reverse transcription-polymerase chain reaction*;

RT-qPCR – RT-PCR em tempo real, do inglês *quantitative reverse transcription polymerase chain reaction*;

SDRA – Síndrome de Dificuldade Respiratória Aguda;

SISPA – Amplificação independente de sequência com *primer* único, do inglês *Sequence-Independent Single-Primer Amplification*;

SNC – Sistema Nervoso Central;

ssRNA (+) – RNA de cadeia simples e polaridade positiva, do inglês *Positive-sense single-stranded RNA*;

TLRs – *Toll-like receptors*;

ULS São João – Unidade Local de Saúde São João;

UTR – Região não traduzida, do inglês *untranslated region*;

VP – Proteína Viral, do inglês *Viral Protein*;

VPg – Proteína ligada ao genoma viral, do inglês *viral protein genome-linked*.



Índice de Tabelas

Tabela 1 – Espécies de Enterovírus e a sua constituição	2
Tabela 2 – Recomendação das amostras biológicas consoante a apresentação clínica	15
Tabela 3 – Associação entre sexo e resultado da pesquisa de Enterovírus.....	20
Tabela 4 – Associação entre idade (por faixa etária) e resultado da pesquisa de Enterovírus	20
Tabela 5 – Motivos para não processamento dos testes de Pesquisa de Enterovírus em 2022	22
Tabela 6 – Distribuição dos resultados positivos por exame laboratorial em 2022.....	24
Tabela 7 – Motivos para não processamento dos testes de Pesquisa de Enterovírus em 2023	26
Tabela 8 – Distribuição dos resultados positivos por exame laboratorial em 2023.....	28
Tabela 9 – Motivos para não processamento dos testes de Pesquisa de Enterovírus em 2024.....	30
Tabela 10 – Distribuição dos resultados positivos por exame laboratorial em 2024.....	32
Tabela 11 – Motivos para não processamento dos testes de Pesquisa de Enterovírus em 2025.....	34
Tabela 12 – Distribuição dos resultados positivos por exame laboratorial em 2025	36



Índice de Figuras

Figura 1 – Representação esquemática do genoma do EV-D68.....	3
Figura 2 – Representação da estrutura do EV-D68	4
Figura 3 – Ciclo de replicação viral do EV-D68.....	6
Figura 4 – Distribuição dos resultados dos testes com pesquisa de Enterovírus realizados em 2022: Negativos, Positivos e Não processados	22
Figura 5 – Distribuição dos doentes com resultado positivo por sexo e faixa etária em 2022	23
Figura 6 – Distribuição semanal dos resultados positivos de Enterovírus/Rinovírus em 2022, representados por mês e semanas.....	25
Figura 7 – Distribuição dos resultados dos testes com pesquisa de Enterovírus realizados em 2023: Negativos, Positivos e Não processados	26
Figura 8 – Distribuição dos doentes com resultado positivo por sexo e faixa etária em 2023.....	27
Figura 9 – Distribuição semanal dos resultados positivos de Enterovírus/Rinovírus em 2023, representados por mês e semanas.....	29
Figura 10 – Distribuição dos resultados dos testes com pesquisa de Enterovírus realizados em 2024: Negativos, Positivos e Não processados	30
Figura 11 – Distribuição dos doentes com resultado positivo por sexo e faixa etária em 2024.....	31
Figura 12 – Distribuição semanal dos resultados positivos de Enterovírus/Rinovírus em 2024, representados por mês e semanas.....	33
Figura 13 – Distribuição dos resultados dos testes com pesquisa de Enterovírus realizados em 2025: Negativos, Positivos e Não processados	34
Figura 14 – Distribuição dos doentes com resultado positivo por sexo e faixa etária em 2025	35
Figura 15 – Distribuição semanal dos resultados positivos de Enterovírus/Rinovírus em 2025, representados por mês e semanas.....	37
Figura 16 – Distribuição anual das amostras sequenciadas.....	38
Figura 17 – Distribuição das amostras processadas por sexo e faixa etária.....	38



1. Introdução

Os vírus são, por definição, agentes infecciosos compostos por sequências de material genético ou ácidos nucleicos como o Ácido desoxirribonucleico (DNA, do inglês *Deoxyribonucleic Acid*) ou Ácido ribonucleico (RNA, do inglês *Ribonucleic Acid*), envoltos numa cápside proteica. Esta cápside pode ainda ser revestida por uma camada lipídica denominada invólucro.^{1,2}

Os Enterovírus são vírus RNA capazes de causar doença em humanos. Afetam principalmente crianças, devido à imaturidade do seu sistema imunitário, causando sobretudo infeções do trato respiratório, superior e inferior, com sintomatologia gripal leve e/ou sintomas gastrointestinais.^{3,4}

Algumas espécies de Enterovírus, como o Enterovírus D68 (EV-D68) e Enterovírus A71 (EV-A71), podem causar sintomatologia respiratória grave e outras apresentações neurológicas como meningite, mielite, encefalite, paralisia flácida aguda (AFP, do inglês *Acute Flaccid Paralysis*), podendo conduzir à morte.^{5,6}

Desde 2014, o EV-D68 tem demonstrado um aumento de incidência bienal em vários locais do planeta. Têm também sido reportados, em associação, mais casos de mielite flácida aguda (AFM, do inglês *Acute Flaccid Myelitis*).^{6,7}

A tendência crescente de incidência e a gravidade clínica associada a este vírus reforça a importância da caracterização destas infeções.⁸

1.1. Caracterização dos Enterovírus Humanos

Os Enterovírus, pertencentes ao género *Enterovirus* da família *Picornaviridae*⁵ são vírus constituídos por RNA de cadeia simples linear, de polaridade positiva (ssRNA (+), do inglês *Positive-sense single-stranded RNA*) envoltos por uma cápside icosaédrica e sem invólucro.^{4,9}

Até ao surgimento das técnicas de sequenciação em larga escala, a classificação dos Enterovírus até então descritos era realizada com base em características fenotípicas, nomeadamente diferenças estruturais das partículas virais, propriedades observadas em cultura celular e nos seus mecanismos de patogénese em humanos e animais.¹⁰ Com base nestes critérios, estes vírus eram classificados em 4 categorias principais: Poliovírus, Coxsackievirus A, Coxsackievirus B e Echovirus.^{10,11}



O desenvolvimento e evolução de técnicas moleculares e a utilização da sequenciação, permitiu a sua reclassificação baseada nas propriedades genómicas. Assim, estes Enterovírus, mantiveram a sua nomenclatura inicial e foram agrupados com base na análise da sequenciação da região codificante da VP1 em "Enterovírus", "Poliovírus", "Coxsackievirus" ou "Echovirus". Os Enterovírus descobertos após a introdução da nova classificação, apresentam a letra da espécie e um número consecutivo. Os Rinovírus, que também pertencem ao género *Enterovirus*, seguem o mesmo tipo de nomenclatura.¹⁰⁻¹³

O género *Enterovirus* é atualmente composto por 15 espécies: 12 espécies de Enterovírus (classificados de A a L) e 3 espécies de Rinovírus, classificados de A-C. Entre estes, os Enterovírus A-D e os Rinovírus A-C são reconhecidos como causadores de doença em humanos.^{4,14}

Dentro dos Enterovírus A-D, existem 116 tipos de Enterovírus serologicamente diferentes, capazes de infetar e causar doença em humanos.^{15,16}

A constituição de cada espécie de Enterovírus encontra-se descrita na Tabela 1.

Tabela 1 – Espécies de Enterovírus e a sua constituição (adaptado de Simmonds, P. (2020)¹³)

Espécies de Enterovírus	Serotipos
Enterovírus A (EV-A) 25 serotipos	Coxsackievirus A2-A8, A10, A12, A14, A16 Enterovírus A71, A76, A89-92, A114, A119, A120, A121-A125
Enterovírus B (EV-B) 63 serotipos	Coxsackievirus A9, B1-6 Echovirus 1-9, 11-21, 24-27, 29-33 Enterovírus B69, B73-75, B77-88, B93, B97, B98, B100, B101, B106, B107, B110-113/114
Enterovírus C (EV-C) 23 serotipos	Coxsackievirus A1, A11, A13, A17, A19-A22, A24 Poliovírus 1-3 Enterovírus C95, C96, C99, C102, C104, C105, C109, C113, C116-118
Enterovírus D (EV-D) 5 serotipos	Enterovírus D68, D70, D94, D111, D120

Uma das espécies mais conhecida do género *Enterovirus* é o poliovírus, um serotipo do grupo EV-C, reconhecido como o vírus responsável pela poliomielite. Esta doença foi, durante séculos, causadora de paralisia e morte em crianças em todo o mundo. O desenvolvimento de uma vacina eficaz e a adoção de

ações como a Iniciativa global de erradicação da poliomielite permitiram o controlo do poliovírus a nível mundial, permanecendo apenas endémico em dois países, Afeganistão e Paquistão.^{17,18}

Os três serotipos de poliovírus (poliovírus 1–3) integram o grupo dos EV-C; É comum distinguir estes serotipos dos outros Enterovírus, denominando os restantes como Enterovírus Não-Polio (EVNP).^{4,19,20}

A diminuição da taxa de infeção por poliovírus consequente destas medidas permitiu que os EVNP passassem a assumir maior relevância clínica e epidemiológica. Entre estes destaca-se o EV-D68, cuja capacidade de causar infeções respiratórias graves e quadros neurológicos em crianças lhe conferiu crescente importância em saúde pública.¹⁸

1.2. Enterovírus D68

O EV-D68, como membro do género *Enterovirus* da família *Picornaviridae*, partilha várias características estruturais e moleculares com os restantes vírus deste género, tal como o genoma constituído por ssRNA (+), propriedade que justifica a sua inclusão na Classe IV da Classificação de Baltimore.^{15,21}

O genoma do EV-D68 é composto por 7100–7450 nucleótidos que se apresentam de forma linear, com polaridade positiva: consiste numa proteína ligada ao genoma (VPg, do inglês *viral protein genome-linked*) na extremidade 5', uma região 5' não transcrita com um *internal ribosome entry site* (IRES), uma *single open reading frame* (ORF) que codifica uma poliproteína, seguida por uma região 3' não traduzida (UTR, do inglês *untranslated region*) com uma cauda Poli-A.^{4,6}

A sua representação esquemática encontra-se presente na Figura 1.^{22,23}

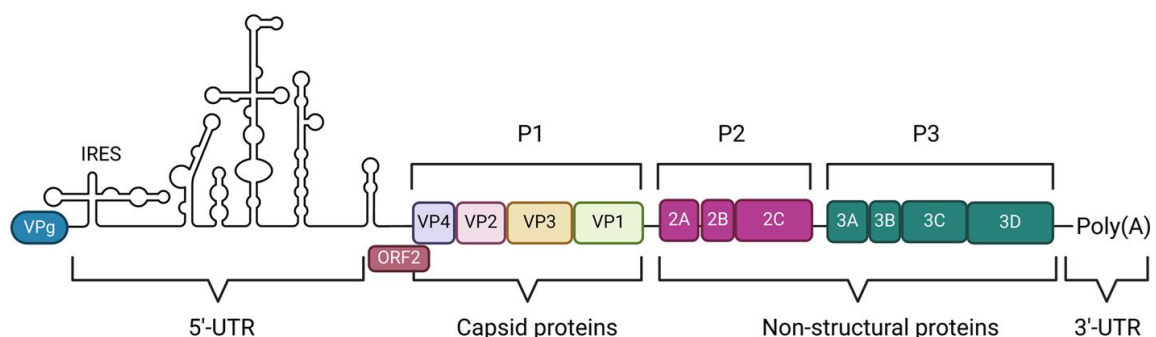


Figura 1 – Representação esquemática do genoma do EV-D68 (adaptado de Jartti, M. et al (2024)⁴)

Como o genoma do EV-D68 possui a mesma orientação do RNA mensageiro (mRNA), pode ser diretamente traduzido nos ribossomos da célula hospedeira, dando origem a uma poliproteína. Esta poliproteína gerada durante a fase de replicação é clivada pelas proteases virais em três proteínas precursoras: P1, P2 e P3.^{15,23}

Quando é clivada, a proteína P1 dá origem às quatro proteínas estruturais da cápside viral, que tem como objetivo proteger o genoma e mediar a entrada nas células a infetar, denominadas VP1, VP2, VP3 e VP4 (VP do inglês *Viral Protein*).^{15,20}

As proteínas P2 e P3 são clivadas em sete proteínas não estruturais, envolvidas no processamento de outras proteínas e na replicação do genoma viral, incluindo a RNA polimerase viral.^{4,15,23} Esta RNA Polimerase RNA-dependente não tem atividade de *proof-reading*, favorecendo variações no genoma do EV-D68 que resultam em mutações que se acumulam durante a replicação viral.²³

A cápside icosaédrica do EV-D68 é formada por 60 cópias de um protómero, cada um composto pelas quatro proteínas virais: as proteínas VP1, VP2 e VP3 estão expostas na superfície da cápside, formando unidades triangulares que, repetidas, originam um icosaedro enquanto a VP4 é uma proteína com orientação interna com o objetivo de estabilizar a estrutura (Figura 2).^{4,9,15,24}

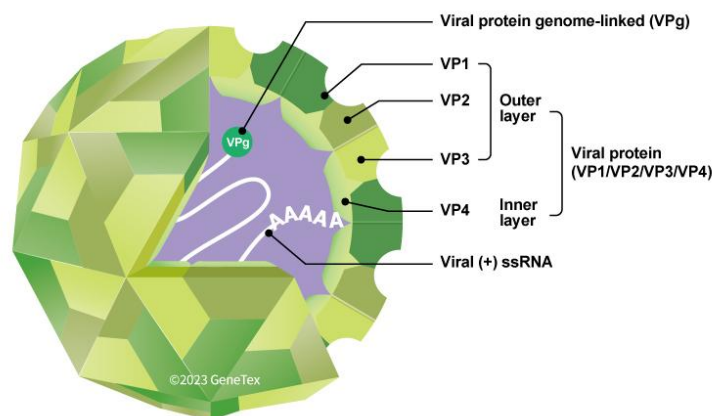


Figura 2 – Representação da estrutura do EV-D68²⁵

Com base nas distinções descritas das sequências que codificam a proteína VP1, o EV-D68 pode ser dividido em quatro subespécies: A, B, C e D.^{9,26}

O EV-D68 é uma espécie particular dentro do género *Enterovirus*, uma vez que partilha características de Enterovirus e Rinovirus. Antigenicamente e geneticamente, o EV-D68 é semelhante aos outros Enterovirus, mas as suas estirpes apresentam características de sensibilidade a ambientes



ácidos e replicação ótima a 33°C, tornando-os mais semelhantes aos Rinovírus nestes atributos.^{7,9,27} No entanto, esta característica não é a única que o EV-D68 partilha com os Rinovírus. As principais manifestações clínicas que provoca, como sintomas respiratórios e gripais, e o modo de transmissão por via oral, também apoiam esta particularidade.⁹

A capacidade do EV-D68 em causar infeções respiratórias, que podem variar entre leves e graves e complicações neurológicas, como a AFM, atribuiu-lhe uma grande relevância clínica e epidemiológica, em particular devido à sua gravidade.²⁰

1.2.1. Replicação viral

A replicação do EV-D68 inicia-se, à semelhança de muitos outros vírus, pela ligação da partícula viral à célula-alvo após o seu reconhecimento. Por ser um vírus sem invólucro, esta ligação é mediada pelas proteínas da cápside.^{6,9,28} Embora o ácido siálico e a *Intercellular Adhesion Molecule 5* (ICAM-5) tenham sido apontados como possíveis recetores celulares do EV-D68, estes ainda não estão totalmente definidos.^{20,27}

Após a ligação do vírus aos recetores celulares, a cápside sofre uma reorganização estrutural, originando uma partícula intermediária de ligação denominada de "*A-particle*". Nesta, a proteína VP4 e a extremidade N-terminal da VP1, previamente internalizadas, passam a estar externalizadas. Esta partícula é então internalizada na célula hospedeira por endocitose.^{6,9,28} Já no interior da célula, a cápside viral sofre uma nova reorganização estrutural, formando um canal aberto na membrana endossomal que permite a passagem do RNA viral para o citoplasma da célula hospedeira.^{9,28}

A tradução inicia-se imediatamente após a entrada do RNA viral no citoplasma da célula hospedeira, utilizando o IRES, localizado na região 5' UTR do genoma viral e dispensando a presença de uma 5' *cap* para iniciar este processo. Na extremidade 3', a cauda poli-A viral interage com a proteína celular *poly-A binding protein 1* (PABP1) e com o fator de iniciação eucariótico (eIF4G, do inglês *eukaryotic translation initiation factor 4G*) previamente associado ao IRES formando uma estrutura circular de mRNA que mimetiza o mRNA da célula hospedeira.^{6,9}

A tradução do RNA viral requer a participação de múltiplos fatores de iniciação celulares bem como outros fatores celulares conhecidos como *IRES trans-acting factors* (ITAFs), que em conjunto,

promovem a ligação eficiente do complexo de iniciação de tradução à IRES viral, resultando na produção das proteínas necessárias à replicação do EV-D68.^{6,9}

A tradução do genoma viral resulta numa única poliproteína que é clivada por proteases virais originando quatro proteínas estruturais e sete não estruturais. Na primeira fase, a clivagem origina uma separação entre as proteínas estruturais e não estruturais. Posteriormente, o segmento das proteínas estruturais é clivado originando as proteínas VP0, VP1 e VP3, que são parte integrante da cápside viral imatura.^{9,28}

A replicação viral ocorre em organelos celulares denominados de organelos de replicação e é resultante da ação de uma RNA polimerase dependente de RNA. Inicialmente gera-se um RNA de polaridade negativa, que é utilizado como molde para a síntese de novas cópias de RNA de polaridade positiva. A tradução e a síntese não podem ocorrer de forma simultânea, uma vez que a polimerase viral e os ribossomos não são capazes de percorrer o RNA em direções opostas, simultaneamente.^{9,28}

A montagem das novas partículas virais é realizada no citoplasma da célula hospedeira. As proteínas estruturais VP0, VP1 e VP3 formam uma estrutura trimérica que, posteriormente, se rearranja numa unidade pentamérica. A junção de doze unidades pentaméricas confere à cápside viral a estrutura icosaédrica. Por fim, ao novo genoma viral, liga-se de forma covalente a VPg na extremidade 5'.^{9,28}

Durante o processo de maturação viral que ocorre em vesículas, existe uma última clivagem da proteína VP0, originando as proteínas VP2 e VP4, resultando na cápside viral madura.^{9,28}

Finalizado o processo de replicação, as partículas virais geradas são libertadas da célula hospedeira através de vesículas extracelulares ou pela indução de lise celular.²⁸

O ciclo de replicação viral do EV-D68 encontra-se esquematizado na Figura 3.

