

UNIVERSIDADE FEDERAL DOS VALES DO JEQUITINHONHA E MUCURI

Programa de Pós-Graduação Em Ciências Farmacêuticas

Thyago José Silva

**INFECÇÕES VIRAIS NO SISTEMA NERVOSO CENTRAL EM PACIENTES SUBMETIDOS
À INTERNAÇÃO HOSPITALAR: INVESTIGAÇÃO BASEADA EM UMA PLATAFORMA
DE “MINI-ARRANJO” DE PCR EM TEMPO REAL *SINGLEPLEX***

Diamantina

2021

Thyago José Silva

**INFECÇÕES VIRAIS NO SISTEMA NERVOSO CENTRAL EM PACIENTES SUBMETIDOS
À INTERNAÇÃO HOSPITALAR: INVESTIGAÇÃO BASEADA EM UMA PLATAFORMA
DE “MINI-ARRANJO” DE PCR EM TEMPO REAL *SINGLEPLEX***

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, como requisito para obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Ronaldo Luis Thomasini
Coorientador: Prof. Dr. Gustavo Eustáquio Brito
Alvim de Melo

Diamantina

2021

Catálogo na fonte - Sisbi/UFVJM

S586i Silva, Thyago José
2021 Infecções virais no sistema nervoso central em pacientes submetidos à internação hospitalar: investigação baseada em uma plataforma de "mini-arranjo" de PCR em tempo real singleplex [manuscrito] / Thyago José Silva. -- Diamantina, 2021.
100 p. : il.

Orientadora: Prof.ª Ronaldo Luis Thomasini.
Coorientador: Prof. Gustavo Eustáquio Brito Alvim de Melo.

Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) -- Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Diamantina, 2021.

1. Virus. 2. Sistema Nervoso Central. 3. Mini-arranjo. 4. Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real. I. Thomasini, Ronaldo Luis. II. Melo, Gustavo Eustáquio Brito Alvim de. III. Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri. IV. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFVJM com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).
Bibliotecário Rodrigo Martins Cruz / CRB6-2886
Técnico em T.I. Thales Francisco Mota Carvalho



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DOS VALES DO JEQUITINHONHA E MUCURI

THYAGO JOSÉ SILVA

INFECÇÕES VIRAIS NO SISTEMA NERVOSO CENTRAL EM PACIENTES SUBMETIDOS À INTERNAÇÃO
HOSPITALAR: INVESTIGAÇÃO BASEADA EM UMA PLATAFORMA DE "MINI-ARRANJO" DE PCR EM
TEMPO REAL SINGLEPLEX

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação Em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, nível de Mestrado, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Ronaldo Luis Thomasini

Data de aprovação 08/09/2021.

Sandra Costa
Profa. Dra. Sandra Cecília Botelho Costa - (UNICAMP)

Helen Rodrigues Martins
Profa. Dra. Helen Rodrigues Martins - (UFVJM)

Ronaldo Luis Thomasini
Prof. Dr. Ronaldo Luis Thomasini - (UFVJM)

“À minha família, meu maior presente”

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus em primeiro lugar. A Ele, toda honra e toda glória! Obrigado, Senhor, por me sustentar durante toda essa jornada.

À minha companheira de vida, meu grande amor Valéria, por tudo que faz por mim e por nossa família. Te amo!

Aos meus amores Arthur, Gustavo e o meu pequeno Lucas. Vocês são os motivos do papai ir sempre à luta!

À minha querida mãe Mirian, que desde sempre renunciou a várias coisas pela educação dos seus filhos.

À minha irmã Pollyana, pelo seu companheirismo e porque, mesmo de longe, sei que posso contar sempre com você!

Ao meu orientador Ronaldo, pelos ensinamentos transmitidos e toda sua colaboração. Agradeço imensamente a oportunidade.

Ao meu coorientador Gustavo. Você faz parte da nossa história de vida! Minha família sempre será grata por tudo que você fez por nós!

Aos professores Danilo Bretas e Etel Vieira, pessoas com as quais aprendi muitas coisas nesses últimos anos de convivência. Meus sinceros agradecimentos a vocês dois.

Aos colegas da FAMED pelos ótimos momentos compartilhados e fazerem do nosso local de trabalho um ambiente agradabilíssimo.

Aos amigos do Ladip, Bioex e Labimuno: Vinícius, Marcelo, Karine e Bruna, pessoas especiais, sempre dispostas a ajudar.

Às contemporâneas de mestrado: Tatiele, Bianca, Arteniária, Dalila, Sanny, Edivânia, Juliane e Cleyde. Muitas angústias, incertezas e felicidades compartilhadas também.

Às alunas Mônica e Nathany, que nos ajudaram nesse projeto.

A todos do LEAC, lugar que abençoou muitas vidas nesse período de pandemia. Está sendo muito bom trabalhar com vocês.

Aos pacientes e seus familiares que, mesmo em um momento delicado de enfermidade, consentiram a coleta de amostra para o nosso estudo.

À equipe da neurocirurgia da Santa Casa de Caridade de Diamantina, por toda a colaboração.

“A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu, mas pensar o que ninguém ainda nunca pensou sobre aquilo que todo mundo vê”

Arthur Schopenhauer

RESUMO

As infecções no Sistema Nervoso Central (SNC) apresentam distribuição global e são importantes causas de morbidade e mortalidade. Estas infecções podem ser causadas principalmente por bactérias, fungos e vírus, sendo as infecções virais as mais frequentes. As etiologias das infecções virais no SNC mais frequentes são os enterovírus, herpesvirus, adenovírus e os arbovírus. No Brasil, entretanto, na maioria dos casos, o agente causador não é identificado. Métodos baseados em biologia molecular estão sendo cada vez mais aplicados no diagnóstico de doenças infecciosas. Assim, este estudo visou a aplicação de uma plataforma de “mini-arranjo” de Reação em Cadeia da Polimerase em tempo real (qPCR) para a identificação de agentes virais causadores de infecções no SNC. Para tal, amostras de líquido de pacientes com suspeita de infecção viral internados no hospital Santa Casa de Caridade de Diamantina/MG no período de janeiro de 2019 a julho de 2021 foram coletadas e analisadas pela plataforma. Foram testadas 73 amostras, sendo que em 39 foram identificados material genético de vírus. Houve maior número de casos de Zika vírus (ZIKV) 27/73 (36,99%), seguido por Citomegalovírus (CMV) 5/73 (6,85%), Epstein-Barr vírus (EBV) 4/73 (5,48%), Herpesvirus Humano-6 (HHV-6) 4/73 (5,48%), Adenovírus (ADV) 4/73 (5,48%) e Enterovírus (ENTV) 4/73 (5,48%), Herpesvirus Humano-7 (HHV-7) 3/73 (4,11%), Herpes simples vírus 1/2 (HSV-1/2) e John Cunningham vírus (JCV) 2/73 (2,74%). O Varicela-Zóster vírus (VZV), o Dengue vírus (DENV), o Chikungunya vírus (CHIKV) e também o Coronavírus da Síndrome Respiratória Aguda Grave 2 (SARS-CoV-2) não foram detectados em nenhuma das amostras analisadas. Foram detectados 9 casos de coinfeção entre o ZIKV, ADV, ENTV e os vírus da família *Herpesviridae* e 4 casos de coinfeção entre vírus e outros patógenos não virais. Nossos achados evidenciam a circulação de Zika vírus durante o período de coleta das amostras, além de reforçar a importância de se considerar este agente como causador de infecções no sistema nervoso central. A plataforma desenvolvida mostrou que pode ser útil para o diagnóstico de infecções virais no SNC e de utilidade para aplicação na rotina clínica laboratorial. Os resultados de testes moleculares precisam ser interpretados com cautela, especialmente, os que apresentam baixa carga viral. Sugere-se que determinação de carga viral com valores de corte definidos possam ser mais elucidativos que testes qualitativos.