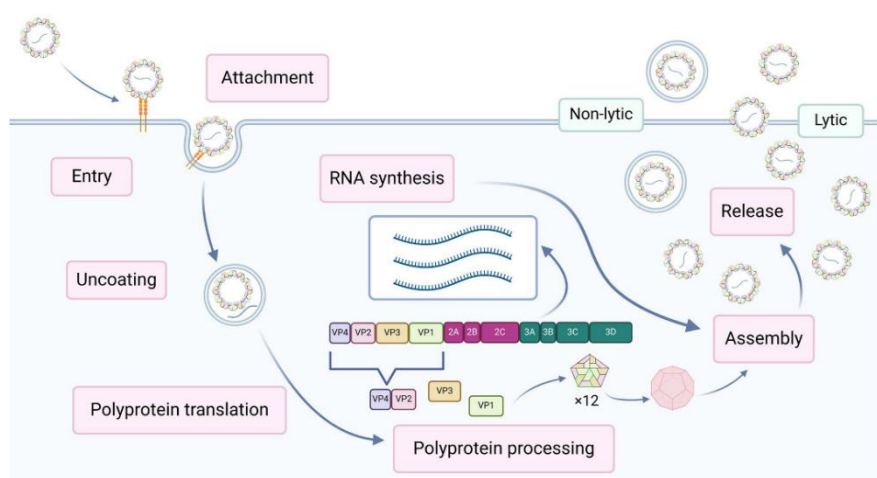


Figura 3 – Ciclo de replicação viral do EV-D68 (adaptado de Jartti, M. et al (2024) ⁴⁾



1.3. Epidemiologia

Os Enterovírus constituem um grupo de vírus altamente contagiosos, responsáveis por uma elevada incidência de infeções em humanos, mundialmente.^{11,18}

Embora os Enterovírus possam afetar indivíduos de todas as idades, as crianças são as mais afetadas e as que apresentam maior probabilidade de desenvolver doença grave, devido à imaturidade do seu sistema imunitário; estima-se que 90% dos casos de infeções reportados são em crianças com menos de 16 anos, com uma média de idades entre os 2 e os 5 anos.^{6,7,9,29} Apesar da infeção por Enterovírus em adultos ser menos frequente, têm também sido reportadas em indivíduos saudáveis, imunodeprimidos e com outras doenças respiratórias de base, como por exemplo asma.^{5,7,8} Não foi identificada nenhuma incidência específica associada ao sexo.²³

Os Enterovírus da espécie B, além de serem o maior grupo de Enterovírus, são também os mais prevalentes a nível mundial.¹¹ Os Enterovírus da espécie D são o grupo com menos serotipos classificados, sendo o EV-D68 um dos seus mais conhecidos.¹¹

O EV-D68 foi isolado pela primeira vez em 1962, nos Estados Unidos da América (EUA), a partir de um exsudado faríngeo de uma criança com infeção respiratória das vias aéreas inferiores.^{23,30} Entre 1970 e 2005, apenas foram reportados 26 casos de infeção por este vírus nesta região.⁹ Já na Europa, foram reportados os primeiros surtos em 2008 e 2010, em Itália e nos Países Baixos.^{31,32} No entanto, o primeiro grande surto de EV-D68 aconteceu em 2014 e afetou várias zonas a nível mundial: não só os EUA, como o Canadá, a Ásia e a Europa, reportaram um número elevado de casos de infeção por este vírus.^{7,9,23,30} Desde então, os surtos de EV-D68 têm apresentado aumentos significativos no número de indivíduos infetados e um padrão bienal, com picos reportados em 2016 e 2018.^{6,7}

As medidas de contenção implementadas durante a pandemia *Coronavirus Disease 2019* (COVID-19), como a utilização de máscaras e outros equipamentos de proteção individual e a adoção de restrições de circulação, tiveram impacto na disseminação de outros vírus respiratórios que partilham a mesma forma de transmissão, como é o caso do EV-D68.^{18,24} Em 2020, como resultado destas medidas, verificou-se uma diminuição do número de infeções reportadas por este vírus, resultando numa interrupção do padrão bienal de deteção de picos epidemiológicos do EV-D68 que era esperado nesse ano.^{9,23,29,33}

As subespécies A e B do EV-D68 são as mais prevalentes nos EUA, Europa e Ásia, enquanto as subespécies C e D foram detetadas com menor prevalência. O EV-D68 D parece estar mais associado a infeções respiratórias em adultos.^{8,9}



Apesar de ser transmitido principalmente por via respiratória, através de saliva e gotículas expelidas por tosse ou espirros e contacto com superfícies contaminadas, o EV-D68 contrariamente aos outros Enterovírus, que são principalmente transmitidos por via fecal-oral, segue o padrão de sazonalidade típico deste género, apresentando uma maior prevalência no verão e outono, embora possa ocorrer também durante o inverno.^{7,23}

Um estudo realizado entre laboratórios europeus no ano de 2016³⁴ revelou que 10% dos testes para deteção de Enterovírus eram positivos, dos quais 17% correspondiam a EV-D68. Considerando apenas amostras respiratórias, 10% foram positivas para Enterovírus e 39% destas identificadas como EV-D68.

As infeções respiratórias são muitas vezes acompanhadas de coinfeção entre vírus: em 2022 foi reportado que em 24,9% dos casos de infeção por EV-D68 havia coinfeção viral.³¹

Em Portugal, foram notificados apenas dois casos de EV-D68 entre 2021 e 2023. Este reduzido número de casos poderá refletir sobretudo limitações na vigilância clínica e laboratorial, mais do que uma verdadeira ausência de circulação viral. A inexistência de protocolos laboratoriais implementados na rotina para a deteção deste vírus, aliada à falta de sensibilização dos clínicos para a infeção por EV-D68 pode ter resultado num número limitado de amostras testadas e, conseqüentemente, num baixo número de infeções virais detetadas. Acresce que apenas um laboratório nacional de referência, o Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge (INSA), participou nos relatórios, sem recurso a técnicas de Reação de Polimerização em cadeia (PCR, do inglês *Polymerase Chain Reaction*) com *primers* específicos para o EV-D68, o que compromete a deteção deste vírus.³¹⁻³³

1.4. Manifestações Clínicas

A maioria das infeções causada por Enterovírus é assintomática ou com sintomatologia leve. No entanto, em recém-nascidos, crianças e indivíduos imunocomprometidos, estas infeções podem evoluir para formas clínicas mais graves.^{6,15}

As manifestações clínicas provocadas pelas infeções por Enterovírus podem ser associadas a diferentes espécies: a AFP está associada à infeção pelos vírus Polio, os EV-A71 e CVA-16 são reconhecidos por causar doença do Pé-Mão-Boca (HFMD, do inglês *Hand, Foot, Mouth Disease*) e o EV-D68 está descrito em infeções respiratórias graves e AFM em crianças.^{4,15,28}

A principal via de transmissão da maioria dos Enterovírus é a via fecal-oral, como é exemplo do poliovírus e do Coxsackievirus. Por serem estáveis e resistentes a pH ácidos, têm a capacidade de infetar



e se replicar no trato gastrointestinal ^{4,9,12}. As gastroenterites por estes causadas, embora menos frequentes do que as provocadas por outros vírus como rotavírus ou norovírus, estão bem documentadas. ^{10,35,36} Na maioria dos casos, a doença apresenta-se de forma ligeira e autolimitada, com sintomas como diarreia, dor abdominal, vômitos e febre, e ocorre sobretudo em crianças. ³

No entanto, e contrariamente aos restantes Enterovírus, a principal via de transmissão do EV-D68 é a via oral por contacto com gotículas de indivíduos infetados, mecanismo semelhante aos Rinovírus, como já referido. ^{4,27,28,35}

A incubação de EVNP, onde se inclui o EV-D68, pode durar entre 3 a 35 dias, tendo uma duração média 7 a 14 dias. Estes vírus são responsáveis por mais de 50% das meningites assépticas pediátricas. ^{4,37,38}

Clinicamente, o EV-D68 está principalmente associado a doenças respiratórias agudas, habitualmente no trato respiratório superior, podendo a sua gravidade variar entre leve e moderada. Contudo, em alguns casos, pode atingir o trato respiratório inferior resultando em formas mais graves como bronquiolite, bronquite ou pneumonia. Em indivíduos asmáticos, esta condição pode ser exacerbada. ^{23,27,28}

Os sintomas mais reportados incluem tosse, rinorreia, congestão nasal, espirros, dispneia, febre e mal-estar geral. Em casos mais graves está reportado dificuldade respiratória, que pode justificar a decisão de internamento para suplementar com oxigénio e suporte ventilatório. ^{6,7,20}

Além da sintomatologia respiratória, este vírus está também associado a várias complicações neurológicas e a nível de Sistema Nervoso Central (SNC), sendo a AFM a mais reportada. Também estão descritos casos de encefalites, disfunção dos nervos cranianos e meningo-encefalites causados por EV-D68. ^{6,28}

Apesar de estar muitas vezes associado a quadros clínicos de sintomatologia leve e moderada, o interesse científico no EV-D68 tem aumentado devido à gravidade das complicações observadas em crianças e pela sua associação com a AFM. ³⁹ Atualmente, não existe nenhuma vacina para prevenir a infeção por EV-D68 nem tratamento específico, estando este limitado a medidas de suporte. ^{8,40}

1.4.1. Mielite flácida aguda

A AFM é uma forma específica de AFP, descrita como uma fraqueza e/ou paralisia que se desenvolve de forma rápida nos membros, em horas ou dias, com baixo tónus muscular e perda de



reflexos.⁴¹ Apesar de poder afetar apenas um ou todos os membros, apresenta-se geralmente de forma assimétrica e os membros superiores parecem ser os mais afetados.^{6,42} Esta patologia tem sido reportada principalmente em crianças, podendo afetar também adultos.⁸

Os sintomas iniciais podem incluir dores e/ou rigidez nos membros afetados, ou nas costas, pescoço e cabeça, seguidos pela ausência ou redução de reflexos.⁴³ Antes do início dos sintomas neurológicos, existe um pródromo viral não-específico, com relatos de febre outros e outros sintomas respiratórios, como tosse e rinorreia, até 2 dias antes.^{34,44}

A AFM distingue-se da AFP pela presença de alterações na matéria cinzenta da medula espinal visíveis em ressonâncias magnéticas, que não estão presentes na AFP.^{5,41,45}

Em casos graves de AFM, pode ser necessário entubar e recorrer a suporte ventilatório devido a paralisia bulbar que afeta os nervos responsáveis pela respiração, ou paralisia dos músculos do diafragma, responsáveis por controlar a respiração.⁶

Atualmente, não existe cura nem tratamento específico para a AFM. A fisioterapia pode ajudar, no entanto, a recuperação muscular é limitada e requer reabilitação intensiva.⁴¹ Meses após a infeção, muitos doentes apresentam atrofia muscular nos membros afetados e a maioria das crianças diagnosticada com AFM apresentava défices motores um ano após a infeção por EV-D68.^{4,6,41,44}

1.4.2. Relação entre o Enterovírus D68 e a Mielite Flácida Aguda

Apesar de também existirem casos reportados de AFM provocada por outros vírus *polio-like*, como o EV-A71, ou vírus da família *Herpesviruses*, o EV-D68 é considerado o principal agente etiológico.^{8,34,46,47}

A primeira associação entre a infeção por EV-D68 e a AFM surgiu em 2014, no primeiro grande surto, onde a sintomatologia apresentada pelos doentes infetados variava entre sintomas gripais leves e infeções respiratórias graves que necessitavam de apoio de ventilação mecânica.^{30,32,34} Esta associação ganhou força por evidências epidemiológicas em 2014, 2016 e 2018, nos quais os picos de infeção por EV-D68 coincidem com os picos de casos de AFM reportados, estando em acordo com o padrão bienal reportado de infeções e com o padrão sazonal deste vírus.^{4,48}

No entanto, esta relação foi durante muito tempo questionada. Apesar de se identificar EV-D68 em amostras respiratórias de doentes com AFM, o facto de não ser detetado no líquido cefalorraquidiano (LCR) dos doentes com AFM gerava dúvidas. Apesar disso, a presença de anticorpos anti-EV-D68 no LCR está reportada.²⁰ Com o tempo foram aumentando as evidências de que existe invasão viral direta



da medula espinal pelo EV-D68, levando a um fenótipo radiológico específico. ^{44,49} Evidências sugerem que a sua patogénese pode resultar de uma combinação dessa invasão viral e de danos resultantes da inflamação local. ^{6,46}

Após a interrupção de picos de EV-D68 registada devido à pandemia da COVID-19, em 2022 volta a registar-se um pico de infeções, com poucos casos de AFM em associação. ^{48,50,51} Mantendo-se a periodicidade bienal, em 2024 foi registado um pico de infeções por EV-D68 em Maryland, com um número de casos menor que o reportado em 2022. A análise genómica da estirpe em circulação permitiu perceber a sua elevada semelhança com a estirpe reportada em 2022, particularmente na zona de codificação da VP1, propondo-se a possibilidade de existirem anticorpos na população que limitaram a disseminação do vírus. ⁵⁰

Também as estirpes circulantes nos anos 2014, 2016 e 2018 apresentavam entre si uma elevada semelhança genética. ⁵⁰ Estas, quando comparadas com a estirpe circulante em 2024, revelam que a estirpe mais recente não continha nenhuma das substituições associadas a neuro-virulência na região de codificação da VP1 reportadas nos anos anteriores, e que estavam associadas ao desenvolvimento de AFM. ^{50,51}

Estas considerações revelam a importância de conhecer melhor a circulação e evolução genómica do EV-D68, de forma a avaliar a sua real patogenicidade. ^{48,50,51}

Para o diagnóstico de AFM provocada por EV-D68 é necessário que se cumpram vários requisitos: existência de um início agudo de fraqueza nos membros, realização de Ressonância Magnética com resultados de lesões na matéria cinzenta envolvendo pelo menos um segmento da medula espinal e deteção do EV-D68 numa amostra biológica (respiratória, fecal, sangue ou LCR) utilizando uma *Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction* (RT-PCR) com *primers* específicos para o EV-D68 ou uma técnica RT-PCR para amplificação de Enterovírus com posterior sequenciação para o EV-D68. ⁴⁴

Em casos em que não existam imagens de Ressonância Magnética ou que estas apresentem imagens com achados normais, e pleocitose no LCR, não é possível a confirmação do diagnóstico, devendo estes ser classificados como provável AFM por EV-D68. ^{34,44} A importância do tempo de colheita das amostras biológicas assume especial importância neste diagnóstico, uma vez que quando a punção lombar é realizada muito no início da infeção viral, existe quase sempre pleocitose. ⁴⁴

O diagnóstico desta patologia nem sempre é fácil; a ausência de deteção deste vírus no LCR e a sintomatologia por este provocada pode levar a que seja confundida com outras condições neurológicas como a Síndrome de *Guillain-Barré* e a Mielite Aguda Transversa, resultando em que casos menos graves



sejam facilmente despercebidos.^{34,47} O diagnóstico de AFM deve ser considerado em condições neurológicas, especialmente quando existe precedência de sintomas virais nas quatro semanas anteriores e/ou nos meses de verão e outono.⁴⁷

1.5. Patogénese

A patogénese do EV-D68 não é totalmente conhecida. É classificado como um vírus que infeta principalmente o trato respiratório superior, mas está também associado a doenças respiratórias graves e condições neurológicas. Esta especificidade faz com que o estudo sobre os seus recetores celulares, as formas como invade o organismo e como escapa ao sistema imunitário seja essencial para esclarecer os mecanismos que originam a variabilidade clínica das suas infeções e contribuir para o avanço do conhecimento necessário à criação de antivirais e vacinas.^{20,23}

Vários estudos têm sido realizados de forma a entender melhor os recetores celulares que permitem a entrada do vírus na célula: apesar destes recetores celulares ainda não estarem totalmente definidos, estudos apontam que o ácido siálico pode ser um recetor celular para a ligação do EV-D68 nas células.^{20,23,28}

O EV-D68 apresenta mais afinidade pelos ácidos siálicos *alfa-2,6*, predominantemente expressos no trato respiratório superior do que pelos ácidos siálicos *alfa-2,3*, mais expressos no trato respiratório inferior, sugerindo maior afinidade deste vírus para o trato respiratório superior.²³ A temperatura ótima de replicação deste vírus é 33°C, estando de acordo com a sua predominância em infetar as vias aéreas superiores em vez das inferiores, onde a temperatura é maior.²⁷

Para explicar a infeção de EV-D68 no trato respiratório inferior, várias hipóteses são propostas: a utilização de recetores adicionais ao ácido siálico pode ser uma das formas de infeção, que embora este tenha sido apontado por vários estudos como um potencial recetor, foi demonstrado que algumas estirpes de EV-D68 conseguem ligar-se a células desprovidas de ácido siálico.²⁷ Existe também a possibilidade de propagação do vírus por replicação viral, uma vez que pode ser detetado em amostras do trato respiratório superior, como exsudados nasofaríngeos e em amostras do trato respiratório inferior, como lavados bronco-alveolares.^{23,28}

Também a ICAM-5, expressa em neurónios e reconhecida como recetor celular para outros Enterovírus, como os Rinovírus e Coxsackievirus, foi sugerida como recetor para a entrada do EV-D68 nas células.²⁰ No entanto, dado que as células do trato respiratório e da medula espinal não expressam



esta molécula, esta hipótese torna-se fisiologicamente improvável. Assim, conclui-se que estes recetores podem potenciar a infeção de EV-D68, mas não são estritamente necessários para a ligação celular.^{6,9}

O *decay-accelerating factor* (DAF), também conhecido como *Cluster of Differentiation 55* (CD55), é uma proteína expressa na maioria das células epiteliais e endoteliais e um conhecido recetor celular para o EV-D70, que tal como o EV-D68 pertence também à espécie D dos Enterovírus. Os efeitos citopáticos do EV-D68 eram neutralizados por anticorpos monoclonais para o DAF, sugerindo que este pode também ser um recetor celular.²³

Apesar do mecanismo de disseminação do EV-D68 ainda estar em investigação, a sua capacidade causar infeção fora do trato respiratório é sustentada pela deteção de EV-D68 noutra tipo de amostras que não respiratórias, como sangue, amostras de fezes e LCR.^{6,28}

Um dos mecanismos propostos é que o EV-D68 pode alcançar a medula espinal por infeção dos nervos periféricos do trato respiratório, sendo transmitido por transporte retrógrado ao longo dos axónios ou através da circulação sanguínea.⁶ O seu tropismo para células sanguíneas circulantes, como os leucócitos, também lhe confere a capacidade de ser transportado para órgãos secundários através de virémia.^{23,28} Alguns estudos sugerem que pode atingir a corrente sanguínea através da quebra da barreira endo-epitelial.²⁸

Por apresentar sensibilidade a pH ácidos, considerava-se que o EV-D68 não seria capaz de infetar e se replicar no trato gastrointestinal; No entanto a sua deteção em amostras de fezes, sugere que se pode replicar no intestino tal como outros Enterovírus, apesar da cavidade nasal ser o local do organismo onde se replica melhor.^{9,27,44}

A imunidade inata e a imunidade adaptativa têm um papel importante no controlo e tentativa de resolução da infeção por EV-D68.²³

A imunidade inata é a primeira resposta do sistema imunitário a ser desencadeada. O reconhecimento de RNA viral por *Pattern recognition receptors* (PRRs) como os *Toll-like receptors* (TLRs) induz a produção de Interferão tipo I e outras citocinas pró-inflamatórias, que atuam tentando inibir a replicação viral e aumentando os mecanismos de defesa das células vizinhas bem como o recrutamento de outras células de defesa para o local da infeção.^{6,20}

Na imunidade adaptativa, a resposta humoral envolve a produção de anticorpos neutralizantes pelas células, que é essencial para combater a infeção por EV-D68. Esta imunidade é comprovada pela deteção de anticorpos específicos na população, dirigidos principalmente contra a proteína VP1 da cápside do EV-



D68. Estes anticorpos atuam impedindo que o vírus infete outras células, conseguindo limitar a disseminação da infecção. Também as células T citotóxicas são recrutadas para este processo, reconhecendo e destruindo as células infetadas.²⁰

Após a infecção, as células B memória permanecem no organismo, conferindo uma imunidade duradoura pela capacidade de produzirem rapidamente anticorpos específicos caso o vírus seja novamente detetado.²⁰ As crianças, por terem sistemas imunitários mais imaturos, têm menor probabilidade de desenvolver anticorpos específicos contra este vírus.²³

No entanto, as mutações em vírus RNA são reconhecidas na comunidade científica. Nos Enterovírus em particular, sabe-se que a recombinação é frequente e pode ocorrer entre diferentes serotipos ou num único serotipo, produzindo alterações significativas.^{29,52} No EV-D68, estão reportadas deleções de nucleótidos na região 5' UTR e na região codificante de VP1 sugestivas de um aumento na sua virulência.

^{29,51}

Os baixos níveis de anticorpos na população e a sua baixa reatividade cruzada com as estirpes de EV-D68 em circulação podem justificar os surtos recentes.²³ No entanto, estudos apontam que existe reatividade entre os anticorpos formados em contexto de infecção por EV-D68 e o poliovírus, existindo também evidências de neutralização deste vírus por anticorpos dirigidos especificamente ao poliovírus, obtidos a partir de doentes saudáveis.²⁰

Apesar de todos os mecanismos de defesa ativados pela infecção por EV-D68, este vírus tem mecanismos de evasão ao sistema imunitário do hospedeiro e de favorecer a sua própria replicação. A principal e mais conhecida forma de evasão, comum a vários Enterovírus, é a supressão das respostas do interferão tipo I.²⁰

As proteases virais, produzidas durante a replicação, têm a capacidade de clivar proteínas essenciais das células hospedeiras envolvidas na indução de interferão tipo I e na síntese de citocinas pró-inflamatórias, ao mesmo tempo que facilitam a tradução do RNA viral. Um dos seus principais alvos é o eIF4G, cuja clivagem bloqueia a síntese de proteínas celulares, redirecionando os ribossomas para traduzirem preferencialmente o RNA viral através do mecanismo dependente do IRES. Este processo promove simultaneamente a replicação viral, e limita a capacidade da célula em desencadear respostas virais mediadas por interferão do tipo I.²³ Também a VP3, proteína da cápside viral, e a polimerase viral conseguem atuar sobre fatores de sinalização antiviral celulares, resultando na supressão de transcrição de interferão tipo I.²⁰



O conhecimento sobre a patogénese do EV-D68 é ainda muito escasso e permanecem várias questões por esclarecer, tais como é que o EV-D68 é capaz de causar sintomas neurológicos, uma vez que é raramente detetado no LCR.²³

1.6. Diagnóstico Laboratorial

As manifestações clínicas da infeção por Enterovírus não permitem a sua distinção evidente de outros vírus causadores de infeção respiratória, pelo que o diagnóstico laboratorial é crucial para a identificação do agente etiológico.²³

Perante a suspeita de infeção por Enterovírus, vários produtos biológicos podem ser utilizados no diagnóstico laboratorial, devendo a sua seleção ser realizada de acordo com a sintomatologia, como indicado na Tabela 2.⁵ Para um diagnóstico diferencial adequado, os produtos biológicos devem ser recolhidos o mais rapidamente possível após o início da sintomatologia.⁵

Tabela 2 – Recomendação das amostras biológicas consoante a apresentação clínica (adaptado de Harvala et al (2018)⁵)

Sintomatologia	Amostras preferenciais	Amostras complementares
Meningites	LCR	Fezes, amostras respiratórias e sangue
Sépsis neonatal	LCR	Fezes, amostras respiratórias e sangue
Paralisia flácida aguda / Mielite flácida aguda	Amostras respiratórias, Fezes	LCR e sangue
Mão-pé-boca	Fluídos das vesículas	Amostras respiratórias ou Fezes
Infeção respiratória	Amostras respiratórias	Fezes
Miocardite	Biópsia do músculo cardíaco	Fezes, amostras respiratórias e sangue
Conjuntivites	Zaragatoa ocular	–
Gastroenterites	Fezes	–

Vários tipos de amostras respiratórias podem ser utilizadas neste contexto, tais como exsudados oro- e nasofaríngeos, lavados bronco-alveolares e brônquicos, secreções brônquicas e ainda saliva.⁵

A maioria dos Enterovírus replica-se no intestino e podem ser detetados em amostras de fezes.³⁴

Em infeções neurológicas, recomendações recentes sugerem a recolha de vários produtos biológicos como amostras respiratórias, LCR, fezes e sangue. Em casos de paralisia, como os resultados de pesquisa molecular em LCR são frequentemente negativos, o exsudado nasofaríngeo é necessário, e



é fundamental o *timing* adequado da sua colheita.⁵ A zaragatoa dos fluidos de vesículas é recomendada em casos de lesões nas mãos, pés ou boca.⁵³

No LCR, a pleocitose com contagem elevada de linfócitos é comum, mas não é um requisito obrigatório para o diagnóstico de infeção por Enterovírus. Em crianças, especialmente com idades inferiores a três meses, o LCR está muitas vezes acelular devido à imaturidade do sistema imunitário.⁵

No caso específico do EV-D68, como é um vírus que afeta principalmente o trato respiratório, é mais frequente a sua deteção em amostras respiratórias, como exsudados nasofaríngeos, lavados brônquicos ou bronco-alveolares.³⁴ A sua sensibilidade a pH ácido resulta numa baixa probabilidade de deteção em amostras de fezes por ter de atravessar o estômago e intestino, ambientes naturalmente ácidos, onde seria pouco provável a sua sobrevivência. No entanto, já foi detetado EV-D68 em amostras de fezes, tal como em amostras de sangue e LCR.^{28,44}

Em casos de suspeita de AFM, é obrigatória a colheita de amostras respiratórias para excluir a suspeita de infeção por EV-D68, uma vez que o resultado da pesquisa molecular é frequentemente negativo em LCR e fezes.⁵

A deteção rápida dos Enterovírus e a sua caracterização é especialmente importante para a orientação terapêutica por exclusão etiológica dos doentes afetados e a adequação de eventuais medidas de suporte.⁵ A cultura celular tem utilidade limitada no diagnóstico do EV-D68, devido ao seu crescimento lento e pouco consistente em linhas celulares convencionais, resultando em baixa sensibilidade. Por este motivo, os métodos moleculares permitiram, em substituição desta técnica, aumentar a sensibilidade de deteção deste vírus de forma rápida e fiável.^{5,10,54}

A metodologia *gold-standard* para o diagnóstico laboratorial do EV-D68 é a deteção molecular por RT-PCR específica do EV-D68 ou um genérico de Enterovírus com alvo para a região 5' UTR seguido pela genotipagem dos genes que codificam as proteínas da cápside VP1 ou VP4-VP2.³¹

Apesar do diagnóstico molecular ser o método *gold-standard* para a deteção do EV-D68, a maioria dos painéis comerciais *multiplex* não permite distinguir entre Enterovírus e Rinovírus, nem identificar especificamente o EV-D68. Assim, a melhor opção para a deteção deste vírus é a adoção de metodologias desenvolvidas e adaptadas a cada laboratório, técnicas "*in-house*" para o EV-D68.⁴⁴



2. Objetivos

Este estudo tem como objetivo caracterizar as infeções por Enterovírus na Unidade Local de Saúde São João (ULS São João) entre agosto de 2022 e abril de 2025.

3. Metodologia

Realizou-se um estudo observacional analítico transversal.

3.1. Ética

O presente estudo foi submetido ao parecer da comissão de ética da ULS São João e aprovado.

3.2. População e amostra

População: Registos de resultados de doentes admitidos na ULS São João, em contexto de urgência ou internamento, com critérios clínicos para pesquisa molecular de Enterovírus, independentemente do quadro clínico.

Amostra: Registos de resultados de pesquisa molecular de Enterovírus em doentes admitidos na ULS São João, em contexto de urgência ou internamento, entre agosto de 2022 e abril de 2025.

3.3. Procedimentos

Para a realização deste estudo recorreu-se ao sistema informático *Clinidata XXI*, para consulta e recolha dos registos dos resultados de pesquisa molecular de Enterovírus, entre agosto de 2022 e abril de 2025. Aplicou-se como critério de exclusão a existência de pedidos informáticos em duplicado para a mesma amostra, considerando-se apenas o registo em que foi introduzido um resultado.



Para cada amostra foram recolhidas as variáveis sexo, idade, teste laboratorial e amostra biológica, sintomatologia e período de deteção (semana e ano). Estes resultados foram compilados utilizando *Software* Microsoft Excel 2021 numa base de dados construída para este efeito, onde se realizou o tratamento estatístico. Como complemento, utilizou-se o *software* de análise estatística *IBM SPSS Statistics* 29.0.1.0 para avaliar as associações entre variáveis categóricas, através do teste do Qui-quadrado de Pearson. Nas análises estatísticas foi considerado um nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

O RNA viral de todas as amostras biológicas foi extraído utilizando o *kit DSP Vírus*, nos equipamentos EZ1 e EZ2 da *Qiagen*.⁵⁵ Tendo em conta as particularidades de alguns tipos de amostra, como as secreções brônquicas e fezes, procedeu-se a um pré-tratamento. No caso das secreções brônquicas foram fluidificadas com N-acetil-L-cisteína a 2% (Sigma-Aldrich, EUA). As amostras de fezes sofreram um pré-tratamento com *InhibitEx Buffer*, do *kit QIAamp Fast DNA Stool Mini Kit*.

A deteção de Enterovírus foi realizada através de diferentes metodologias laboratoriais tais como o Painel Respiratório 2.1 *Plus* (RP2.1+, bioMérieux, França), o Painel Respiratório *Allplex2* (Seegene, Coreia do Sul), bem como uma metodologia de RT-PCR “*in-house*” direcionada para Enterovírus.

Na deteção de Enterovírus por técnica “*in house*” de RT-PCR em tempo real (RT-qPCR, do inglês *quantitative reverse transcription polymerase chain reaction*), utilizaram-se sondas *TaqMan* marcadas com fluoróforos FAM e TAMRA, dirigidas à região UTR altamente conservada, especificamente desenhadas de forma a garantirem a deteção de todos os serotipos e subgrupos de Enterovírus.^{56,57} Os *primers* e as sondas utilizadas apresentavam as seguintes sequências:

- Enterovírus Primer Forward
CCT CCG GCC CCT GAA TGC GGC TAA T
- Enterovírus Primer Reverse
ATT GTC ACC ATA AGC AGC CA
- Sondas marcadas com FAM e TAMRA
FAM – AGG AAA CAC GGA CAC CCA AAG TA – TAMRA

O protocolo iniciou-se com a fase de transcrição reversa a 50°C durante 30 minutos e ativação da *Taq* polimerase a 95°C durante 15 minutos. Seguem-se 55 ciclos de amplificação, cada um composto por desnaturação a 95°C durante 20 segundos, seguida de *annealing*/extensão a 56°C durante 60 segundos, com aquisição em FAM.

Para a sequenciação todos os eluatos foram inicialmente analisados de forma individual através de RT-qPCR dirigida ao gene VP1 do EV-D68, utilizando pares de *primers* e uma sonda *TaqMan*, conforme



descrito por *Ikuse et al. (2021)*.⁵⁸ As reações de RT-qPCR foram realizadas com o *kit iTaq Universal Probes One-Step (Bio-Rad Laboratories, EUA)*, num volume total de 20 µL, num termociclador *CFX Connect Real-Time (Bio-Rad Laboratories, EUA)*. O protocolo incluiu 45 ciclos de amplificação, cada um composto por desnaturação a 95°C durante 15 segundos, seguida de *annealing*/extensão a 55°C durante 15 segundos. O produto esperado apresentava aproximadamente 94 pares de bases.

Os eluatos de RNA foram seguidamente submetidos a sequenciação meta-genómica, permitindo a deteção viral não dirigida. A amplificação independente de sequência com *primer* único (SISPA, do inglês *Sequence-Independent Single-Primer Amplification*,) foi realizada de acordo com o protocolo descrito por Gage K. Moreno & D. H. O'Connor (2020).⁵⁹ Os produtos amplificados foram preparados para sequenciação de nova geração utilizando a tecnologia *Oxford Nanopore*, num sistema *PromethION 24* equipado com uma *flow cell R10.4.1* (Oxford Nanopore, Reino Unido). A preparação das bibliotecas foi efetuada com o kit *Native Barcoding Kit 96 V14* (SQK-NBD114.96).

O *basecalling* das leituras brutas em formato FASTQ foi realizado em modo de elevada precisão com o *software ont-dorado-for-promethion v7.4.12*, aplicando-se um limiar mínimo de qualidade (*Q-score*) de 10. A remoção inicial de adaptadores e *barcodes* foi efetuada através do *MinKNOW*. O controlo de qualidade preliminar das leituras foi realizado com o *NanoPlot v1.43.0*.⁶⁰ Subsequentemente, adaptadores e *barcodes* foram novamente removidos com o *Porechop v0.2.4*. A filtragem das leituras foi realizada com o *NanoFilt v2.8.0*, aplicando-se um valor mínimo de qualidade média de 8 e um comprimento mínimo de 360 bases em todas as amostras. Por fim, a classificação taxonómica das leituras foi realizada com o *Kraken2 v2.0.8-beta*⁶¹ utilizando as bases de dados *Standard* e *Viral* disponibilizadas na coleção AWS mantida por *Ben Langmead*.⁶²

4. Resultados

Os resultados obtidos na pesquisa de Enterovírus na ULS São João são apresentados de forma cronológica, correspondendo às amostras analisadas entre agosto de 2022 e abril de 2025, bem como à caracterização das amostras que foram alvo de sequenciação genómica. Ao longo deste período de quatro anos, foram incluídas 8964 amostras, das quais 6786 (75,70%) apresentaram resultado negativo, 1599 (17,84%) foram positivas e 579 (6,46%) não foram processadas.

Para avaliar a existência de associação entre o resultado da pesquisa de Enterovírus e as variáveis demográficas (sexo e faixa etária), foi realizado o teste do Qui-quadrado considerando a totalidade da amostra. Os resultados obtidos para a variável sexo encontram-se representados na Tabela 3.



Tabela 3 – Associação entre sexo e resultado da pesquisa de Enterovírus

		Resultado Negativo	Resultado Positivo	Total
Masculino	Valor	3622	934	4556
	Valor esperado	3687,18	868,82	4556
	% por sexo	79,50%	20,50%	100,00%
Feminino	Valor	3164	665	3829
	Valor esperado	3098,82	730,18	3829
	% por sexo	82,63%	17,37%	100,00%
Total	Valor	6786	1599	8385
	Valor esperado	6786	1599	8385
	% por sexo	80,93%	19,07%	100,00%

Qui-quadrado: $\chi^2(1) = 13,23$, $p < 0,001$

A taxa de positividade foi de 20,50% no sexo masculino *versus* 17,37% no sexo feminino ($\chi^2 = 13,23$; $p < 0,001$). Observou-se uma associação estatisticamente significativa entre positividade e sexo.

Para avaliar a existência de associação entre o resultado da pesquisa de Enterovírus e a variável idade (agrupada em faixas etárias), foi realizado o teste do Qui-quadrado considerando a totalidade da amostra. Os resultados obtidos encontram-se representados na Tabela 4.

Tabela 4 – Associação entre idade (por faixa etária) e resultado da pesquisa de Enterovírus

		Resultado Negativo	Resultado Positivo	Total	
Faixa etária em anos	< 1 ano	Valor	1365	618	1983
		Valor esperado	1604,77	378,23	1983,00
		% por faixa etária	68,84%	31,16%	100,00%
	1 – 5 anos	Valor	1396	632	2028
		Valor esperado	1641,31	386,69	2028,00
		% por faixa etária	68,83%	31,17%	100,00%
	6 – 10 anos	Valor	600	132	732
		Valor esperado	592,44	139,56	732,00
		% por faixa etária	81,97%	18,03%	100,00%
	11 – 18 anos	Valor	489	82	571
		Valor esperado	462,13	108,87	571,00
		% por faixa etária	85,64%	14,36%	100,00%



Tabela 4 (continuação)— Associação entre faixa etária e resultado da pesquisa de Enterovírus

			Resultado Negativo	Resultado Positivo	Total
>18 anos	Valor		2936	135	3071
	Valor esperado		2485,35	585,65	3071,00
	% por faixa etária		95,61%	4,39%	100,00%
Total	Valor		6786	1599	8385
	Valor esperado		6786,00	1599,00	8385,00
	% por faixa etária		80,93%	19,07%	100,00%

Qui-quadrado: $\chi^2(4) = 817,34$, $p < 0,001$

A taxa de positividade foi de 31,16% nos <1 ano *versus* 4,39% nos >18 anos ($\chi^2(4) = 817,34$; $p < 0,001$). Observou-se uma associação estatisticamente significativa entre positividade e faixa etária.

As amostras positivas para Enterovírus foram caracterizados em função do sexo, idade (agrupada por faixas etárias), sintomatologia clínica e sazonalidade. Verificaram-se 857 casos (53,60%) no sexo masculino e 742 casos (46,40%) no sexo feminino. Relativamente à idade, os casos positivos foram agrupados por faixas etárias, sendo que 618 (38,65%) ocorreram no grupo <1 ano e 632 (39,52%) no grupo 1–5 anos. Nos grupos etários seguintes, registaram-se 132 casos (8,26%) em crianças dos 6–10 anos, 82 casos (5,13%) nos 11–18 anos e 135 casos (8,44%) nos >18 anos.

A maioria dos casos positivos reportou sintomatologia como febre, tosse e rinorreia. Foram ainda registados casos de envolvimento do trato respiratório inferior, incluindo bronquiolite e pneumonia, assim como, casos mais raros com sintomatologia meníngea.

Relativamente à sazonalidade, os casos positivos de Enterovírus concentraram-se maioritariamente no final do verão e outono, prolongando-se de forma variável até ao início do inverno. Ainda assim, observaram-se alguns picos em períodos atípicos, nomeadamente no inverno e na primavera.