Palavras chave: Vírus. Sistema Nervoso Central. Mini-arranjo. Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real.

ABSTRACT

Central Nervous System (CNS) infections are globally distributed and they are important causes of morbidity and mortality. These infections can be caused mainly by bacteria, fungi, or viruses, which the viral infections are the most frequent. The most frequent etiologic agents of viral infections in the CNS are enteroviruses, herpesviruses, adenoviruses, and arboviruses. In Brazil, however, in most cases, the causative agent is not identified. Methods based on molecular biology are turning most usual in the diagnosis of infectious diseases. Thus, this study aimed to apply a real-time Polymerase Chain Reaction (qPCR) platform based on a “mini-array” conformation for the identification of viral agents that cause CNS infections. For this purpose, CSF samples from patients with suspected viral infection hospitalized at the Santa Casa de Caridade Hospital in Diamantina/MG from January 2019 to July 2021 were collected and analyzed by the platform mentioned above. A total of 73 samples were tested, and in 39 samples, viral DNA\RNA was identified. Zika virus (ZIKV) was most frequently detected (27/73) (36.99%), followed by Cytomegalovirus (CMV) 5/73 (6.85%), Epstein-Barr virus (EBV) 4/73 (5, 48%), Human Herpesvirus-6 (HHV-6) 4/73 (5.48%), Adenovirus (ADV) 4/73 (5.48%) and Enterovirus (ENTV) 4/73 (5.48%), Human Herpesvirus-7 (HHV-7) 3/73 (4.11%), Herpes simplex virus 1/2 (HSV-1/2) and John Cunningham virus (JCV) 2/73 (2.74%). Varicella-Zoster virus (VZV), Dengue virus (DENV), Chikungunya virus (CHIKV), and also Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2) were not detected in any of the analyzed samples. Nine cases of coinfection between ZIKV, ADV, ENTV, and *Herpesviridae* family viruses and 4 cases of coinfection between virus and other non-viral pathogens were found. Our findings showed the circulation of Zika virus during the sample collection period and it remarks the importance to consider this agent as a cause of infections in the central nervous system. The platform developed showed that it can be useful for the diagnosis of viral infections in the CNS and useful for application in clinical laboratory routines. The results of molecular tests must be carefully interpreted, especially those with a low viral load. It is suggested that viral load measurement using defined cutoff values can be more informative than qualitative tests.

Keywords: Viruses. Central Nervous System. Mini-array. Real-Time polymerase chain reaction.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Distribuição mundial dos principais agentes causadores de encefalites e meningites.....	19
Figura 2 – Rotas de entrada de vírus no SNC.....	21
Figura 3 – Representação esquemática da partícula viral dos piconavírus e das proteínas que compõem o seu capsídeo.....	22
Figura 4 – Representação esquemática da partícula viral dos adenovírus	28
Figura 5 – Ilustração da estrutura dos Coronavírus.....	32
Figura 6 – Representação da Macrorregião de saúde Jequitinhonha / MG.....	36
Figura 7 – Representação do plasmídeo TOPO 2.1 [©]	46
Figura 8 – Representação do plasmídeo BLUNT II TOPO [©]	46
Figura 9 – Representação do plasmídeo PGEM-T Easy [©]	47
Figura 10 – Distribuição de misturas de reação em formato de “miniarranjo” em placas de PCR de 96 e 48 poços “low profile”.....	49
Figura 11 – Distribuição de pacientes do estudo por município de residência	53
Figura 12 – Coinfecções virais nas amostras de líquido	59
Figura 13 – Distribuição das amostras positivas para ADV, ENTV e ZIKV ao longo do tempo	62
Figura 14 – Gráficos de amplificação e curva de dissociação das reações de qPCR para ZIKV (A) e DENV (B).....	64
Figura 15 – Eletroforese em gel de agarose	65
Figura 16 – Distribuição dos pacientes com amostra de líquido positiva para ZIKV por município de residência.....	66
Figura 17 – Distribuição ao longo do tempo do número casos confirmados de ZIKV no Estado de Minas Gerais e do número de amostras positivas para ZIKV neste estudo.....	67

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Vírus do grupo herpes que infectam humanos	24
Tabela 2 – Detalhamento dos primers utilizados para as reações de qPCR	43
Tabela 3 – Matriz de titulação dos primers	45
Tabela 4 – Detalhamentos dos controles positivos utilizados para as reações de qPCR.....	48
Tabela 5 – Preparação do mix para qPCR para pesquisa de SARS-CoV-2	51
Tabela 6 – Características gerais das amostras de LCR positivas para vírus pela plataforma de qPCR e dados clínicos dos pacientes.....	55
Tabela 7 – Frequência de detecção de vírus nas amostras de LCR testadas pela plataforma de qPCR.....	58
Tabela 8 – Distribuição de casos de coinfeção entre vírus e patógenos não virais	59
Tabela 9 – Parâmetros bioquímicos e citológicos das amostras com resultado positivo para vírus	60
Tabela 10 – Valores das cargas virais do adenovírus e dos herpesvírus nas amostras de líquor.....	61
Tabela 11 – Influência da infecção por ADV, ENTV ou ZIKV na detecção de DNA viral de vírus da família Herpesviridae	63

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

%	Porcento
ADV	Adenovírus
AIDS	Síndrome da Imunodeficiência Humana Adquirida
BDV	Vírus da diarreia bovina
BHE	Barreira Hematoencefálica
BHV	Herpesvírus bovino
BKV	Vírus BK
BMVECs	Células endoteliais microvasculares cerebrais
CDC	Centers for Disease Control and Prevention
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementar
CHIKV	Chikungunya vírus
CMV	Citomegalovírus
COVID-19	Coronavírus disease-19
CT	Cycle Thershold
CTI	Centro de terapia intensiva
CV	Coxsackievírus
DENV	Dengue vírus
dL	Decilitro
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EBV	Epstein-Barr vírus
ECA-2	Enzima conversora de angiotensina 2
ENTV	Enterovírus
EV71	Enterovírus 71
GBS	Síndrome de Guillain-Barré
HeV	Hendra vírus
HHV-1	Herpesvírus humano 1
HHV-2	Herpesvírus humano 2
HHV-3	Herpesvírus humano 3
HHV-4	Herpesvírus humano 4
HHV-5	Herpesvírus humano 5
HHV-6	Herpesvírus humano 6
HHV-7	Herpesvírus humano 7
HHV-8	Herpesvírus humano 8