As amostras classificadas como “não processadas” resultaram de vários motivos, laboratoriais e clínicos. A maioria destas situações ocorreu devido à deteção de outros vírus respiratórios no rastreio inicial, em que se assume que este agente identificado seria o responsável pelo quadro apresentado, atendendo ao contexto clínico e sazonal. A ausência de células no exame citológico, com ausência de clínica sugestiva de infeção do SNC, indica uma elevada probabilidade de resultado negativo, justificando o não processamento de amostra. Estas decisões enquadram-se na prática laboratorial, permitindo

otimizar recursos e evitar análises redundantes. Adicionalmente, fatores técnicos como o volume insuficiente de material biológico, ou a incongruência entre o pedido laboratorial e o tipo de amostra disponível, contribuíram para a não realização de alguns testes. Assim, as amostras não processadas refletem tanto decisões de ordem clínica e epidemiológica, como limitações técnicas inerentes ao trabalho laboratorial.

4.1. Caracterização do ano de 2022

Em 2022, foram solicitadas 914 pesquisas moleculares para identificação de Enterovírus em diferentes produtos biológicos. Do total de amostras, 724 (79,21%) apresentaram resultado negativo, 171 (18,71%) resultado positivo e 19 amostras (2,08%) não foram processadas, como representado na Figura 4.

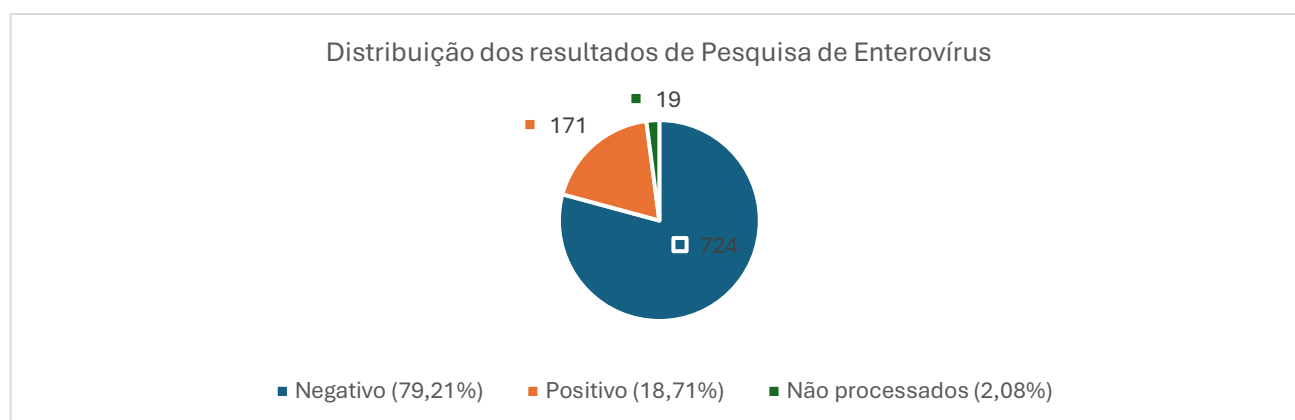


Figura 4 – Distribuição dos resultados dos testes com pesquisa de Enterovírus realizados em 2022: Negativos, Positivos e Não processados

Os motivos que justificaram o não processamento dos exames laboratoriais solicitados encontram-se descritos na Tabela 5.

Tabela 5 – Motivos para não processamento dos testes de Pesquisa de Enterovírus em 2022

Razão apresentada para não processamento	N	%
Amostra não apropriada	10	52,63%
Volume insuficiente	5	26,32%
Positividade do teste de antígeno SARS-CoV-2	3	15,79%
Sem critérios clínicos e/ou analíticos justificáveis	1	5,26%
Total	19	100,00%

Os resultados positivos na pesquisa de Enterovírus no ano de 2022 resultaram numa amostra constituída por 171 doentes, dos quais 100 (58,48%) pertenciam ao sexo masculino e 71 (41,52%) ao sexo feminino. A sua distribuição, segundo a faixa etária, encontra-se representada na Figura 5.

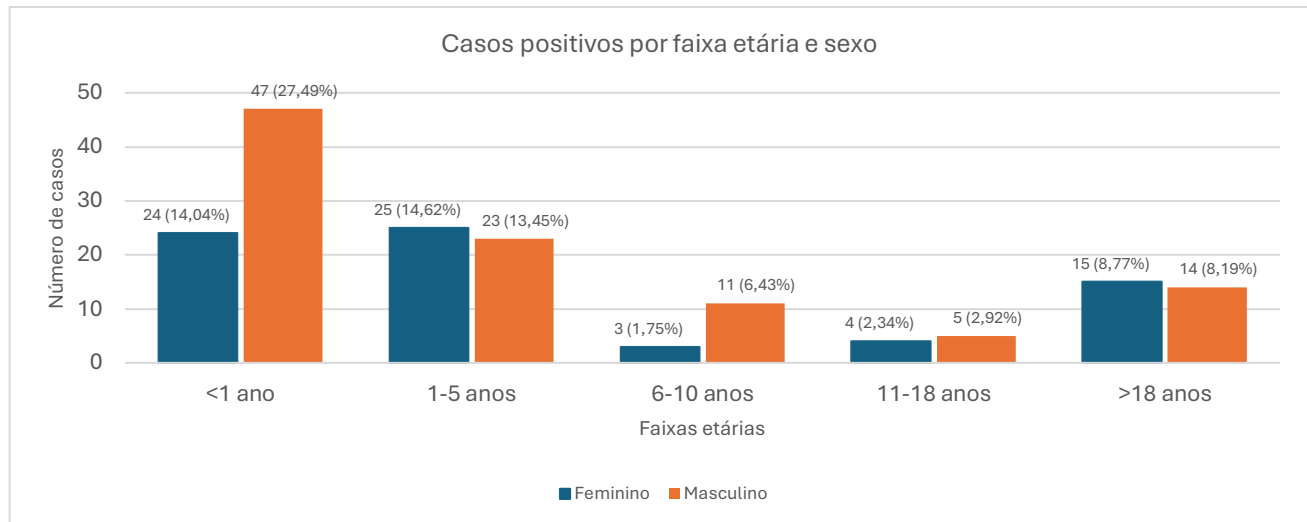


Figura 5 – Distribuição dos doentes com resultado positivo por sexo e faixa etária em 2022

A maioria dos doentes situava-se nos grupos <1 ano (41,52%) e 1–5 anos (28,07%), que em conjunto representaram 69,59% de todos os casos, confirmando que a infeção afetou sobretudo crianças <5 anos. No grupo <1 ano verificou-se um predomínio do sexo masculino (27,49% *versus* 14,04%), enquanto no grupo 1–5 anos a distribuição foi mais equilibrada (13,45% masculino *versus* 14,62% feminino). Nos grupos etários acima dos 11 anos, as diferenças entre sexos foram poucas e sem padrão consistente. As crianças de 6–10 anos corresponderam a 8,19% dos casos, os adolescentes (11–18 anos) a 5,26% e os adultos (>18 anos) a 16,96%. Estes resultados evidenciam uma expressão predominantemente pediátrica da infeção, sobretudo em menores de 5 anos, com ligeiro predomínio masculino.

Relativamente à idade, foram calculadas as seguintes medidas estatísticas sumárias:

- Mínimo: 0,03 anos (~12 dias)
- Primeiro quartil (Q1; 25%): 0,83 anos (~10 meses)
- Mediana (Q2): 2 anos
- Terceiro Quartil (Q3; 75%): 7 anos
- Máximo: 77 anos
- Média: 10,47 anos
- Desvio-padrão: 17,87 anos



A idade dos doentes variou entre 12 dias e 77 anos, com uma mediana de 2 anos e uma média de 10,47 anos. A mediana indica que metade dos doentes tinha até esta idade, confirmando a concentração dos casos nas faixas etárias mais jovens. O Q1 situou-se em 0,83 anos (\approx 10 meses) e o terceiro quartil nos 7 anos, evidenciando que 75% dos casos ocorreram em indivíduos com menos de 7 anos. A presença de alguns doentes adultos contribuiu para o aumento do valor médio da idade (10,47 anos), acompanhado por um desvio-padrão elevado (17,87 anos), refletindo maior dispersão. Dada a assimetria da distribuição, a mediana, em conjunto com os quartis, constitui a medida de tendência central mais representativa. Estes resultados estão de acordo com a distribuição etária apresentada, confirmando uma predominância de casos em crianças.

Os resultados positivos para a pesquisa de Enterovírus foram obtidos através de diferentes metodologias laboratoriais de acordo com o tipo de amostra biológica. A distribuição dos casos por tipo de exame e produto biológico encontra-se descrita na Tabela 6.

Tabela 6 – Distribuição dos resultados positivos por exame laboratorial em 2022

Exame laboratorial e produto biológico	N	%
Pesquisa de RNA de Rinovírus/Enterovírus – Painel Respiratório 2.1 <i>Plus</i> (RP2.1+)	144	84,21%
Pesquisa de RNA de Adenovírus, Enterovírus, Parainfluenza 1–4, Metapneumovírus (Secreções brônquicas)	15	8,77%
Pesquisa de RNA de Enterovírus (LCR)	9	5,26%
Pesquisa de RNA de Enterovírus (Geral)	2	1,17%
Pesquisa de RNA de Enterovírus (Lavado brônquico)	1	0,58%
Total	171	100,00%

A maioria dos resultados positivos para a pesquisa de Enterovírus (84,21%) resultou da deteção de Rinovírus/Enterovírus através do Painel Respiratório RP2.1+ *Plus*. Contudo, esta metodologia não permite diferenciar entre infeções por Rinovírus e Enterovírus, constituindo assim uma limitação na interpretação destes dados. Em 15 casos (8,77%), a positividade foi identificada por exame virológico de secreções brônquicas, que permite também a deteção de adenovírus, vírus parainfluenza 1–4 e metapneumovírus. A pesquisa dirigida de RNA de Enterovírus apresenta um número mais reduzido de casos positivos: 9 em LCR (5,26%), 2 em amostras gerais (1,17%) e 1 em lavado brônquico (0,58%).



Na sintomatologia apresentada pelos doentes com resultado positivo, a febre destacou-se como o sintoma mais frequente. Foi observada isoladamente em 41 doentes e em associação com outros sintomas em 29 casos, totalizando 70 doentes (40,94%). A associação mais comum foi febre com tosse. A tosse constituiu o segundo sintoma mais frequente, registada em 19 doentes (11,11%). Seguiram-se o diagnóstico de síndrome de dificuldade respiratória aguda (SDRA) (7,02%), a presença de rinorreia (5,26%), o diagnóstico de bronquiolite (4,09%) e presença de sintomas respiratórios inespecíficos (4,09%). Em 26,90% dos doentes não se registou informação clínica ou esta não apresentava relevância para o diagnóstico. Entre os doentes positivos, 13 casos (7,60%) apresentavam imunossupressão registada como informação clínica e, em 1 caso (0,59%), foi descrita suspeita de síndrome de Kawasaki.

A distribuição semanal dos casos positivos em 2022, baseada na data de deteção das amostras, inicia-se na semana 32 (2ª semana de agosto). Esta distribuição encontra-se representada na Figura 6.

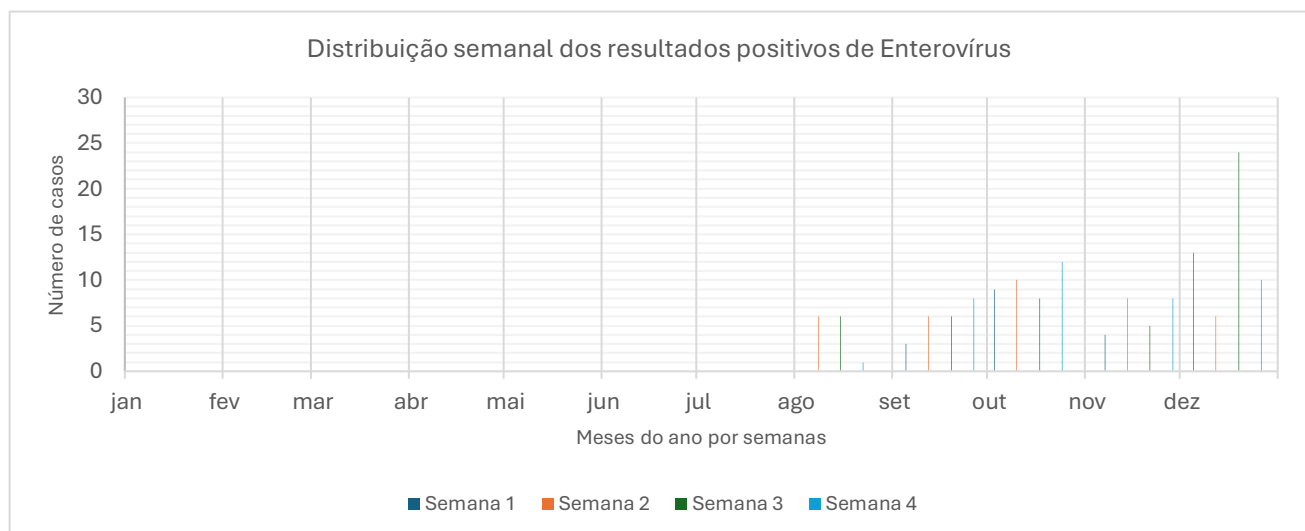


Figura 6 – Distribuição semanal dos resultados positivos de Enterovírus/Rinovírus em 2022, representados por mês e semanas

Os registos iniciam-se em agosto, observando-se poucos casos nesse mês e seguindo-se um crescimento progressivo nos meses subsequentes. O número de resultados positivos atingiu o máximo em dezembro, correspondendo ao pico da atividade, com destaque para a 4ª semana de dezembro.

4.2. Caracterização do ano de 2023

Em 2023, foram solicitadas 2652 pesquisas moleculares para a identificação de Enterovírus em diferentes produtos biológicos. Do total de amostras, 2100 (79,19%) apresentaram resultado negativo, 366 (13,80%) resultado positivo e 186 amostras (7,01%) não foram processadas, como representado na Figura 7.

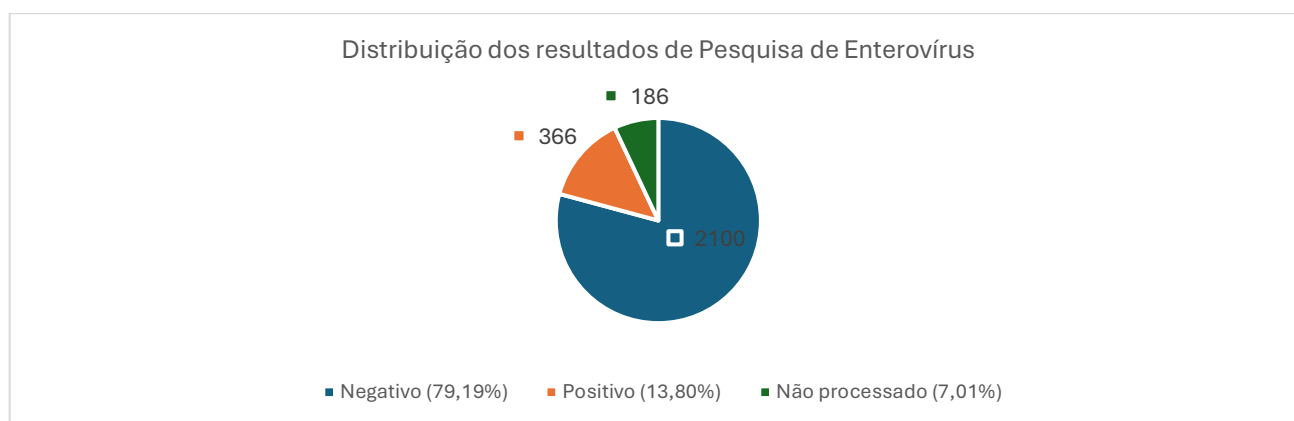


Figura 7 – Distribuição dos resultados dos testes com pesquisa de Enterovírus realizados em 2023: Negativos, Positivos e Não processados

Os motivos que justificaram o não processamento dos exames laboratoriais solicitados encontram-se descritos na Tabela 7.

Tabela 7 – Motivos para não processamento dos testes de Pesquisa de Enterovírus em 2023

Razão apresentada para não processamento	N	%
Positividade do teste de antígeno de SARS-CoV-2	128	68,82%
Positividade para outros agentes infecciosos	21	11,29%
Volume insuficiente	11	5,91%
Positividade do teste de antígeno de Influenza	10	5,38%
Amostra não apropriada	9	4,84%
Sem critérios clínicos e/ou analíticos justificáveis para a sua execução	4	2,15%
Impossibilidade de obter resultados por presença de substâncias inibidoras	2	1,08%
Amostra vertida	1	0,54%
Total	186	100,00%

Os resultados positivos na pesquisa de Enterovírus no ano de 2023 resultaram numa amostra constituída por 366 doentes, dos quais 201 (54,92%) pertenciam ao sexo masculino e 165 (45,08%) ao sexo feminino. A sua distribuição, segundo a faixa etária, encontra-se representada na Figura 8.

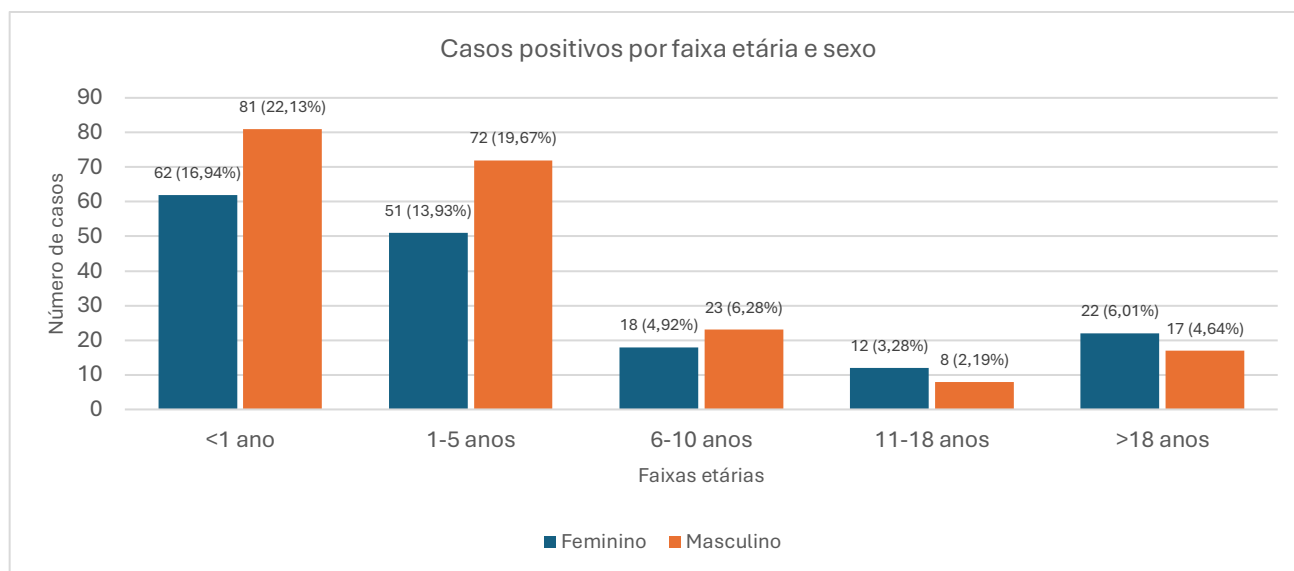


Figura 8 – Distribuição dos doentes com resultado positivo por sexo e faixa etária em 2023

A maioria dos doentes pertencia aos grupos etários <1 ano (39,07%) e 1–5 anos (33,61%), que em conjunto representaram cerca de 72,68% dos casos, confirmando o impacto predominante em crianças. No grupo <1 ano observou-se uma maior proporção de doentes do sexo masculino (22,13% versus 16,94%). A partir dos 6 anos, as diferenças entre sexos foram pouco relevantes: as crianças dos 6–10 anos corresponderam a 11,20% dos casos, os adolescentes (11–18 anos) a 5,47% e os adultos (>18 anos) a 10,66%. No global, os resultados reforçam a expressão essencialmente pediátrica da infeção, com quase três quartos dos casos em menores de 5 anos e ligeiro predomínio masculino.