HIV	Vírus da imunodeficiência humana
HSV-1	Herpesvírus Simples vírus 1
HSV-2	Herpesvírus Simples vírus 2
HTLV	Vírus linfotrópico de células T humana
ICTV	Comitê internacional de taxonomia de vírus
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
InfA	Influenza vírus A
JCV	John Cunningham vírus
JEV	Vírus da Encefalite Japonesa
JNM	Junções Neuromusculares
KM2	Quilometro quadrado
KSHV	Herpes associado ao Sarcoma de Kaposi
LACV	Vírus La Crosse
LCR	Líquido cefalorraquidiano
LEMP	Leucoencefalopatia multifocal progressiva
MAV-1	Adenovírus de rato 1
Mg	Miligrama
MG	Minas Gerais
min	Minutos
mL	Mililitro
MVE	Vírus da Encefalite de Murray Valley
NEPii	Núcleo de Estudos de Patologias Inflamatórias e Infecciosas
nM	nanomolar
nm	Nanômetros
°C	graus Celsius
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PML	Leucoencefalopatia multifocal progressiva
PRV	Vírus da Pseudorraiva
PV	Poliovírus
RABV	Rabdovírus
RNA	Ácido ribonucleico
RPM	Rotações por minuto
s	Segundos
<i>SARS-CoV-2</i>	Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavírus 2

SES	Secretaria Estadual de Saúde
SINAN	Sistema de Informação de Agravos de Notificação
	Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional
SISGEN	Associado
SIV	Vírus da imunodeficiência símia
SLEV	Vírus da Encefalite de Saint Louis
SNC	Sistema Nervoso Central
SNP	Sistema Nervoso Periférico
TCLE	Termo de consentimento livre esclarecido
UFVJM	Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri
uL	Micro litro
uM	Micromolar
VCA	Antígeno do capsídeo viral
VP	Proteína Viral
VSV	Vírus da estomatite vesicular
VZV	Vacicela-Zoster vírus
WNV	West-Nile Vírus
ZIKV	Zika vírus

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	16
2 REVISÃO DE LITERATURA	18
2.1 Infecções virais no Sistema Nervoso Central	18
2.2 Agentes virais neurotrópicos	19
2.2.1 <i>Enterovírus</i>	22
2.2.2 <i>Herpesvírus</i>	24
2.2.3 <i>Adenovírus</i>	28
2.2.4 <i>John Cunningham vírus</i>	29
2.2.5 <i>Arbovírus</i>	29
2.2.6 <i>Dengue vírus</i>	30
2.2.7 <i>Zika vírus</i>	30
2.2.8 <i>Chikungunya vírus</i>	31
2.2.9 <i>Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2</i>	32
2.3 Diagnóstico laboratorial das infecções no sistema nervoso central.....	33
2.4 Caracterização da macrorregião de saúde Jequitinhonha de Minas Gerais	35
3 OBJETIVOS.....	37
3.1 Objetivo geral	37
3.2 Objetivos específicos	37
4 JUSTIFICATIVA	38
5 METODOLOGIA.....	39
5.1 Desenho do estudo	39
5.1.2 <i>Critérios de inclusão</i>	39
5.1.3 <i>Critérios de exclusão</i>	39
5.2 Aspectos éticos	39
5.3 Análise de parâmetros do líquido	40

5.3.1 Características físicas.....	40
5.3.2 Dosagem de proteínas.....	40
5.3.3 Parâmetros citológicos.....	40
5.3.4 Análises microbiológicas.....	41
5.4 Extração dos ácidos nucleicos.....	41
5.4.1 Síntese de cDNA.....	42
5.4.2 Primers utilizados nas reações de qPCR.....	42
5.4.3 Controles positivos utilizados nas reações de qPCR.....	45
5.4.4 Reação de qPCR em formato de “mini-arranjo”.....	48
5.5 PCR convencional e eletroforese em gel de agarose.....	50
5.6 Pesquisa de SARS-CoV-2.....	51
5.7 Análise estatística.....	52
6 RESULTADOS.....	53
6.1 Caracterização da população estudada.....	53
6.2 Detecção molecular de agentes etiológicos no LCR.....	54
6.3 Parâmetros bioquímicos e citológicos das amostras positivas para vírus.....	60
6.4 Cargas virais dos herpesvirus e adenovírus.....	61
6.5 Avaliação da incidência sazonal de ADV, ENTV, DENV, ZIKV e CHIKV.....	62
6.6 Análise em PCR convencional para as amostras positivas para ZIKV.....	63
6.7 Caracterização dos pacientes com amostras positivas para ZIKV.....	65
6.8 Comparação entre o número de amostras positivas para ZIKV e o número de notificações confirmadas da doença no Estado de Minas Gerais, ao longo do tempo.....	66
7 DISCUSSÃO.....	68
8 CONCLUSÃO.....	74
9 PERSPECTIVAS.....	75
REFERÊNCIAS.....	76

ANEXO A – PARECER CONSUBISTANCIADO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA.....	86
ANEXO B – TERMOS DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO	91
ANEXO C – CADASTRO NO SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL ASSOCIADO.....	97
ANEXO D – CURVAS DE AMPLIFICAÇÃO DOS CONTROLES POSITIVOS.....	99

1 INTRODUÇÃO

As infecções do Sistema Nervoso Central (SNC) afetam anualmente milhões de indivíduos em todo o mundo, sendo responsáveis por alta morbidade e mortalidade. Estas infecções podem ser causadas principalmente por vírus, bactérias e fungos, sendo que as virais são as mais frequentes (SOARES *et al.*, 2011). A incidência global das infecções virais varia de 20-30/100.000 habitantes por ano e são praticamente o triplo das infecções bacterianas (DAHM *et al.*, 2016).

As infecções virais no SNC geralmente são de evolução benignas. Contudo, infecções por herpes e por alguns tipos de enterovírus podem levar a sequelas à longo prazo como transtorno da fala, memória, aprendizagem, epilepsia, paralisia cerebral, desordens de movimentação e retardo mental (ESPINOZA *et al.*, 2011; RICE, 2017).