Relativamente à idade, foram calculadas as seguintes medidas estatísticas sumárias:

- Mínimo: 0,01 anos ≈ 5 dias
- Q1 (25%): 0,42 anos ≈ 5 meses
- Mediana (Q2): 1 ano
- Q3 (75%): 5 anos
- Máximo: 93 anos
- Média: 7,46 anos
- Desvio-padrão: 16,40 anos



A idade dos doentes variou entre 0,01 anos (-5 dias) e 93 anos, com uma mediana de 1 ano e uma média de 7,46 anos. O Q1 correspondeu a 0,42 anos (-5 meses) e o Q3 a 5 anos, evidenciando que 75% dos casos ocorreram em idade pediátrica. A média foi de 7,46 anos, com um desvio-padrão de 16,40 anos, influenciado pela presença de alguns adultos que contribuíram para a elevação do valor médio. A distribuição etária revelou forte concentração em idades pediátricas: pelo menos metade dos doentes tinha até 1 ano de idade. Dada a marcada assimetria da distribuição, a mediana e os quartis constituem as medidas de tendência central mais representativas.

Os resultados positivos para a pesquisa de Enterovírus foram obtidos através de diferentes metodologias laboratoriais de acordo com o tipo de amostra biológica. A distribuição dos casos por tipo de exame e produto biológico encontra-se descrita na Tabela 8.

Tabela 8 – Distribuição dos resultados positivos por exame laboratorial em 2023

Exame laboratorial e produto biológico	N	%
Pesquisa de RNA de Rinovírus/Enterovírus – Painel Respiratório 2.1 Plus (RP2.1+)	304	83,06%
Pesquisa de RNA de Enterovírus (LCR)	25	6,83%
Pesquisa de RNA de Adenovírus, Enterovírus, Parainfluenza 1–4, Metapneumovírus (Secreções brônquicas)	24	6,56%
Pesquisa de RNA de Adenovírus, Enterovírus, Parainfluenza 1–4, Metapneumovírus (Exsudado nasofaríngeo)	7	1,91%
Pesquisa de RNA de Enterovírus (Geral)	4	1,09%
Pesquisa de RNA de Enterovírus (Exsudado faríngeo)	1	0,27%
Pesquisa de RNA de Enterovírus (Secreções brônquicas)	1	0,27%
Total	366	100,00%

A maioria dos resultados positivos (83,06%) resultou da deteção de Rinovírus/Enterovírus através do painel respiratório RP2.1+, tendo em contas as limitações já referidas. Os exames virológicos foram positivos em 24 casos (6,56%) em secreções brônquicas e 7 casos (1,91%) em exsudados nasofaríngeos. A pesquisa dirigida de RNA de Enterovírus acrescentou ainda 25 casos no LCR (6,83%), bem como positivities em amostras gerais (1,09%), exsudado faríngeo (0,27%) e secreções brônquicas (0,27%).

Relativamente à sintomatologia apresentada pelos doentes com resultado positivo, a febre destacou-se como o sintoma mais frequente. Foi observada isoladamente em 214 doentes (23,10%) e em associação com outros sintomas em 231 casos (24,90%), totalizando 445 doentes (48,10%). A associação mais comum foi febre com tosse. Esta constituiu o segundo sintoma mais frequente, registada em 164 doentes (17,70%). Seguiram-se o diagnóstico de SDRA em 106 doentes (11,40%), a presença de rinorreia em 65 (7,00%) e o diagnóstico de bronquiolite em 61 (6,60%). Adicionalmente, foram registados 15 doentes com asma (4,10%) e 64 imunocomprometidos (17,50%). Em 45 doentes positivos (12,30%) não se registou informação clínica, o que constitui uma limitação para a caracterização completa da sintomatologia.

A distribuição semanal dos resultados positivos durante o ano de 2023, encontra-se representada na Figura 9.

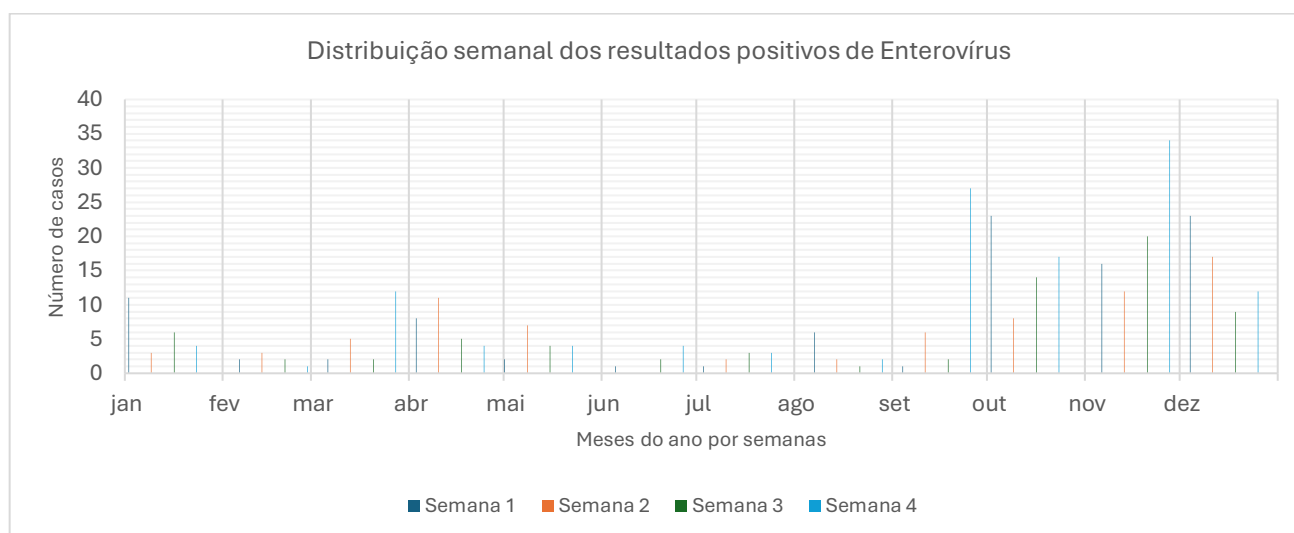


Figura 9 – Distribuição semanal dos resultados positivos de Enterovírus/Rinovírus em 2023, representados por mês e semanas

A distribuição semanal por mês evidenciou um padrão sazonal marcado. Verificaram-se casos positivos desde o início do ano, com números ainda baixos em janeiro e fevereiro, e um primeiro pico entre março e abril. Seguiu-se uma redução acentuada durante o verão, atingindo valores mínimos em junho e julho, e mantendo atividade residual em agosto. A partir de setembro ocorreu uma nova subida, resultando em picos bem definidos nos meses de outubro, novembro e dezembro.

4.3. Caracterização do ano de 2024

Em 2024, foram solicitadas 4440 pesquisas moleculares para identificação de Enterovírus em diferentes produtos biológicos. Do total de amostras, 3241 (73,00%) apresentaram resultado negativo, 926 (20,85%) resultado positivo e 273 amostras (6,15%) não foram processadas, como representado na Figura 10.

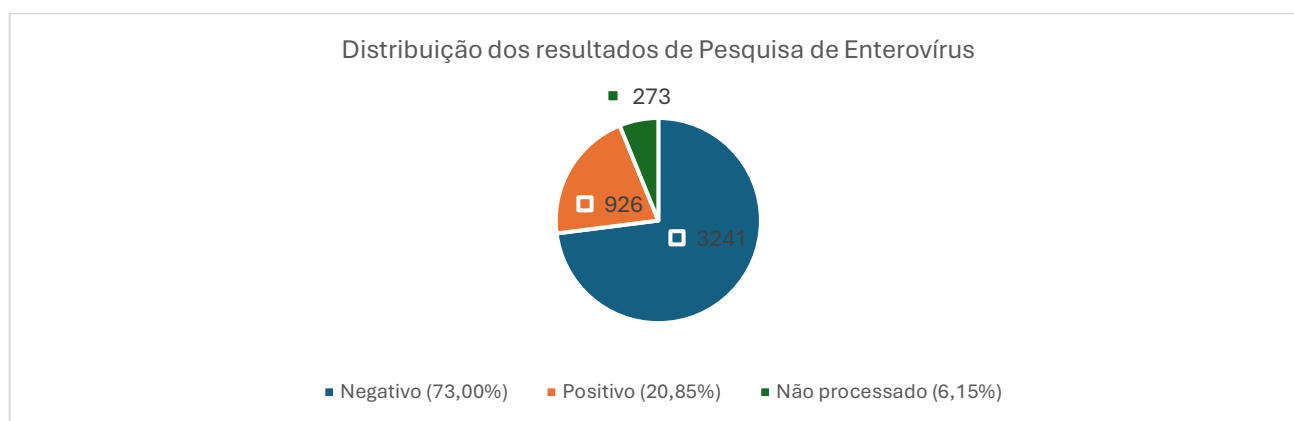


Figura 10 – Distribuição dos resultados dos testes com pesquisa de Enterovírus realizados em 2024: Negativos, Positivos e Não processados

Os motivos que justificaram o não processamento dos exames laboratoriais solicitados encontram-se descritos na Tabela 9.

Tabela 9 – Motivos para não processamento dos testes de Pesquisa de Enterovírus em 2024

Razão apresentada para não processamento	N	%
Positividade do teste de antígeno de SARS-CoV-2	121	44,31%
Positividade do teste de antígeno de Influenza	100	36,63%
Positividade para outros agentes infecciosos	34	12,45%
Volume insuficiente	9	3,30%
Amostra não apropriada	4	1,47%
Sem critérios clínicos e/ou analíticos justificáveis para a sua execução	3	1,10%
Ausência de células no exame citológico – não se justifica a pesquisa molecular de agentes infecciosos do SNC	1	0,37%
Amostra mal identificada	1	0,37%
Total	273	100,00%

Os resultados positivos na pesquisa de Enterovírus no ano de 2024 resultaram numa amostra constituída por 926 doentes, dos quais 538 (58,10%) pertenciam ao sexo masculino e 388 (41,90%) ao sexo feminino. A sua distribuição, segundo a faixa etária, encontra-se representada na Figura 11.

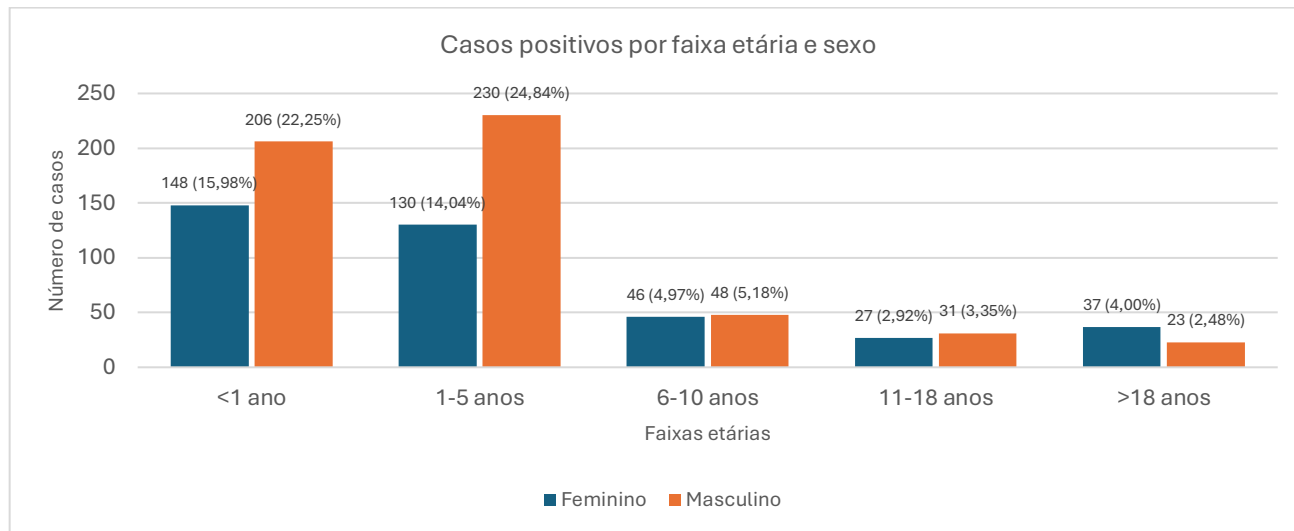


Figura 11 – Distribuição dos doentes com resultado positivo por sexo e faixa etária em 2024

A análise da distribuição por sexo e faixa etária revelou que a maioria dos casos ocorreu em crianças com menos de 5 anos, correspondendo a 38,23% no grupo <1 ano e 38,88% no grupo 1–5 anos. Nos grupos etários ≥ 6 anos a frequência foi bastante inferior: 10,15% nos 6–10 anos, 6,27% nos 11–18 anos e 6,48% nos adultos (>18 anos). Globalmente, verificou-se uma predominância masculina (58,10% versus 41,90% no feminino), mais evidente nas faixas <1 ano e 1–5 anos. Nos restantes grupos, a distribuição foi mais equilibrada, com discreto predomínio masculino nos 6–10 e 11–18 anos, e ligeiro predomínio feminino nos >18 anos.

Relativamente à idade, foram calculadas as seguintes medidas estatísticas sumárias:

- Mínimo: 0,01 anos \approx 5 dias
- Q1 (25%): 0,50 anos \approx 6 meses
- Mediana (Q2): 1 ano
- Q3 (75%): 4 anos
- Máximo: 95 anos
- Média: 6,02 anos
- Desvio-padrão: 14,72 anos



A idade dos doentes variou entre 5 dias e 95 anos, com uma mediana de 1 ano e uma média de 6,02 anos. A mediana indica que metade dos doentes tinha até esta idade, confirmando a concentração dos casos nas faixas etárias mais jovens. O Q1 situou-se nos 6 meses (0,50 anos) e o Q3 nos 4 anos, evidenciando que 75% dos casos ocorreram em indivíduos com menos de 4 anos, maioritariamente em idade pediátrica. A presença de alguns doentes adultos contribuiu para o aumento do valor médio da idade (6,02 anos), acompanhado por um desvio-padrão de 14,72 anos, refletindo maior dispersão. Dada a assimetria da distribuição, a mediana, em conjunto com os quartis, constitui a medida de tendência central mais representativa.

Os resultados positivos para a pesquisa de Enterovírus foram obtidos através de diferentes metodologias laboratoriais de acordo com o tipo de amostra biológica. A distribuição dos casos por tipo de exame e produto biológico encontra-se descrita na Tabela 10.

Tabela 10 – Distribuição dos resultados positivos por exame laboratorial em 2024

Exame laboratorial e produto biológico	N	%
Pesquisa de RNA de Rinovírus/Enterovírus – Painel Respiratório 2.1 Plus (RP2.1+)	814	87,90%
Pesquisa de RNA de Adenovírus, Enterovírus, Parainfluenza 1-4, Metapneumovírus (Exsudado nasofaríngeo)	77	8,32%
Pesquisa de RNA de Enterovírus (LCR)	24	2,59%
Pesquisa de RNA de Adenovírus, Enterovírus, Parainfluenza 1-4, Metapneumovírus (Secreções brônquicas)	7	0,76%
Pesquisa de RNA de Enterovírus (Exsudado faríngeo)	3	0,32%
Pesquisa de RNA de Enterovírus (Geral)	1	0,11%
Total	926	100,00%

A maioria dos resultados positivos (87,90%) foi obtida através da deteção de Rinovírus/Enterovírus pelo Painel Respiratório RP2.1+, tendo em conta as limitações já referidas. Os exames virológicos resultaram em 77 casos (8,32%) positivos em exsudados nasofaríngeos e 7 casos (0,76%) em secreções brônquicas. A pesquisa dirigida de RNA de Enterovírus acrescentou ainda 24 casos de Enterovírus no LCR (2,59%), bem como positividade em exsudados faríngeos (0,32%) e em amostras gerais (0,11%).

Relativamente à sintomatologia apresentada pelos doentes com resultado positivo, por análise das informações clínicas descritas, a febre foi o sintoma mais frequente, registada em 432 casos (46,60%).



Destes, 214 (23,10%) ocorreram de forma isolada, enquanto 218 (23,50%) surgiram em associação com outros sintomas respiratórios. O segundo sintoma mais descrito foi a tosse, documentada em 163 doentes (17,60%), ocorrendo isoladamente em 35 casos (3,80%) e em associação com outras manifestações em 128 casos (13,80%). Seguiram-se o diagnóstico de SDRa em 104 doentes (11,20%), a presença de rinorreia em 65 (7,00%), o diagnóstico de bronquiolite em 61 (6,60%) e o diagnóstico de pneumonia em 27 (2,90%). No conjunto dos doentes avaliados, 87 doentes (9,40%) não apresentavam informação clínica registada ou esta não apresentava relevância clínica, o que corresponde a cerca de 1 em cada 10 casos. Entre as condições clínicas associadas, identificaram-se 15 doentes asmáticos (1,60%) e 64 imunocomprometidos (6,90%).

A distribuição semanal dos resultados positivos durante o ano de 2024, encontra-se representada na Figura 12.