As etiologias virais mais comuns para as infecções no Sistema Nervoso Central (SNC) incluem enterovírus, herpes, adenovírus e arbovírus. No entanto, o vírus causador pode não ser identificado na maioria dos casos, sendo categorizados empiricamente como “infecção viral”, principalmente em serviços de saúde onde os recursos laboratoriais são limitados e não há uma vigilância epidemiológica ativa. Estima-se que 39% das infecções causadas por estes vírus causem sintomas neurológicos (SOARES *et al.*, 2011). No caso das infecções bacterianas, a menos que o paciente tenha recebido antibióticos orais previamente, o agente etiológico é mais facilmente identificado. As infecções fúngicas são menos comuns e ocorrem, principalmente, em indivíduos imunocomprometidos (KONEMAN *et al.*, 2001).

A frequência dos tipos de vírus causadores de doenças no SNC pode variar de região para região no mundo (STAHL *et al.*, 2011, RICE, 2017). Os enterovírus, geralmente, são os mais comuns seguidos pelos Herpesvírus Simples vírus (HSV) 1 e 2. Outras causas de infecções virais no SNC incluem o Epstein-Barr vírus (EBV), Varicela-Zoster vírus (VZV), Citomegalovírus (CMV), Herpesvírus Humano 6 (HHV-6), Herpesvírus Humano 7 (HHV-7) e os vírus associados à transmissão por artrópodes como os Vírus da Encefalite Japonesa (JEV), West-Nile Vírus (WNV), Vírus da Encefalite de Saint-Louis (SLEV), Vírus da Encefalite de Murray Valley (MVE), Dengue vírus (DENV) e, mais recentemente, Zika vírus (ZIKV) e Chikungunya vírus (CHIKV) (BOUCHER *et al.*, 2017).

Existem poucos estudos avaliando a prevalência de infecções virais no SNC no Brasil, mas de forma similar a outros países, os enterovírus são os mais frequentemente

detectados (83%) seguidos por vírus do grupo herpes, principalmente, HSV, EBV e HHV-6 (VIDAL *et al.*, 2011, FERREIRA *et al.*, 2019).

Métodos baseados em biologia molecular estão sendo cada vez mais aplicados no diagnóstico de doenças infecciosas. A Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) explora o mecanismo natural de replicação do DNA e resulta em uma produção *in vitro* de grandes quantidades de uma sequência de DNA específica a partir de uma mistura complexa de sequências heterogêneas. A PCR pode amplificar uma região selecionada de uma sequência produzindo bilhões de cópias, possibilitando sua detecção (LUTFALLA; UZE, 2006).

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Infecções virais no Sistema Nervoso Central

As infecções do SNC podem ser classificadas de acordo com o local acometido em meningites, encefalites, mielites ou meningoencefalites. A meningite é uma inflamação do tecido que recobre o encéfalo e a medula espinhal (meninges). A encefalite é uma condição inflamatória do parênquima cerebral. Já a mielite ocorre quando a medula espinhal sofre o processo infeccioso. Comumente, mais de um sítio pode ser envolvido na infecção e o termo meningoencefalite é empregado (SEJVAR, 2014; DAHM *et al.*, 2016). A gravidade da infecção no SNC depende de uma série de fatores como a condição imune do hospedeiro e o grau de virulência do vírus infectante. Assim, indivíduos imunossuprimidos e crianças tendem a ter piores prognósticos (TYLER, 2009).

As meningites virais, também denominadas meningites assépticas, são menos graves que as meningites bacterianas e a recuperação do indivíduo geralmente ocorre entre 7 a 10 dias, sem necessidade de intervenção médica. Os sintomas mais comuns em crianças são: febre, rigidez nuchal, irritabilidade, dificuldades para se alimentar, letargia e dificuldades para dormir. Em adultos, além dos mesmos das crianças, os sintomas incluem dor de cabeça, vômitos, fotossensibilidade e falta de apetite (SEJVAR, 2014). Os sinais e sintomas das encefalites virais aguda são febre, alteração do nível de consciência, dor de cabeça, déficits neurológicos focais e convulsão (SILVA, 2013).

As encefalites e meningites têm distribuição global e sua epidemiologia varia de acordo com fatores demográficos e ambientais tais como a densidade populacional, infraestrutura dos serviços de saúde, saneamento básico disponível, clima, umidade, além dos fatores relacionados aos agentes causadores como o grau de virulência e a prevalência. Embora os vírus sejam a principal causa das infecções no SNC no mundo, a sua real incidência é desconhecida. Alguns países investigaram a etiologia viral causadoras de acometimento do SNC (BOUCHER *et al.*, 2017) (FIG. 1).

Existem poucos estudos relacionados à prevalência e incidência das infecções virais no SNC no Brasil. Dois estudos (MENDOZA *et al.*, 2007; FERREIRA *et al.*, 2019) mostraram que os herpesvírus (HSV, CMV, EBV, VZV, HHV-6) foram os principais agentes envolvidos, seguidos pelos enterovírus. Outro estudo (SANTOS, 2009) apontou os enterovírus como os principais causadores de infecções no SNC, seguidos pelos herpesvírus.

Figura 1 – Distribuição mundial dos principais agentes causadores de encefalites e meningites



EV: Enterovírus; HSV: Herpesvírus Simples; VZV: Varicela Zoster vírus; WNV: West Nile vírus; BKV: vírus BK. Fonte: Adaptado de Boucher *et al.*, 2017.

Há estudos indicando que os flavivírus estão se tornando potenciais agentes etiológicos das encefalites virais agudas em regiões endêmicas e/ou durante epidemias, caso que se aplica ao Brasil, que vive constantes epidemias de Dengue e, mais recentemente, Zika e Chikungunya (ARAÚJO *et al.*, 2012; SOARES *et al.*, 2011).

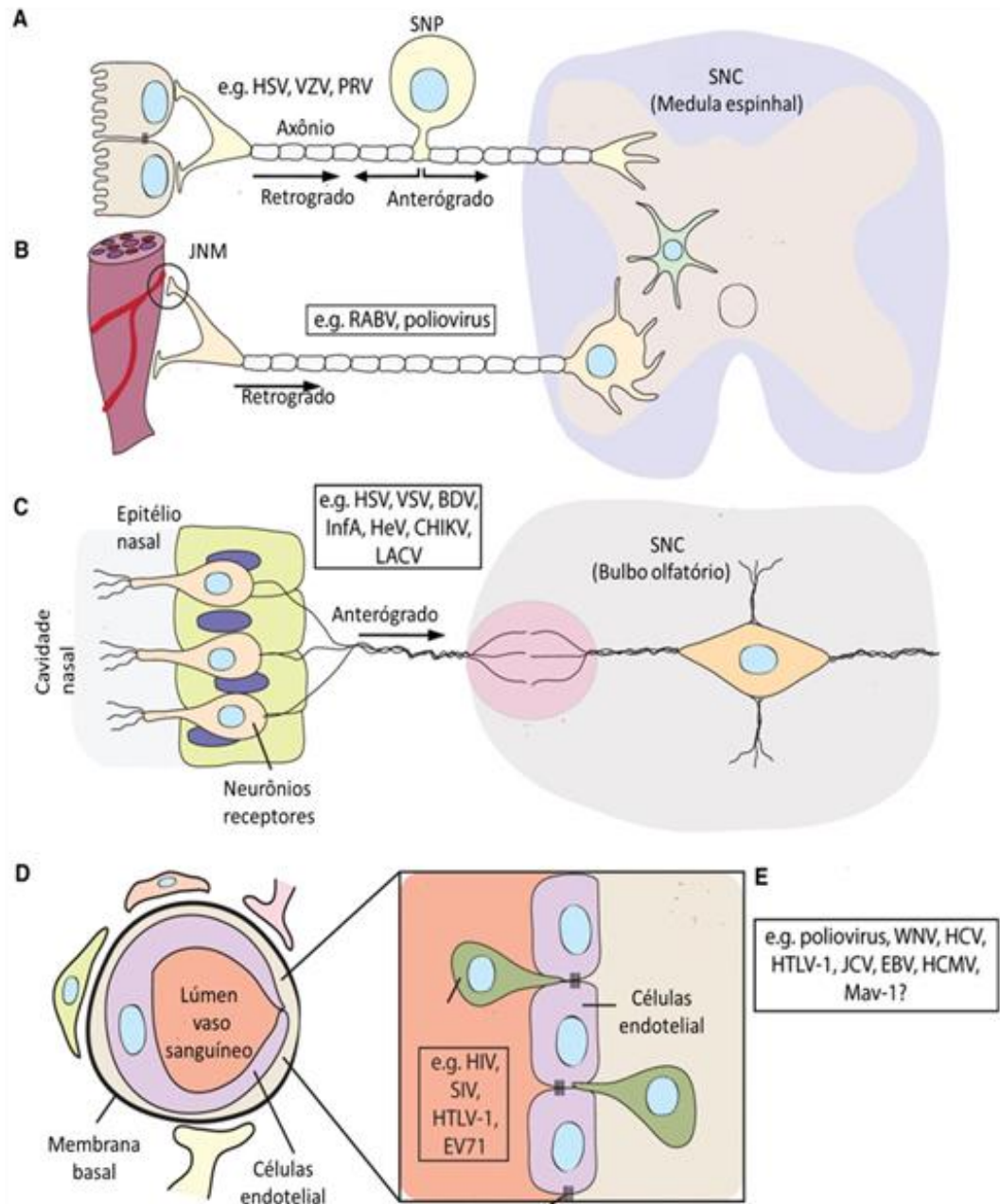
No Brasil, as meningites são doenças de notificação compulsória. Nos anos de 2018 e 2019 foram notificados 17.571 e 16.155 casos de meningites, respectivamente, e as meningites virais corresponderam em 2018 a 49,81% (8.753) e em 2019 a 49,11% (7.934) dos casos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2021). O impacto dessas infecções no sistema de saúde foi avaliado em um estudo realizado em um hospital pediátrico nos EUA em 2013, sendo que o custo médio por criança diagnosticada foi de USD\$ 5.056,00 (NIGROVIC *et al.*, 2013).

2.2 Agentes virais neurotrópicos

Os vírus utilizam diversas vias para penetrar no organismo humano, dentre elas a via respiratória, oral, sexual, transplacentária e inoculação por picada de insetos. Após a

exposição do indivíduo ao vírus, o mesmo invade as células, se amplifica e estabelece a viremia, normalmente por via hematológica, não acometendo necessariamente o SNC (COHEN, 2016). Para conseguirem atingir o SNC e estabelecerem uma infecção, os vírus utilizam rotas diversas (FIG. 2). Os herpesvírus utilizam o sistema nervoso periférico (SNP) para invadir o SNC. Eles infectam, inicialmente, neurônios sensoriais de gânglios do SNP (FIG. 2, A e C). Os principais caminhos que os enterovírus e os flavivírus utilizam para infectar o SNC são a penetração direta na barreira hematoencefálica ou infectando leucócitos que têm acesso ao SNC, mecanismo conhecido como “cavalo de Tróia” (FIG. 2, D) (KOYUNCU *et al.*, 2013).