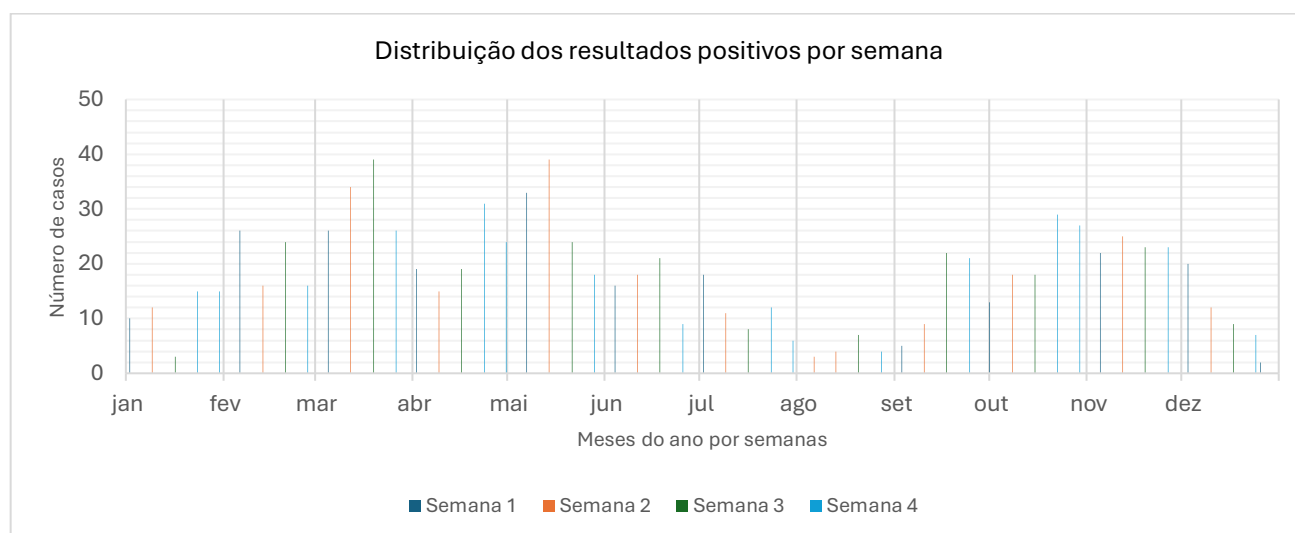


Figura 12 – Distribuição semanal dos resultados positivos de Enterovírus/Rinovírus em 2024, representados por mês e semanas

Na análise da distribuição semanal dos casos positivos, verificou-se um aumento progressivo a partir de fevereiro, culminando num pico acentuado entre março e maio, período em que se registaram as maiores frequências semanais. Seguiu-se uma redução marcada durante os meses de junho a agosto, atingindo valores mínimos em agosto. A partir de setembro, os casos voltaram a aumentar, culminando num novo pico em outubro e novembro, antes de se observar uma diminuição no final de dezembro.

4.4. Caracterização do ano de 2025

Em 2025, foram solicitadas até abril 958 pesquisas moleculares para identificação de Enterovírus em diferentes produtos biológicos. Do total de amostras, 721 (75,26%) apresentaram um resultado negativo, 136 (14,20%) um resultado positivo e 101 amostras (10,54%) não foram processadas, como representado na Figura 13.

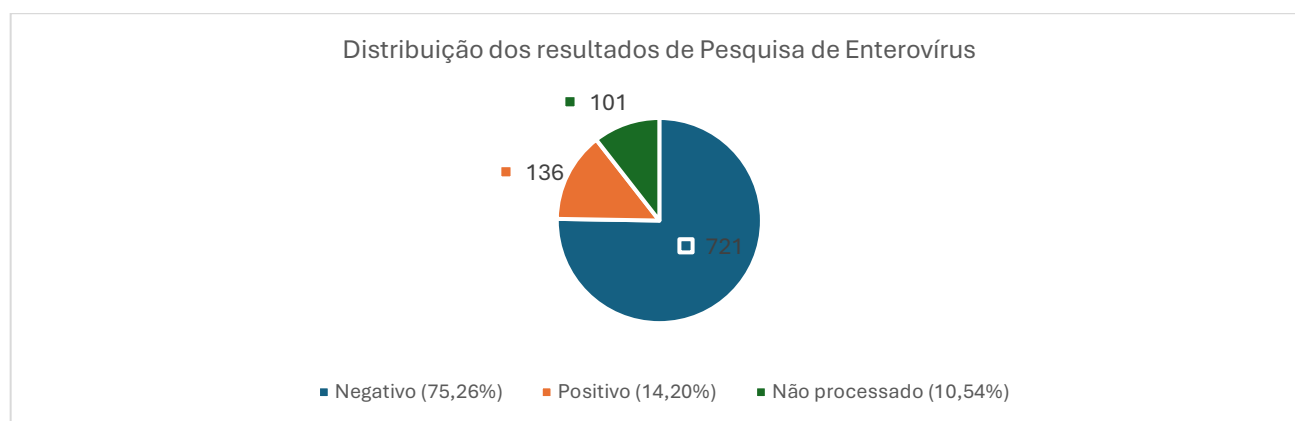


Figura 13 – Distribuição dos resultados dos testes com pesquisa de Enterovírus realizados em 2025: Negativos, Positivos e Não processados

Os motivos que justificaram o não processamento do pedido realizado encontram-se descritos na Tabela 11.

Tabela 11 – Motivos para não processamento dos testes de Pesquisa de Enterovírus em 2025

Razão apresentada para não processamento	N	%
Positividade do teste de antígeno de Influenza	64	63,37%
Positividade para outros agentes infecciosos	27	26,73%
Ausência de células no exame citológico – não se justifica a pesquisa molecular de agentes infecciosos do SNC	6	5,94%
Positividade do teste de antígeno de SARS-CoV-2	2	1,98%
Não foi possível obter o resultado da pesquisa devido à presença de substâncias inibidoras desta amplificação	1	0,99%
Amostra não apropriada	1	0,99%
Total	101	100,00%

Os resultados positivos na pesquisa de Enterovírus no ano de 2025 resultaram numa amostra constituída por 136 doentes, dos quais 95 (69,85%) pertenciam ao sexo masculino e 41 (30,15%) ao sexo feminino. A sua distribuição, segundo a faixa etária, encontra-se representada na Figura 14.

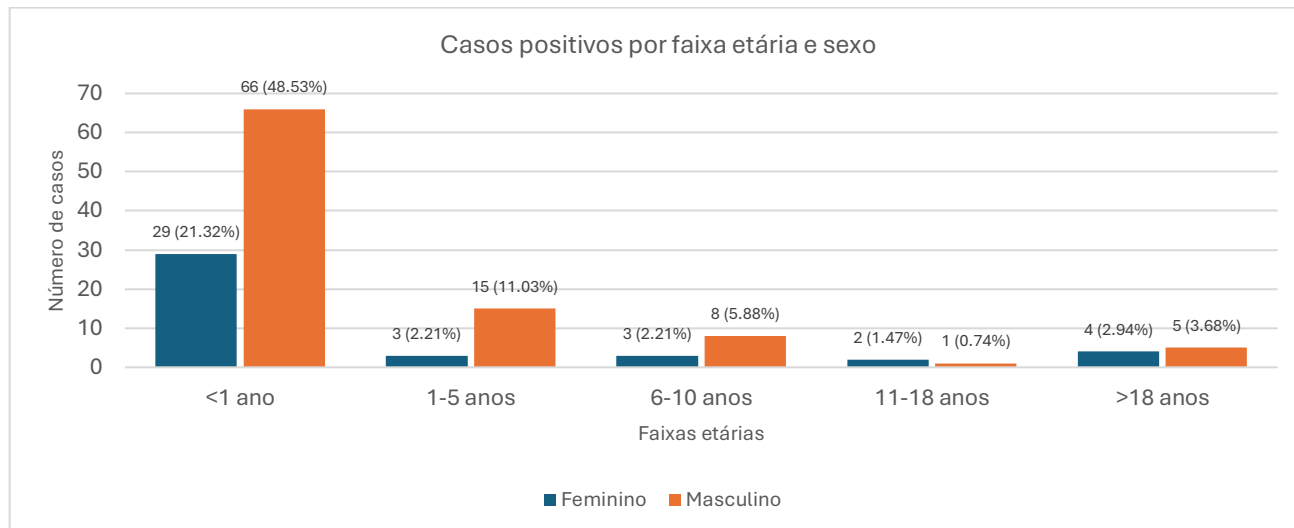


Figura 14 – Distribuição dos doentes com resultado positivo por sexo e faixa etária em 2025

A análise da distribuição dos casos positivos por sexo e faixa etária em 2025 evidenciou um claro predomínio no grupo <1 ano, que representou 69,85% do total. Nesta faixa, a frequência foi superior no sexo masculino (48,53%) face ao feminino (21,32%). No grupo 1–5 anos observaram-se 13,24% dos casos, novamente com predominância masculina (11,03% versus 2,21% no feminino). Nos grupos etários mais elevados a frequência foi bastante reduzida: nos 6–10 anos registaram-se 8 casos masculinos (5,88%) e 3 casos femininos (2,21%); no grupo 11–18 anos apenas 3 casos no total (0,74% masculinos e 1,47% femininos). Entre os >18 anos contabilizaram-se 9 casos, com distribuição equilibrada entre 5 masculinos (3,68%) e 4 femininos (2,94%). De forma global, a distribuição etária mostra que a infeção afetou predominantemente crianças, com uma clara predominância do sexo masculino na maioria das faixas etárias.

Relativamente à idade, foram calculadas as seguintes medidas estatísticas sumárias:

- Mínimo: 0,02 anos ≈ 6 dias
- Q1 (25%): 0,17 anos ≈ 2 meses
- Mediana (Q2): 0,83 anos ≈ 10 meses
- Q3 (75%): 3 anos
- Máximo: 87 anos



- Média: 5,04 anos
- Desvio-padrão: 13,33 anos

A idade dos doentes variou entre 6 dias e 87 anos, com uma mediana de 0,83 anos (\approx 10 meses) e uma média de 5,04 anos. A mediana confirma que metade dos doentes tinha até esta idade, evidenciando a concentração dos casos em crianças muito pequenas. O Q1 situou-se nos 0,17 anos (\approx 2 meses) e o Q3 nos 3 anos, mostrando que 75% dos casos ocorreram em indivíduos com menos de 3 anos, predominantemente em idade pediátrica. A presença de alguns doentes adultos contribuiu para o aumento do valor médio da idade (5,04 anos), acompanhado por um desvio-padrão de 13,33 anos, refletindo maior dispersão. Dada a assimetria da distribuição, a mediana, em conjunto com os quartis, constitui a medida de tendência central mais representativa. Estes resultados confirmam uma predominância clara de casos em crianças nas faixas etárias mais baixas.

Os resultados positivos para a pesquisa de Enterovírus foram obtidos através de diferentes metodologias laboratoriais de acordo com o tipo de amostra biológica. A distribuição dos casos por tipo de exame e produto biológico encontra-se descrita na Tabela 12.

Tabela 12 – Distribuição dos resultados positivos por exame laboratorial em 2025

Exame laboratorial e produto biológico	N	%
Pesquisa de RNA de Rinovírus/Enterovírus – Painel Respiratório 2.1 Plus (RP2.1+)	111	81,62%
Pesquisa de RNA de Enterovírus (LCR)	11	8,09%
Pesquisa de RNA de Adenovírus, Enterovírus, Parainfluenza 1–4, Metapneumovírus (Exsudado nasofaríngeo)	11	8,09%
Pesquisa de RNA de Enterovírus (Geral)	3	2,21%
Total	136	100,00%

A maioria dos resultados positivos (81,62%) foi obtida através da deteção de Rinovírus/Enterovírus pelo Painel Respiratório 2.1 Plus (RP2.1+), com a limitação já referida. A pesquisa dirigida de RNA de Enterovírus no LCR representa 11 casos (8,09%), valor idêntico ao dos exames virológicos em exsudado nasofaríngeo. A pesquisa de RNA de Enterovírus (geral) acrescentou ainda 3 casos (2,21%).

Relativamente à sintomatologia apresentada pelos doentes com resultado positivo, por análise das informações clínicas descritas, a febre foi o sintoma mais frequentemente registado, presente em 65 doentes (47,79%). Em 37 casos (27,21%) surgiu de forma isolada, enquanto em 28 casos (20,59%)



ocorreu em associação com outros sinais clínicos. As combinações mais comuns incluíram febre com rinorreia e tosse em 4 casos (2,94%), febre com infeção respiratória em 3 casos (2,21%) e febre com tosse em 3 casos (2,21%). Para além da febre, os sintomas mais frequentemente descritos foram o diagnóstico de SDRA em 23 casos (16,91%), tosse em 21 casos (15,44%) e o diagnóstico de bronquiolite em 10 casos (7,35%). No total, identificaram-se 5 doentes imunocomprometidos (3,68%) e 3 com asma (2,21%). Em 11 casos (8,09%) não foi registada qualquer informação clínica ou esta não apresentava relevância.

A distribuição semanal dos resultados positivos até abril de 2025, período de recolha dos dados, encontra-se representada na Figura 15.

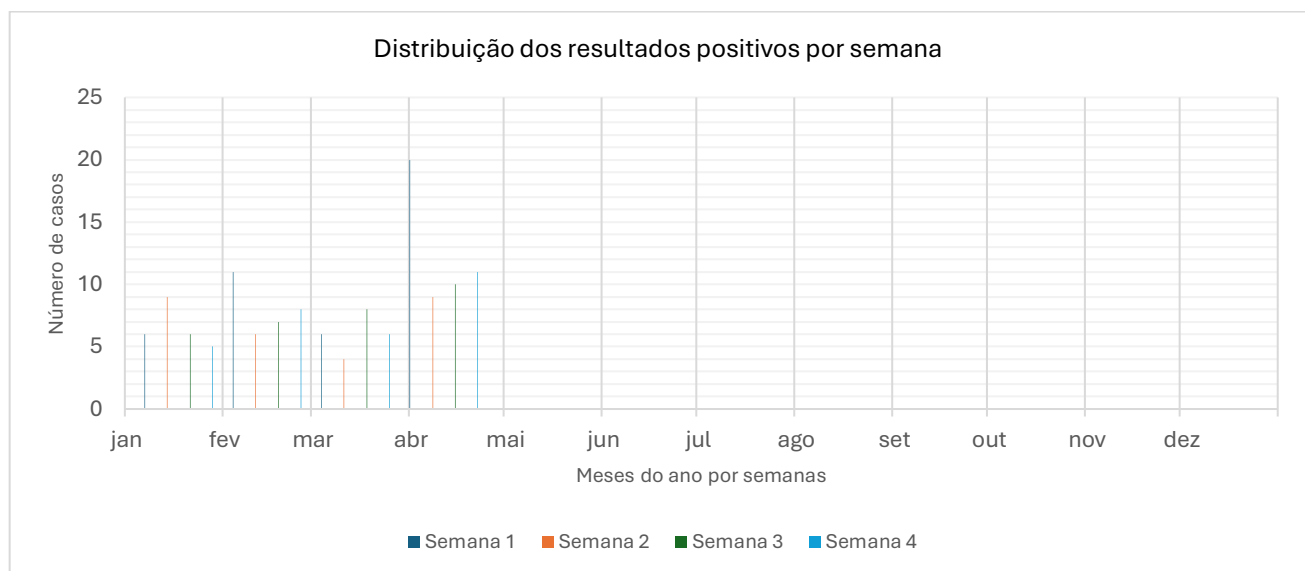


Figura 15 – Distribuição semanal dos resultados positivos de Enterovírus/Rinovírus em 2025, representados por mês e semanas

A análise da distribuição semanal dos casos positivos de Enterovírus revelou atividade contínua entre janeiro e março, com pequenas variações semanais. Em abril, verificou-se um aumento mais acentuado do número de casos, atingindo-se o pico de atividade logo na primeira semana do mês.

4.5. Caracterização das amostras processadas

De todas as amostras positivas para Enterovírus foram apenas submetidas a sequenciação genómica 42 amostras de LCR, com o objetivo de determinar se os Enterovírus pertenciam ao serotipo D68. A distribuição anual das amostras sequenciadas encontra-se representada na Figura 16. Em 2022 foram incluídos apenas amostras do período de agosto a dezembro e, em 2025, de janeiro a abril.

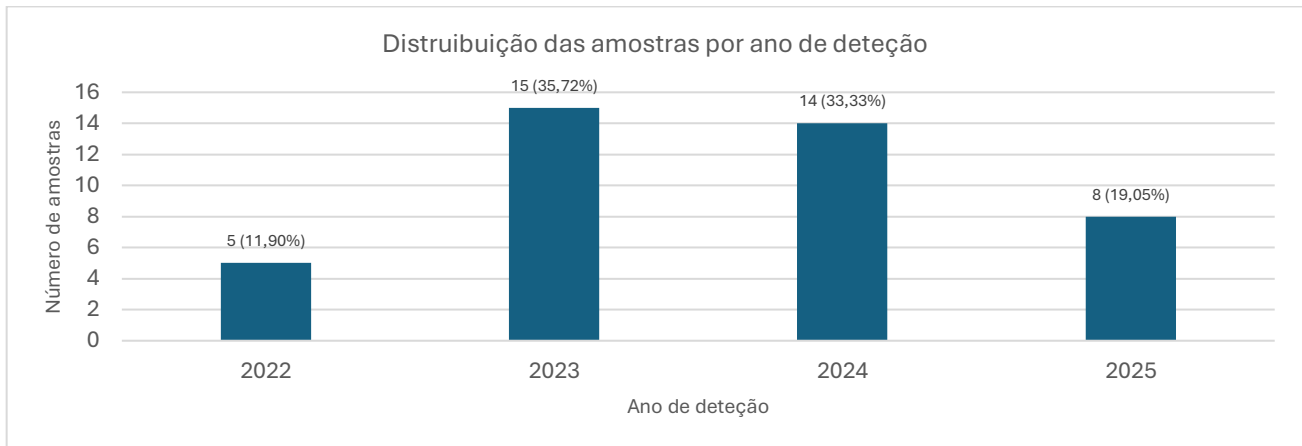


Figura 16 – Distribuição anual das amostras sequenciadas

Relativamente ao sexo, processaram-se 24 amostras de doentes masculinos (57,14%) e 18 amostras de doentes femininos (42,86%), correspondendo a uma distribuição relativamente equilibrada. Quanto à idade, verificou-se que a maioria das amostras sequenciadas provinha de indivíduos em idade pediátrica. Em 90,48% dos casos analisados as idades eram inferiores a 10 anos, sendo que 45,24% dos casos situavam-se no grupo dos 1–5 anos, como apresentado na seguinte Figura 17.