Figura 2 – Rotas de entrada de vírus no SNC

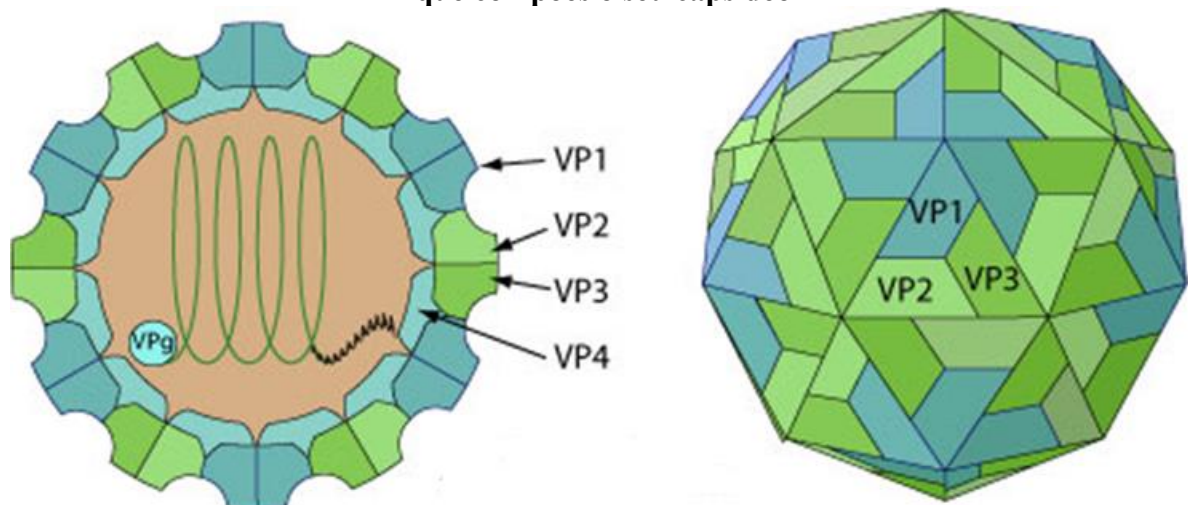


A) Herpesvirus (por exemplo, HSV-1, VZV, e PRV) neurônios sensoriais de gânglios do sistema nervoso periférico (SNP). B) Rabdovirus (RABV) e Poliovirus infectam neurônios motores da medula espinhal espalhar via junções neuromusculares (JNM). C) Vários vírus podem infectar neurônios receptores no epitélio nasal. Para que atinjam o SNC é necessário um transporte axonal anterógrado ao longo do nervo olfativo. D) Infiltração através barreira hematoencefálica (BHE). A BHE é composta de células endoteliais microvasculares cerebrais em torno membrana basal dos vasos, astrócitos e neurônios. Leucócitos infectados podem atravessar essa barreira transportando vírus no parênquima cerebral. E) De forma alternativa, as partículas de vírus na corrente sanguínea podem infectar as células endoteliais microvasculares cerebrais (BMVECs), comprometendo a certificação. Siglas: Pseudorabies Virus (PRV); Bovine HerpesVirus (BHV); Vesicular Stomatitis Virus (VSV), Borna Disease Virus (BDV); Influenza A Virus (InfA); Hendra Virus (HeV); Chikungunya Virus (CHIKV); Immunodeficiency Virus (SIV); Human immunodeficiency Virus (HIV); Human T Cell Leukemia Virus (HTLV), La Crosse Virus (LACV); Mouse Adenovírus 1 (MAV-1); Enterovirus 71 (EV71); JC Virus(JCV); Epstein-Barr Virus(EBV); Human Cytomegalovirus (HCMV); Mouse Adenovirus 1 (MAV-1). Fonte: KOYUNCU *et al.*, 2013, adaptado por OLIVEIRA, 2015.

2.2.1 Enterovírus

Os enterovírus (ENTV) são vírus de RNA pertencentes à família *Picornaviridae*. Possuem forma esférica, com diâmetro de 25 a 30nm, sem envelope glicoproteico e apresentam capsídeo icosaédrico composto por 60 capsômeros formados por quatro polipeptídeos estruturais (VP1, VP2, VP3 e VP4) (FIG.3). O genoma de RNA dos piconavírus é único porque apresenta uma proteína denominada VPg covalentemente ligada à extremidade 5' do RNA viral (Proteína Viral Ligada ao Genoma), que é a iniciadora da síntese de RNA (YIN-MURPHY; ALMOND, 1996; LEE *et al.* 1977).

Figura 3 – Representação esquemática da partícula viral dos piconavírus e das proteínas que compõem o seu capsídeo



Fonte: SWISS INSTITUTE OF BIOINFORMATICS, 2021.

Os membros dessa família são patógenos onipresentes e incluem mais de 70 diferentes sorotipos que infectam humanos de todas as idades e tendem a ocorrer de forma sazonal. De acordo com a classificação do INTERNATIONAL COMMITTEE ON TAXONOMY OF VIRUSES (ICTV, 2020), o gênero *Enterovirus* é composto por 15 espécies, sendo elas *Enterovirus A*, *Enterovirus B*, *Enterovirus C*, *Enterovirus D*, *Enterovirus E*, *Enterovirus F*, *Enterovirus G*, *Enterovirus H*, *Enterovirus I*, *Enterovirus J*, *Enterovirus K* e *Enterovirus L* e os *Rhinovirus A*, *Rhinovirus B* e *Rhinovirus C*.

As infecções por ENTV são importantes causas de morbidade e mortalidade em todo o mundo. Neste gênero encontramos notáveis patógenos humanos tais como os Poliovírus

(PV), os Coxsackievírus (CV) e os Enterovírus-A71 (EV-A71) (PALLANSCH; ROOS, 2007). Embora a maioria das infecções por eles causadas sejam assintomáticas, os ENTV são a principal causa de meningite viral nos Estados Unidos, com cerca de 75.000 casos anuais, especialmente do final da primavera ao outono, período de maior sazonalidade da transmissão desses vírus. A transmissão dos ENTV se dá principalmente pela via oral-fecal (PALLANSCH; ROOS, 2007). Os ENTV também podem produzir doenças graves e, às vezes, fatais como a meningite, encefalite, miocardite, sepse neonatal e poliomielite (STALKUP; CHILUKURI, 2002).

O *Enterovírus A71* é um sorotipo que é causa comum de doenças nos pés, mãos e boca e, por vezes, causa encefalites. Existem relatos de isolamento de Enterovírus A71 em crianças brasileiras (DOMINGUES; TEIXEIRA, 2009). O potencial epidêmico de Enterovírus A71 é conhecido em todo o mundo desde 1969. Na Ásia, o Enterovírus A71 é responsável por romboencefalite grave ou encefalite de tronco cerebral observada em epidemias envolvendo crianças. A encefalite pode se apresentar como um fato isolado como uma complicação da infecção, ou associado com miocardite, edema pulmonar, ou paralisia flácida aguda. Epidemias causadas por Enterovírus A71 são raramente observados em países desenvolvidos (STAHL *et al.*, 2011).

A cultura viral foi considerada por muito tempo o “padrão ouro” para o diagnóstico de infecções por enterovírus em diferentes amostras clínicas, tais como fezes, secreção de garganta e no líquido cefalorraquidiano (LCR). No entanto, a cultura viral leva de 4-8 dias e o diagnóstico acaba sendo, muitas vezes, tardio e pouco contribui para influenciar na tomada de decisão clínica (SAWYER, 2002). A sensibilidade da cultura viral é relativamente baixa (53-75%) e alguns sorotipos de ENTV não apresentam bom crescimento em culturas (CROM *et al.*, 2012). Atualmente, métodos moleculares como a Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real (qPCR) têm sido considerados de maior valia que os métodos imunológicos e de isolamento em cultura celular.

Exemplificando esta informação, a utilidade da qPCR pôde ser vista em um episódio de uma epidemia de meningite asséptica na Suíça, relacionada com Echovírus 30 em que o genoma viral dos Enterovírus foi identificado em 42 de 50 culturas de LCR (84%) negativas para o isolamento viral utilizando esta técnica (GORGIEVSKI-HRISOHO *et al.*, 1998).

2.2.2 Herpesvírus

Os herpesvírus humanos (HHVs) pertencem a família *Herpesviridae*, são vírus ubíquos e, uma vez ocorrida a primo-infecção, permanecem no organismo do indivíduo afetado durante toda a vida (latência). Estes vírus provocam uma grande variedade de doenças, sendo que as infecções são frequentemente benignas, podendo, contudo, em indivíduos imunocomprometidos, causar manifestações clínicas de gravidade variada (KONEMAN *et al.*, 2001).

A família *Herpesviridae* está dividida em 3 sub-famílias: *Alphaherpesvirinae* (α -herpesvirinae), *Betaherpesvirinae* (β -herpesvirinae) e a *Gammaherpesvirinae* (γ -herpesvirinae). Estas são distintas pelas suas características virais e estruturais, bem como pelo seu poder patogênico. Todos os tipos de vírus inseridos nesta família são vírus de DNA com cadeia dupla e os diferentes tipos de herpesvírus partilham características estruturais semelhantes. A Tabela 1 exhibe uma lista de vírus pertencentes ao grupo herpes que infectam humanos (KONEMAN *et al.*, 2001).

Tabela 1 – Vírus do grupo herpes que infectam humanos.

Vírus	Sinônimo	Sub-família	Abreviação
Herpesvírus Humano-1	Herpes simplex-1	α	HSV-1/HHV-1
Herpesvírus Humano-2	Herpes simplex-2	α	HSV-2/HHV-2
Herpesvírus Humano-3	Varicella-zoster	α	VZV/HHV-3
Herpesvírus Humano-4	Epstein-Barr	γ	EBV/HHV-4
Herpesvírus Humano-5	Citomegalovírus	β	CMV/HHV-5
Herpesvírus Humano-6	Não há	β	HHV-6
Herpesvírus Humano-7	Não há	β	HHV-7
Herpesvírus Humano-8	Não há	γ	KSHV/HHV-8

Os vírus do grupo herpes estabelecem infecções primárias que resultam em resposta imunitária eficiente que pode impedir uma nova infecção. Contudo, o vírus não é totalmente eliminado, sendo que seu genoma é mantido em determinadas células, sem que haja uma infecção produtiva. As infecções latentes podem tornar-se ativas (reativação) devido a fatores relacionados ao hospedeiro e estas manifestações permitem a disseminação dos herpesvírus,

uma vez que se verifica libertação de *virions* para o espaço extracelular (KONEMAN *et al.*, 2001; MADIGAN *et al.*, 2000).

Os Herpesvirus Humanos Simples tipos I e II (HSV-1 e HSV-2) estão, usualmente, associados com herpes labial e genital, respectivamente. Contudo, herpes genital pode ser uma consequência de infecção por HSV-1 e herpes labial pode, também, ser causado por HSV-2 (KONEMAN *et al.*, 2001). As manifestações clínicas mais comuns relativas aos HSVs são: formações de vesículas (pequenas bolhas) nos lábios, boca, nariz, olhos, rosto, órgãos genitais e nádegas, que rompem e causam dor intensa (YOSHIDA *et al.*, 2012). O vírus multiplica-se no local da inoculação, difunde-se através de nervos sensitivos, de vasos linfáticos ou, menos frequentemente, pelo sangue circulante.

As células-alvo primárias são as células epiteliais, ou, mais raramente, os neurônios dos gânglios sensoriais dorsais, o cérebro ou as meninges. Embora as lesões sejam bastante dolorosas, normalmente são autolimitadas e desaparecem espontaneamente. No entanto, uma vez ocorrido a primo-infecção, o vírus permanece latente nas células nervosas podendo ser reativado, intermitentemente, dependendo de fatores relacionados ao hospedeiro (KONEMAN *et al.*, 2001).

O vírus Varicela-Zoster (VZV) causa a varicela (vulgarmente, chamada de catapora) na infecção primária que ocorre, especialmente, em crianças. A reativação do VZV pode causar o aparecimento do zoster: tipo de manifestação herpética que ocorre com mais frequência em idosos. Manifestações neurológicas causadas por VZV podem ocorrer tanto na infecção primária como na reativação (HAUG *et al.*, 2010; CUNHA *et al.*, 2011; BEN-AMOR *et al.*, 2011).

O Epstein-Barr vírus (EBV) é associado com a mononucleose infecciosa, linfoma de Burkitt e carcinoma nasofaríngeo. O EBV tem causado doença tanto no SNC como no Sistema Nervoso Periférico, sendo reportado em casos individuais de meningite, encefalite e mielite (DI CARLO *et al.*, 2011). Associações com amostras positivas para este vírus em líquido cefalorraquidiano tem sido relatadas (DUPUIS *et al.*, 2011; SHIMIZU *et al.*, 2011). Tumores neurológicos, principalmente linfomas do tipo B, tem sido associados ao EBV (GUALCO *et al.*, 2011; SUGITA *et al.*, 2010; TANDON *et al.*, 2009).

Complicações no SNC pela infecção devido ao Epstein-Barr ocorrem em 1 a 18% dos pacientes com mononucleose infecciosa e incluem encefalite, meningite, cerebelite, poliradiculomielite, mielite transversal, cranial e neuropatias periféricas e cranianas e anormalidades psiquiátricas. Em pacientes imunossuprimidos, as doenças linfo-proliferativas

são as mais comuns e algumas delas afetam o SNC (MARTELIUS *et al.*, 2011). A Desordem Linfoproliferativa Pós-transplante é uma proliferação linfóide que se desenvolve durante a imunossupressão tanto em transplantes de órgãos sólidos como de medula óssea. Envolve os linfonodos, pulmões, trato gastrintestinal, fígado e, mais raramente, o SNC. A maioria dos casos de Desordem Linfoproliferativa Pós-transplante se desenvolve devido ao EBV enquanto que Linfoma Primário do SNC não costuma estar associado ao EBV. Ambos, Linfoma e Desordem Linfoproliferativa podem ser indistinguíveis morfológicamente. A detecção do EBV pode ajudar no diagnóstico nestes casos (SUZUKI *et al.*, 2011).

Pacientes HIV-positivos tem maior risco de desenvolver Linfoma de Hodgkin devido à associação de imunodeficiência com a presença de EBV. Além do Linfoma de Hodgkin, o Linfoma de Burkitt é, classicamente, associado ao EBV, tanto em pacientes HIV-positivos como os negativos (JACOBSON; ABRAMSON, 2012).

A infecção primária por Citomegalovírus (CMV) causa uma síndrome parecida com a mononucleose infecciosa e é conhecida como citomegalia ou “doença de inclusão citomegálica”. As manifestações clínicas mais comuns nos pacientes com AIDS incluem retinite, envolvimento gastrintestinal, pneumonia e alterações do sistema nervoso central e periférico, tais como encefalite, polirradiculoneurite e neuropatia periférica (ANDERSON *et al.*, 2010). Em pacientes imunocompetentes, a infecção por CMV no SNC tem sido, na maioria das vezes, relacionada ao CMV congênito (AMIR *et al.*, 2011; BOSNJAK *et al.*, 2011). No entanto, casos de mielite associado ao CMV em pacientes imunocompetentes tem sido relatados na literatura (TRAN *et al.*, 2007; RIGAMONTI *et al.*, 2005).

O CMV é o vírus que, frequentemente, é mais reativado após transplante de órgãos e está dentre as maiores complicações infecciosas no período pós-transplante (TONG *et al.*, 2000). O CMV tem sido considerado uma importante causa de morbidade e mortalidade em transplantados de medula óssea e de órgãos sólidos. As manifestações causadas pelo CMV em pacientes transplantados incluem febre, leucopenia, plaquetopenia, mal-estar e doença órgão-invasiva que pode levar a rejeição do enxerto ou mesmo atingir outros órgãos do indivíduo (THOMASINI *et al.*, 2017).

Em pacientes HIV-positivos, a retinite é a manifestação mais comum ligada ao CMV. No entanto, mieloradiculite causada por infecção pelo CMV, também, tem sido relatada na literatura (PINTO *et al.*, 2011). Viremia por CMV tem sido considerada, por alguns autores, como sendo um fator de risco independente para morte em pacientes HIV-positivos (JACOBSON *et al.*, 2011).