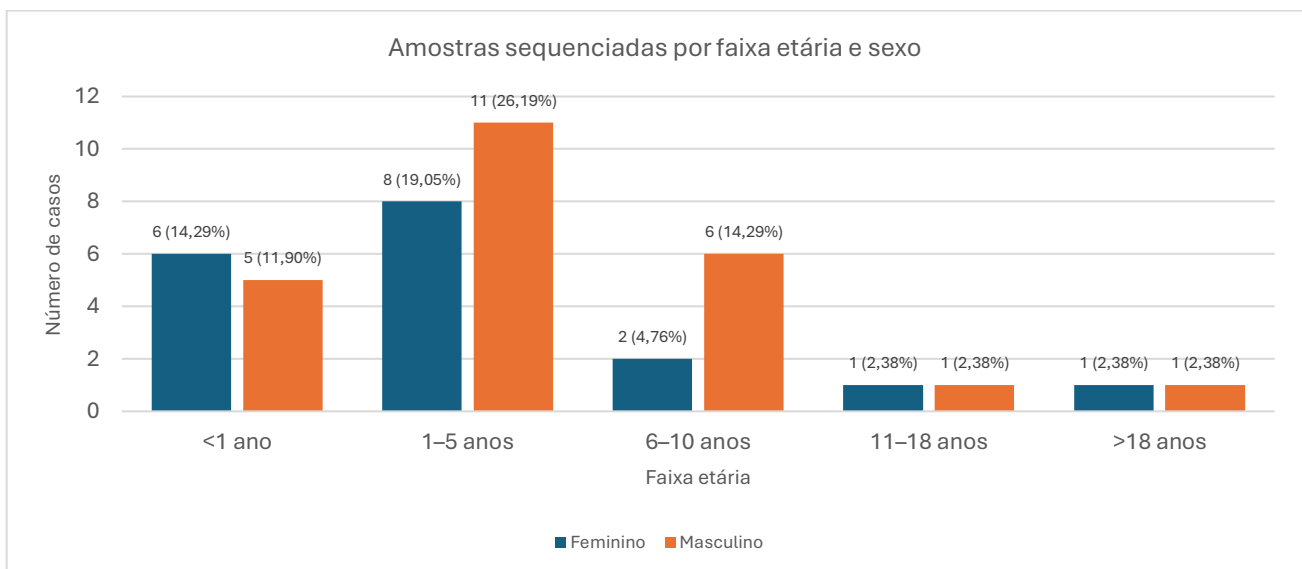


Figura 17 – Distribuição das amostras processadas por sexo e faixa etária



A variável idade apresentava as seguintes medidas estatísticas sumárias:

- Mínimo: 0,02 anos (~6 dias)
- Q1: 0,80 anos (~10 meses)
- Mediana (Q2): 4 anos
- Q3: 6 anos
- Máximo: 31 anos
- Média: 4,94 anos
- Desvio-padrão: 6,39 anos

A variável idade apresentou uma média de 4,94 anos e uma mediana de 4 anos, com um desvio-padrão de 6,39 anos, refletindo alguma dispersão na distribuição. A idade mínima registada foi de 0,016 anos (~6 dias) e a máxima de 31 anos. O Q1 situou-se em 0,80 anos (~10 meses) e o Q3 em 6 anos, indicando que 50% dos doentes tinham idades compreendidas entre 10 meses e 6 anos. Estes resultados verificam uma concentração marcada dos casos em idade pediátrica, ainda que a presença de indivíduos mais velhos tenha contribuído para o aumento da média e da variabilidade observada.

O resultado da sequenciação destas amostras, dirigida ao serotipo D68 dos Enterovírus, foi realizado de acordo com o protocolo descrito anteriormente e não identificou nenhum caso positivo.



5. Discussão

O estudo epidemiológico do EV-D68 tem particular importância pela sua associação a infeções respiratórias graves em crianças e pela relação, cada vez mais documentada, com complicações neurológicas como a AFM.^{6,7,39} O conhecimento da sua circulação e impacto clínico é fundamental para orientar estratégias de vigilância epidemiológica e laboratorial, permitindo uma resposta mais eficaz perante potenciais surtos.^{5,10,31}

O presente estudo compreendeu um período de aproximadamente quatro anos consecutivos, entre agosto de 2022 e abril de 2025, com o objetivo de conhecer a circulação do EV-D68 na população de doentes que recorreram à ULS São João. Foi realizada uma análise demográfica, clínica e epidemiológica dos casos detetados bem como a caracterização molecular de um conjunto de amostras selecionadas.

Procedeu-se à avaliação da associação entre as variáveis demográficas — sexo e idade (agrupada por faixas etárias) — e os resultados da pesquisa de Enterovírus, recorrendo ao teste do Qui-quadrado de *Pearson*, considerando um nível de significância de $\alpha = 0,05$.

Conforme apresentado na Tabela 3, na análise da associação entre sexo e resultado observou-se uma diferença estatisticamente significativa ($p < 0,001$), com uma proporção ligeiramente superior de casos positivos no sexo masculino (20,50%) em comparação com o sexo feminino (17,37%). Esta diferença, embora estatisticamente significativa, resulta em parte da dimensão elevada da amostra, o que faz com que variações pequenas se tornem significativas, podendo não existir relevância clínica.

Na Tabela 4, observaram-se diferenças significativas na proporção de resultados positivos entre as diferentes faixas etárias ($p < 0,001$). Os grupos <1 ano e 1–5 anos apresentaram as proporções mais elevadas de casos positivos (31,16% e 31,17%), concentrando a maioria das infeções. A partir dos 6 anos verificou-se uma redução progressiva, com 18,03% de positivos entre os 6–10 anos, 14,36% entre os 11–18 anos e apenas 4,39% na população adulta (>18 anos). Este padrão está de acordo com o descrito na literatura, como já referido, que identifica a população pediátrica, em particular nos primeiros anos de vida, como a mais suscetível à infeção por Enterovírus.

Quanto aos resultados positivos, a análise da distribuição etária durante os quatro anos em estudo, revelou que a maioria dos casos positivos de Enterovírus ocorreu em crianças com menos de 16 anos, sobretudo nos grupos <1 ano e 1–5 anos. Este padrão manteve-se consistente ao longo dos quatro anos de estudo, ainda que com pequenas variações anuais. Em 2022 e 2023, verificou-se maior expressão nos grupos etários mais jovens, com particular destaque para as crianças até aos 5 anos. Em 2024,



observou-se novamente um predomínio das faixas pediátricas, mas com uma proporção mais equilibrada entre os diferentes intervalos etários, incluindo um número não negligenciável de casos em adultos.

Relativamente ao sexo, a distribuição global foi equilibrada, não se verificando diferenças expressivas entre indivíduos do sexo masculino e feminino. Observou-se ainda assim, em todos os anos, um ligeiro predomínio do sexo masculino, o que não configura um padrão nem apresenta relevância clínica.

Estes resultados estão em concordância com a literatura, que descreve as infeções por Enterovírus como mais frequentes em idade pediátrica, com maior incidência em crianças mais jovens devido à imaturidade do sistema imunitário, mas sem associação clara ao sexo. A observação de casos em adultos confirma igualmente que, embora menos comum, a infeção pode ocorrer em qualquer faixa etária.^{3,14,16,18} Importa ainda salientar que, antes da pandemia de COVID-19, a pesquisa sistemática de vírus respiratórios em adultos era pouco frequente, pelo que a verdadeira prevalência destes agentes nesta faixa etária antes de 2020 permanece incerta.^{63,64}

A maioria das manifestações clínicas esteve associada a infeções respiratórias, predominantemente do trato respiratório superior, traduzindo-se em febre, tosse e rinorreia. Em alguns casos foi também descrito envolvimento do trato respiratório inferior, como bronquiolite e pneumonia, situações que podem justificar internamento hospitalar e necessidade de suporte terapêutico. Este perfil é consistente com o descrito na literatura, onde o EV-D68 se encontra associado a infeções respiratórias que podem variar de formas ligeiras a graves.^{6,23,28} A literatura refere ainda que doentes asmáticos ou imunocomprometidos apresentam risco acrescido de formas mais graves de infeção por EV-D68. Nos casos avaliados, não foi possível explorar em detalhe estas associações, embora se tenham identificado indivíduos imunocomprometidos e com asma entre a população de doentes positivos para Enterovírus.^{7,23} Apesar da associação com complicações neurológicas, nomeadamente a AFM, estar documentada em surtos internacionais, não foram observados casos compatíveis com esta condição neste conjunto de dados.^{31,34,39} No que respeita a fatores de risco, a maior vulnerabilidade foi observada nas crianças mais jovens, em particular no grupo <5 anos, alinhando-se com o descrito em outros trabalhos que apontam a imaturidade do sistema imunitário como determinante para a gravidade da doença.^{4,9,30}

Nos quatro anos analisados, os casos positivos de Enterovírus concentraram-se maioritariamente no final do verão e outono, com prolongamento variável para o início do inverno (aproximadamente setembro–dezembro). Este padrão foi evidente em 2022 e 2023 e voltou a observar-se em 2024, ano



em que a proporção de positivos atingiu o valor mais elevado (20,85%), o que poderá refletir uma maior circulação de Enterovírus nesse período. Em 2025, os dados disponíveis referem-se apenas até abril, não sendo por isso possível avaliar a eventual ocorrência de um pico outonal. Relacionando esta distribuição sazonal com o padrão descrito para EV-D68, caracteristicamente bienal e com maior circulação nos meses de final de verão e outono, não se observam nestes dados agregados de Enterovírus uma periodicidade clara que permita confirmar esse comportamento.^{23,32}

Em alguns momentos da série temporal observaram-se picos de casos positivos em períodos que não correspondem à sazonalidade típica dos Enterovírus, habitualmente concentrada no final do verão e outono.^{23,65} Uma explicação provável é a deteção de Rinovírus, já que o painel *multiplex* Respiratório 2.1 *Plus* (RP2.1+) utilizado na rotina laboratorial na ULS São João reporta o resultado combinado “Rinovírus/Enterovírus”, sem distinção entre os agentes. Como a circulação dos Rinovírus é mais prolongada, com picos frequentes no outono e na primavera, parte destes resultados positivos poderá refletir a sua predominância sazonal.^{5,14} Nestes dados, o prolongamento da atividade até ao inverno de 2023/2024 e a deteção de casos na primavera de 2025 poderão refletir, pelo menos em parte, essa circulação alargada dos Rinovírus, cuja sazonalidade é bem descrita na literatura. Deste modo, embora os resultados revelem um perfil globalmente compatível com a sazonalidade clássica de Enterovírus, não são totalmente sobreponíveis ao padrão descrito. A pandemia de COVID-19 alterou de forma significativa a dinâmica dos vírus respiratórios, levando à perda do padrão sazonal previamente reconhecido. Nos anos imediatamente subsequentes, a circulação destes agentes mostrou-se irregular.^{63,64}

A confirmação de uma periodicidade bienal específica para o EV-D68 exigiria uma estratégia de diagnóstico que permita discriminar Enterovírus de Rinovírus e identificar especificamente o EV-D68, garantindo a identificação correta do agente etiológico e minimizando o viés introduzido tanto pelos painéis combinados como pelas exclusões baseadas na positividade para outros vírus.^{5,37}

Para além da análise epidemiológica, demográfica e clínica, foi realizada a sequenciação de um conjunto de amostras selecionadas, com o objetivo de avaliar a eventual presença de EV-D68 nos doentes da ULS São João durante o período em estudo. A sequenciação permite caracterizar de forma precisa o material genético viral, fornecendo informação essencial para a tipagem e identificação de estirpes específicas e bem como a identificação de mutações, recombinações genéticas e relações evolutivas entre estirpes através da comparação das sequências obtidas com genomas de referência. Fornece desta forma, uma visão global do genoma viral, sendo fundamental para vigilância epidemiológica, estudo da evolução e compreensão da patogénese do EV-D68.^{48,65,66}



Neste estudo, optou-se por caracterizar em pormenor amostras de LCR cuja identificação molecular para Enterovírus foi positiva, dado que, embora o EV-D68 seja sobretudo conhecido pela sua associação a quadros respiratórios, o maior impacto clínico e epidemiológico resulta das suas manifestações neurológicas, em particular a AFM. Contudo, a deteção deste vírus em LCR é rara, mesmo em doentes com sintomatologia neurológica compatível.

A análise das amostras selecionadas para sequenciação permitiu avaliar a sua distribuição ao longo dos quatro anos de estudo, abrangendo diferentes faixas etárias e ambos os sexos. A maioria das amostras pertencia ao grupo pediátrico, em particular crianças <5 anos, o que é consistente com o perfil etário dos casos positivos observados na pesquisa transversal de Enterovírus.^{16,30} Também se verificou uma distribuição relativamente homogénea entre sexos e uma maior concentração de casos nos meses de outono, tal como descrito para a sazonalidade deste grupo viral.^{3,16}

Todos os resultados obtidos na sequenciação foram negativos, não tendo sido possível identificar qualquer linhagem de EV-D68, mesmo tendo sido incluídos anos em que foram descritos surtos, como são os casos de 2022 e 2024.^{50,66}

Esta ausência de deteção não deve, contudo, ser interpretada como prova de inexistência de casos de EV-D68 na população em estudo, mas sim ser utilizada para compreender as limitações atuais da sua vigilância em Portugal e para reforçar a necessidade de estratégias laboratoriais mais direcionadas. Tal como referido em trabalhos prévios, a identificação deste vírus exige a análise de amostras respiratórias, uma vez que a sua presença em LCR é rara, mesmo em casos de complicações neurológicas.^{23,46} Neste contexto, a utilização de LCR como produto biológico não constitui a amostra laboratorial mais apropriada para a deteção de EV-D68. No entanto, resultados positivos têm sido descritos em LCR^{44,49} e, perante a indisponibilidade de proceder à sequenciação de amostras respiratórias neste estudo, foi o material biológico utilizado. Assim, estes resultados reforçam a necessidade de incluir amostras respiratórias em futuras estratégias de vigilância, de modo a garantir maior sensibilidade na deteção e caracterização do EV-D68.²³

Os resultados obtidos neste estudo devem ser interpretados considerando um conjunto de limitações metodológicas que podem ter condicionado os resultados obtidos.

O armazenamento das amostras é um processo manual dependente do operador, pelo que não se pode excluir a possibilidade de falhas neste processo. O não armazenamento de amostras com resultado positivo na pesquisa de Enterovírus, caso ocorra, pode aumentar a probabilidade de que algumas



amostras potencialmente positivas para EV-D68 não poderem vir a ser utilizadas para sequenciação, constituindo assim uma limitação relevante do presente estudo.

Uma outra limitação do presente estudo relaciona-se com a ausência de pesquisa de Enterovírus em amostras já positivas para outros vírus respiratórios, podendo ter condicionado a identificação de coinfeções. Quando o rastreio inicial identificava agentes etiológicos considerados prováveis de justificar o quadro clínico, a investigação não era prosseguida, reduzindo a possibilidade de detetar Enterovírus em situações de coinfeção viral. Esta abordagem resulta na exclusão de um número relevante de amostras, classificadas como “não processadas por positividade para outros agentes infecciosos”, no período em estudo, correspondem a 510 amostras, o que representa cerca de 5,69% do total analisado. Neste grupo inclui-se vírus como o SARS-CoV-2, Influenza e outros agentes etiológicos.

Contudo, na literatura está descrita a possibilidade de coinfeção entre EV-D68 e outros vírus respiratórios, podendo alcançar cerca de um quarto dos casos positivos, muitas vezes em associação com vírus como Influenza ou Rinovírus.^{23,34} A decisão de não prosseguir com a pesquisa de Enterovírus em amostras já positivas para outros vírus impossibilita a investigação subsequente de EV-D68 caso pudesse ser aplicável, sugerindo também que a sua circulação e a de outros Enterovírus pode ser subestimada quando não se prossegue a investigação após a identificação de outro agente viral. Este procedimento pode introduzir um viés metodológico. Nos casos analisados, não foi possível estabelecer de forma sistemática a presença de coinfeções, mas a existência deste fenómeno deve ser considerada em estudos futuros, sobretudo pela sua relevância clínica.

Para além das amostras excluídas por positividade para outros agentes respiratórios, registaram-se também situações em que não foi possível prosseguir com a pesquisa devido a fatores técnicos, entre os quais se destacou o volume insuficiente de amostras biológicas. As amostras processadas no setor de biologia molecular são muitas vezes de colheita difícil e obtidas através de procedimentos invasivos, como é o caso do LCR, resultando em volumes reduzidos e limitando a quantidade disponível para análises complementares. No presente estudo, várias amostras não puderam ser sequenciadas por apresentarem quantidade insuficiente, restringindo assim a capacidade de caracterização molecular do EV-D68.

Noutros casos, as amostras foram consideradas não apropriadas para a análise, uma vez que o pedido laboratorial não estava em concordância com o tipo de material enviado; sempre que possível, procedeu-se à adaptação do pedido à amostra disponível.

Adicionalmente, a análise molecular por sequenciação apresenta-se como um desafio. Apesar de ser essencial para a caracterização molecular, a sequenciação é um método dispendioso e de difícil



implementação na rotina, limitando o número de amostras que podem ser processadas em contexto de investigação.^{48,52}

Todas estas limitações descritas contribuem para uma redução do número final de amostras disponíveis para caracterização, resultando numa possível limitação à identificação de potenciais casos de EV-D68. Desta forma, este estudo reforça a necessidade de otimizar procedimentos laboratoriais, quer através da uniformização de protocolos de armazenamento e triagem, quer pela incorporação de metodologias que permitam a deteção do EV-D68 mesmo em contextos de coinfeção viral.

A infeção por EV-D68 permanece um desafio em saúde pública, marcada por limitações ao nível do diagnóstico, da terapêutica e da prevenção.^{6,9,23}

Tal como já referido, um dos principais entraves ao diagnóstico prende-se com o facto de a maioria dos testes moleculares não distinguir Enterovírus de Rinovírus, nem permitir a identificação específica do EV-D68.^{34,37} Acresce que, apesar de este vírus estar associado a manifestações neurológicas, a sua deteção em LCR é rara, mesmo em doentes com quadros compatíveis, o que limita a sensibilidade diagnóstica quando este tipo de amostra é utilizado.^{23,28}

A não existência de vacinas ou medicação específica para tratar ou prevenir a infeção por EV-D68 tem impacto a nível clínico, uma vez que resulta num menor interesse em diagnosticar corretamente o agente etiológico causador de algumas patologias, já que o tratamento é geralmente limitado a medidas de suporte.^{16,23,28}

No entanto, diversas abordagens experimentais têm vindo a ser exploradas no campo da terapêutica antiviral dirigida ao EV-D68. A fluoxetina, um antidepressivo da classe dos inibidores seletivos da recaptção da serotonina, tem evidências *in vitro* contra o EV-D68, e boas tolerâncias *in vivo* em doentes com AFM.^{8,27} Também o pleconaril, um complexo que atua sobre a cápside viral, com atividade reportada contra alguns Enterovírus e Rinovírus, foi testado na infeção por EV-D68 com base na sua atuação sobre a VP1; no entanto, não se obtiveram resultados significativos.^{23,27} Apesar de não existirem dados que comprovem a sua utilidade em infeções em humanos, a utilização de imunoglobulinas tem tido efeitos benéficos em prevenir paralisia em ratos, quando administrada logo que é detetada a infeção por EV-D68.^{20,38}

Os antivirais que têm vindo a ser desenvolvidos, atuando em proteínas virais e fatores essenciais na replicação viral, não têm tido resultados a nível neurológico.⁸ Nos casos de AFM, a paralisia manifesta-se habitualmente uma semana ou mais após a infeção por EV-D68, altura em que o vírus já se



disseminou e alcançou o SNC. Nesta fase, terapias antivirais que atuem na fase de replicação viral podem já não apresentar eficácia clínica.⁹

Estas questões refletem a importância do desenvolvimento de uma vacina, tornando-se necessário aprofundar o conhecimento sobre a patogénese deste vírus, uma vez que o desenvolvimento de vacinas eficazes é um processo dependente do conhecimento sobre os mecanismos de infeção do vírus, que no EV-D68 ainda não estão completamente definidos.^{4,6,67}

Nestes contextos, em que não existe terapêutica antiviral específica nem vacina disponível para o EV-D68, a prevenção assume um papel central em saúde pública, constituindo a principal medida para reduzir o risco de disseminação e impacto clínico da infeção.^{6,16,67}

No entanto, e apesar do sucesso da implementação do programa para o controlo da poliomielite, o programa de vigilância para infeções provocadas no EVNP não tem sido devidamente implementado.^{5,35} Este grupo, do qual faz parte o EV-D68, é composto por vírus com elevadas taxas de mutações e recombinação genómica, o que aumenta o risco de novas estirpes emergirem no futuro.^{4,15} A emergência de alguns EVNP, como o EV-D68 e o EV-A71 representa um problema de saúde pública devido à sua capacidade de causarem paralisia semelhante à poliomielite.^{4,29} Para além disso, a identificação laboratorial dos EVNP pode ser útil de forma a contribuir para a redução da utilização de antibioterapia em doentes com infeções respiratórias de etiologia viral.³⁷

Nesta sequência, a verdadeira incidência da infeção por Enterovírus D68 pode estar subestimada.^{8,16} A AFM e a AFP são doenças de declaração obrigatória em todos os países europeus que participam no programa de Erradicação da Poliomielite. No entanto, em casos AFM/AFP provocada por EVNP, as regras variam consoante o país: nalguns são de declaração obrigatória e requerem testes respiratórios, implementados após o surto de EV-D68 em 2014. Noutros, a declaração destas patologias é voluntária. Noutros países, não há regulamentação específica sobre a declaração destas doenças por EVNP.^{34,39}

Em Portugal, a AFP é uma condição de notificação obrigatória, conforme estipulado pela Direção-Geral da Saúde, que integra a AFP na lista de doenças transmissíveis de declaração obrigatória. Este mecanismo de vigilância enquadra-se no Programa Nacional de Erradicação da Poliomielite.⁶⁸ No entanto, nem os EVNP nem os casos de AFM são explicitamente mencionados na legislação nacional como doenças de declaração obrigatória. Apesar disso, como a AFM se manifesta como uma forma de AFP, estes casos devem ser considerados no mesmo enquadramento e, conseqüentemente, notificados ao sistema de vigilância epidemiológica.



6. Conclusão

A ausência de deteção de EV-D68 neste estudo não deve ser interpretada como prova da sua inexistência, mas antes como reflexo das limitações metodológicas e da vigilância laboratorial atualmente implementada. Este resultado reforça a necessidade de desenvolver protocolos específicos e sistemáticos para a pesquisa deste vírus, incluindo em contextos de coinfeção com outros agentes respiratórios, de modo a garantir uma caracterização epidemiológica mais robusta.

A implementação de metodologias mais sensíveis e direcionadas poderá contribuir para uma identificação precoce de casos, permitindo compreender melhor a circulação do EV-D68 em Portugal. Paralelamente, a sensibilização da comunidade clínica para a sua relevância assume particular importância, sobretudo em situações de infeções respiratórias graves ou de quadros neurológicos compatíveis, como a AFM.

O EV-D68 deve, assim, ser considerado um vírus emergente de crescente impacto em saúde pública. A evolução recente da sua circulação e a associação a manifestações neurológicas graves, comparáveis às provocadas pelo poliovírus, constituem uma preocupação relevante. O aumento do número de casos de AFM associados ao EV-D68 descrito a nível internacional sublinha a necessidade de reforçar a vigilância e a investigação sobre este agente.

Por fim, importa destacar a relevância da investigação no campo da imunização. Estudos recentes demonstram que anticorpos neutralizantes contra o poliovírus podem também neutralizar o EV-D68, levantando a possibilidade de explorar a vacina da poliomielite como base para o desenvolvimento de estratégias vacinais adaptadas a este vírus e a outros Enterovírus com potencial para causar doença grave.



Referências Bibliográficas

1. Taylor MW. What is a virus? In: *Viruses and Man: A History of Interactions*. Cham: Springer International Publishing, pp. 23–40.
2. National Human Genome Research Institute. Virus, <https://www.genome.gov/genetics-glossary/Virus> (2014, accessed 4 August 2025).
3. Rojjanadumrongkul K, Kumthip K, Khamrin P, et al. Enterovirus infections in pediatric patients hospitalized with acute gastroenteritis in Chiang Mai, Thailand, 2015–2018. *PeerJ*; 8. Epub ahead of print 2020. DOI: 10.7717/peerj.9645.
4. Jartti M, Flodström-Tullberg M, Hankaniemi MM. Enteroviruses: epidemic potential, challenges and opportunities with vaccines. *Journal of Biomedical Science*; 31. Epub ahead of print 1 December 2024. DOI: 10.1186/s12929-024-01058-x.
5. Harvala H, Broberg E, Benschop K, et al. Recommendations for enterovirus diagnostics and characterisation within and beyond Europe. *Journal of Clinical Virology* 2018; 101: 11–17.
6. Grizer CS, Messacar K, Mattapallil JJ. Enterovirus-D68 – a reemerging non-polio enterovirus that causes severe respiratory and neurological disease in children. *Frontiers in Virology*; 4. Epub ahead of print 2024. DOI: 10.3389/fviro.2024.1328457.
7. Mallet MC, Trottier S, Baz M, et al. Clinical presentation of Enterovirus D68 in adults with acute respiratory infections consulting in emergency departments in Quebec, Canada. *IJID Regions*; 15. Epub ahead of print 1 June 2025. DOI: 10.1016/j.ijregi.2025.100669.
8. Fall A, Kenmoe S, Ebogo-Belobo JT, et al. Global prevalence and case fatality rate of Enterovirus D68 infections, a systematic review and meta-analysis. *PLoS Negl Trop Dis*; 16. Epub ahead of print 1 February 2022. DOI: 10.1371/journal.pntd.0010073.
9. Elrick MJ, Pekosz A, Duggal P. Enterovirus D68 molecular and cellular biology and pathogenesis. *Journal of Biological Chemistry*; 296. Epub ahead of print 1 January 2021. DOI: 10.1016/j.jbc.2021.100317.
10. Health Organization Regional Office for Europe W. *Enterovirus surveillance guidelines: Guidelines for enterovirus surveillance in support of the Polio Eradication Initiative*, <http://www.euro.who.int/pubrequest> (2015).
11. Brouwer L, Moreni G, Wolthers KC, et al. World-wide prevalence and genotype distribution of enteroviruses. *Viruses*; 13. Epub ahead of print 1 March 2021. DOI: 10.3390/v13030434.



12. International Committee on Taxonomy of Viruses. Genus: Enterovirus – Picornaviridae – Picornavirales,
https://web.archive.org/web/20190207014949/https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_online_report/positive-sense-rna-viruses/picornavirales/w/picornaviridae/681/genus-enterovirus (2019, accessed 26 July 2025).
13. Simmonds P, Gorbalenya AE, Harvala H, et al. Recommendations for the nomenclature of enteroviruses and rhinoviruses. *Arch Virol* 2020; 165: 793–797.
14. Larsson SB, Vracar D, Karlsson M, et al. Epidemiology and clinical manifestations of different enterovirus and rhinovirus types show that EV-D68 may still have an impact on severity of respiratory infections. *J Med Virol* 2022; 94: 3829–3839.
15. Xie Z, Khamrin P, Maneekarn N, et al. Epidemiology of enterovirus genotypes in association with human diseases. *Viruses*; 16. Epub ahead of print 1 July 2024. DOI: 10.3390/v16071165.
16. Rojo-Alba S, González-Alba JM, Martínez ZP, et al. Incidence, clinical manifestations and characterization of Enterovirus in the last decade (2014–2023) in Asturias (Spain). Effect of the SARS-CoV-2 pandemic. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. Epub ahead of print 2024. DOI: 10.1007/s10096-024-04970-0.
17. World Population Review. Countries with Polio 2025,
<https://worldpopulationreview.com/country-rankings/countries-with-polio> (2025).
18. Vlok M, Majer A. Global prevalence of non-polio enteroviruses pre- and post COVID-19 pandemic. *Microorganisms* 2025; 13: 1801.
19. Palminha P, Ribeiro C, Roque C, et al. *Vigilância laboratorial da infecção a Enterovirus entre 2010 e 2013*.
20. Naeem A, Bello MB, Bosaeed M. Insights into enterovirus D68 immunology: unraveling the mysteries of host-pathogen interactions. *Immunity, Inflammation and Disease*; 13. Epub ahead of print 1 February 2025. DOI: 10.1002/iid3.70117.
21. Mahmoudabadi G, Phillips R. A comprehensive and quantitative exploration of thousands of viral genomes. *Elife* 2018; 7: e31955.
22. Goodfellow I. The genome-linked protein VPg of vertebrate viruses – A multifaceted protein. *Current Opinion in Virology* 2011; 1: 355–362.
23. Xiang Z, Wang J. Enterovirus D68 and Human Respiratory Infections. *Semin Respir Crit Care Med* 2016; 37: 578–585.



24. Ana Rita da Silva Moreira. *A infeção por Enterovírus: Epidemiologia e diagnóstico molecular*. Porto, 2021.
25. GeneTex Inc. Enterovirus D68 | GeneTex, https://www.genetex.com/Research/Overview/infectious_diseases/enterovirus_d68 (2022, accessed 26 July 2025).
26. Shen L, Gong C, Xiang Z, et al. Upsurge of enterovirus D68 and circulation of the new subclade D3 and subclade B3 in Beijing, China, 2016. *Sci Rep*; 9. Epub ahead of print 1 December 2019. DOI: 10.1038/s41598-019-42651-7.
27. Hooi YT, Balasubramaniam VRMT. In vitro and in vivo models for the study of EV-D68 infection. *Pathology* 2023; 55: 907–916.
28. Sooksawasdi Na Ayudhya S, Laksono BM, van Riel D. The pathogenesis and virulence of enterovirus-D68 infection. *Virulence* 2021; 12: 2060–2072.
29. Anjum R, Haque MA, Akter R, et al. Beyond polio: exploring non-polio enteroviruses, global health preparedness, and the “Disease X” paradigm. *Health Sci Rep*; 7. Epub ahead of print 1 June 2024. DOI: 10.1002/hsr2.2147.
30. Jorgensen D, Grassly NC, Pons-Salort M. Global age-stratified seroprevalence of enterovirus D68: a systematic literature review. *The Lancet Microbe*; 6. Epub ahead of print 1 January 2025. DOI: 10.1016/j.lanmic.2024.07.001.
31. Simoes MP, Hodcroft EB, Simmonds P, et al. Epidemiological and clinical insights into the enterovirus D68 upsurge in Europe 2021–2022 and emergence of novel B3-derived lineages, ENPEN multicentre study. *J Infect Dis*. Epub ahead of print 28 March 2024. DOI: 10.1093/infdis/jiae154.
32. Hirvonen A, Johannesen CK, Simmonds P, et al. Sustained circulation of enterovirus D68 in Europe in 2023 and the continued evolution of enterovirus D68 B3-lineages associated with distinct amino acid substitutions in VP1 protein. *Journal of Clinical Virology*; 178. Epub ahead of print 1 June 2025. DOI: 10.1016/j.jcv.2025.105785.
33. Benschop KSM, Albert J, Anton A, et al. Re-emergence of enterovirus d68 in europe after easing the covid-19 lockdown, september 2021. *Eurosurveillance*; 26. Epub ahead of print 1 November 2021. DOI: 10.2807/1560-7917.ES.2021.26.45.2100998.
34. Knoester M, Helfferich J, Poelman R, et al. Twenty-nine cases of enterovirus-D68-associated acute flaccid myelitis in europe 2016 a case series and epidemiologic overview. *Pediatric Infectious Disease Journal* 2019; 38: 16–21.



35. de Schrijver S, Vanhulle E, Ingenbleek A, et al. Epidemiological and clinical insights into enterovirus circulation in Europe, 2018–2023: A multicenter retrospective surveillance study. *J Infect Dis* 2025; 232: e104–e115.
36. Jain S, Thakur N, Grover N, et al. Prevalence of rotavirus, norovirus and enterovirus in diarrheal diseases in Himachal Pradesh, India. *Virusdisease* 2016; 27: 77–83.
37. Itani T, Chalapa V, Semenov A, et al. Laboratory diagnosis of nonpolio enteroviruses: A review of the current literature. *Biosafety and Health* 2023; 5: 112–119.
38. Enterovirus Foundation. Diagnose & Treat, <https://www.enterovirusfoundation.org/treatments-1> (2018).
39. Dyda A, Stelzer-Braid S, Adam D, et al. The association between acute flaccid myelitis (AFM) and enterovirus D68 (EV-D68) – what is the evidence for causation? *Eurosurveillance*; 23. Epub ahead of print 18 January 2018. DOI: 10.2807/1560-7917.ES.2018.23.3.17-00310.
40. Hayes A, Nguyen D, Andersson M, et al. A European multicentre evaluation of detection and typing methods for human enteroviruses and parechoviruses using RNA transcripts. *J Med Virol* 2020; 92: 1065–1074.
41. Centers for disease control and prevention. About Acute Flaccid Myelitis | Acute Flaccid Myelitis (AFM), <https://www.cdc.gov/acute-flaccid-myelitis/about/index.html> (2025).
42. Enterovirus Foundation. Enterovirus Infection - The symptoms & signs, <https://www.enterovirusfoundation.org/the-symptoms> (2018, accessed 25 March 2025).
43. Centers for disease control and prevention. Signs and Symptoms of Acute Flaccid Myelitis | Acute Flaccid Myelitis (AFM), <https://www.cdc.gov/acute-flaccid-myelitis/signs-symptoms/index.html> (2024).
44. Blackburn J, Le Saux N. Acute flaccid myelitis associated with enterovirus D68: an emerging infectious disease. *Journal of the Association of Medical Microbiology and Infectious Disease Canada* 2019; 4: 131–135.
45. Fang X, Huda R. Acute flaccid myelitis: Current status and diagnostic challenges. *Journal of Clinical Neurology (Korea)* 2020; 16: 376–382.
46. Vogt MR, Wright PF, Hickey WF, et al. Enterovirus D68 in the anterior horn cells of a child with acute flaccid myelitis. *New England Journal of Medicine* 2022; 386: 2059–2060.
47. Centers for disease control and prevention. Clinical Overview of AFM | Acute Flaccid Myelitis (AFM), <https://www.cdc.gov/acute-flaccid-myelitis/hcp/clinical-overview/index.html> (2024).



48. Fall A, Abdullah O, Han L, et al. Enterovirus D68: genomic and clinical comparison of 2 seasons of increased viral circulation and discrepant incidence of acute flaccid myelitis–Maryland, USA. *Open Forum Infect Dis*; 11. Epub ahead of print 1 November 2024. DOI: 10.1093/ofid/ofae656.
49. Lizak N, Butel-Simoes G, Steinig E, et al. A case of enterovirus D68–associated acute flaccid myelitis in an immunocompromised adult, Australia. *ASM Case Reports*. Epub ahead of print 21 August 2025. DOI: 10.1128/asmcr.00074–25.
50. Fall A, Norton JM, Abdullah O, et al. Enhanced genomic surveillance of enteroviruses reveals a surge in enterovirus D68 cases, the Johns Hopkins health system, Maryland, 2024. *J Clin Microbiol*.
51. Leser JS, Frost JL, Wilson CJ, et al. VP1 is the primary determinant of neuropathogenesis in a mouse model of enterovirus D68 acute flaccid myelitis. *J Virol*; 98. Epub ahead of print 23 July 2024. DOI: 10.1128/jvi.00397–24.
52. Joffret ML, Polston PM, Razafindratsimandresy R, et al. Whole genome sequencing of enteroviruses species A to D by high-throughput sequencing: application for viral mixtures. *Front Microbiol*; 9. Epub ahead of print 29 March 2018. DOI: 10.3389/fmicb.2018.02339.
53. European Centre for Disease Prevention and Control. Factsheet for health professionals on human non-polio enterovirus infections, <https://www.ecdc.europa.eu/en/enteroviruses/facts#epidemiology> (2025, accessed 21 July 2025).
54. Oberste MS, Maher K, Flemister MR, et al. *Comparison of classic and molecular approaches for the identification of untypeable enteroviruses* †, <https://journals.asm.org/journal/jcm> (2000).
55. QIAamp Fast DNA Stool Mini Kit, <https://www.qiagen.com/us/products/discovery-and-translational-research/dna-rna-purification/dna-purification/genomic-dna/qiaamp-fast-dna-stool-mini-kit> (accessed 28 August 2025).
56. Hong JY, Kang B, Kim A, et al. Enhanced detection of enteroviruses in clinical samples by reverse transcription–PCR using complementary locked primer technology. *J Clin Microbiol* 2010; 48: 615–616.
57. Volle R, Joffret ML, Ndiaye K, et al. Development of a new internally controlled one–step real–time RT–PCR for the molecular detection of enterovirus A71 in Africa and Madagascar. *Front Microbiol*; 11. Epub ahead of print 14 August 2020. DOI: 10.3389/fmicb.2020.01907.
58. Ikuse T, Aizawa Y, Takihara H, et al. Development of novel PCR assays for improved detection of enterovirus D68. *J Clin Microbiol*; 59. Epub ahead of print 1 November 2021. DOI: 10.1128/JCM.01151–21.



59. Moreno G, O'connor D. Sequence-independent, single-primer amplification of RNA viruses v2. Epub ahead of print 2 February 2020. DOI: 10.17504/protocols.io.bb3miqk6.
60. De Coster W, Rademakers R. NanoPack2: population-scale evaluation of long-read sequencing data. *Bioinformatics*; 39. Epub ahead of print 1 May 2023. DOI: 10.1093/bioinformatics/btad311.
61. Wood DE, Lu J, Langmead B. Improved metagenomic analysis with Kraken 2. *Genome Biol*; 20. Epub ahead of print 28 November 2019. DOI: 10.1186/s13059-019-1891-0.
62. Langmead B. Index Zone, <https://benlangmead.github.io/aws-indexes/k2?> (2025, accessed 19 September 2025).
63. Eales O, Plank MJ, Cowling BJ, et al. Key challenges for respiratory virus surveillance while transitioning out of acute phase of COVID-19 pandemic. 2024; 30: 1.
64. Schüz ML, Dallmeyer L, Fragkou PC, et al. Global prevalence of respiratory virus infections in adults and adolescents during the COVID-19 pandemic: a systematic review and meta-analysis. *International Journal of Infectious Diseases* 2023; 137: 16–24.
65. Uršič T, Jevšnik Virant M, Kogoj R, et al. Enterovirus D68 circulation between 2014 and 2022 in slovenian children. *Frontiers in Virology*; 4. Epub ahead of print 2024. DOI: 10.3389/fviro.2024.1335752.
66. Grunnill M, Eshaghi A, Damodaran L, et al. Inferring enterovirus D68 transmission dynamics from the genomic data of two 2022 North American outbreaks. *npj Viruses*; 2. Epub ahead of print 2 August 2024. DOI: 10.1038/s44298-024-00047-z.
67. Sun J, Hu XY, Yu XF. Current understanding of human enterovirus D68. *Viruses*; 11. Epub ahead of print 1 June 2019. DOI: 10.3390/v11060490.
68. Direção-Geral da Saúde. Despacho n.º 1150/2021 | DR. 2021; 137–190.

P.PORTO

ESCOLA
SUPERIOR
DE SAÚDE



M

MESTRADO

ANÁLISES CLÍNICAS E SAÚDE PÚBLICA – IMUNOTERAPIA E
TRANSPLANTAÇÃO