As infecções primárias por HHV-6 e HHV-7 causam uma síndrome infecciosa febril comum na primeira infância, conhecida como exantema súbito ou roséola (KONEMAN *et al.*, 2001). Convulsões, encefalite e encefalopatia têm sido associadas a doenças febris causadas pelo HHV-6 e HHV-7 bem antes do exantema súbito ser, clinicamente, caracterizado no paciente. A relação entre infecção primária pelo HHV-6 subtipo B e as manifestações acima descritas foram confirmadas por alguns autores (DUPUIS *et al.*, 2011; HOSHINO *et al.*, 2011).

O papel do HHV-7 como agente etiológico de doença neurológica é pouco estudado. Alguns casos de detecção do HHV-7, associado com manifestações neurológicas têm sido descritas na literatura (WADA *et al.*, 2009). Holden e Vas (2007) descreveram um caso de detecção de HHV-7 em um paciente com manifestações neurológicas que piorou quando o tratamento antiviral foi suspenso. Neste caso, nenhum outro patógeno foi identificado. A associação do HHV-7 com doença neurológica raramente pode ocorrer ou pode estar subestimado devido ao fato de não ser rotineiramente pesquisada.

Existem relatos sugerindo ligação do HHV-6 com Esclerose Múltipla e Síndrome de Fadiga Crônica, mas esta associação ainda é controversa (TYLER, 2003).

O Herpesvírus Humano Tipo 8 é associado ao Sarcoma de Kaposi e pode levar a morte em pacientes imunossuprimidos, especialmente na Síndrome da Imunodeficiência Humana Adquirida (AIDS). O HHV-8 também tem sido associado com linfoma primário do sistema nervoso central (DA SILVA; OLIVEIRA, 2011; GAIDANO *et al.*, 1997). Não há relatos de infecção por HHV-8 no SNC não-associadas a tumores até o presente momento.

Membros da família *Herpesviridae* produzem infecções virais no SNC com maior frequência em comparação com as bactérias, leveduras e protozoários (RANTALAIHO *et al.*, 2001; ROMERO *et al.*, 2003). Os herpesvírus neurotrópicos estão comumente relacionados com casos de encefalite (STEINER, 2011) e podem causar esta doença em indivíduos imunocompetentes (CHESKY *et al.*, 2000; CINQUE *et al.*, 2003).

A encefalite é a mais grave das infecções causadas pelos herpesvírus. O quadro clínico de indivíduos com infecção do SNC por vírus apresenta-se em graus variáveis, dependendo das características do agente e/ou do hospedeiro (KONEMAN *et al.*, 2001). Além da encefalite, os herpesvírus podem causar também meningite, mielite, radiculite, meningoencefalite, neurites e polineurite (PHOWTHONGKUM *et al.*, 2007).

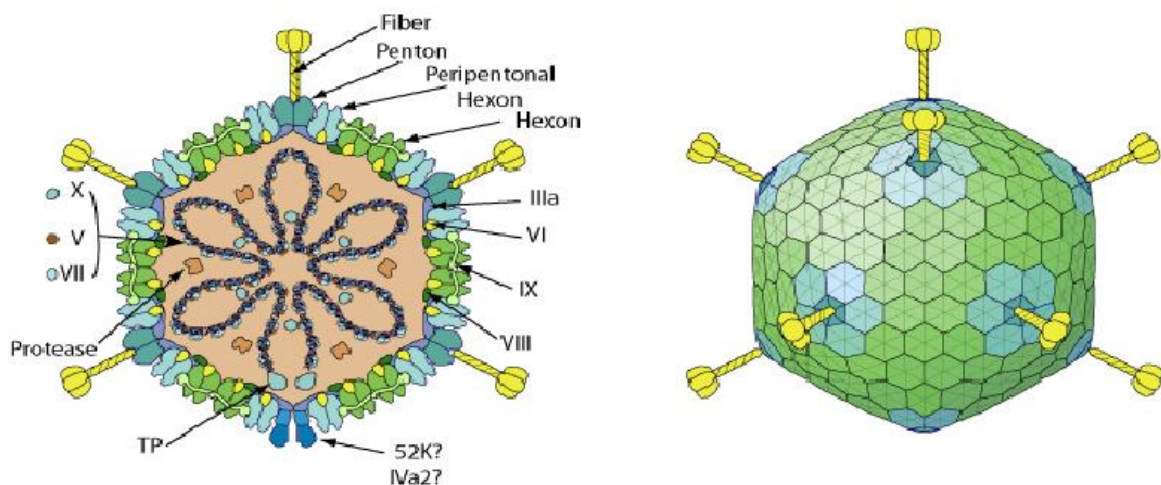
As manifestações clínicas da doença neurológica em crianças muito pequenas ou em adultos causadas por HSV e VZV podem, algumas vezes, ocorrer na ausência de lesões cutâneas (RAND *et al.*, 2005; GREGOIRE *et al.*, 2006). Sintomas comuns com outros agentes

incluindo febre, cefaleia, náusea, vômitos, além da falta de dados epidemiológicos, podem contribuir para um diagnóstico impreciso. Contudo, o envolvimento do parênquima cerebral é típico de infecções por herpesvírus neurotrópicos (CASAS *et al.*, 1999). O CMV, EBV e HSV são as causas mais frequentes de síndromes neurológicas entre pacientes com AIDS (DRAGO *et al.*, 2004) e, VZV e HHV-6 ocorrem com menor frequência (TASCINI *et al.*, 2010; CORTI *et al.*, 2011; CALVARIO *et al.*, 2002).

2.2.3 Adenovírus

A família *Adenoviridae* é composta por 6 gêneros (*Atadenovirus*, *Aviadenovirus*, *Ichtadenovirus*, *Mastadenovirus*, *Siadenovirus* e *Testadenovirus*) e 86 espécies. Os adenovírus (ADV) são vírus de DNA (FIG. 4) que, normalmente, causam infecções leves envolvendo o trato respiratório, trato gastrointestinal, ou conjuntiva. Raras manifestações de infecções por adenovírus incluem cistite hemorrágica, hepatite, colite hemorrágica, pancreatite, nefrite ou encefalite. Infecções por adenovírus são mais comuns em crianças pequenas, devido à baixa imunidade humoral. A doença é mais grave e a disseminação ocorre com mais facilidade em pacientes com imunidade comprometida como os pacientes transplantados, indivíduos HIV-positivos e com síndromes de imunodeficiência congênita (LYNCH *et al.*, 2011).

Figura 4 – Representação esquemática da partícula viral dos adenovírus



Fonte: SWISS INSTITUTE OF BIOINFORMATICS, 2021.

Diferentes sorotipos exibem tropismo por diferentes tecidos e correlacionam-se com a manifestações clínicas da infecção. Os sorotipos predominantes diferem entre países ou regiões e mudam ao longo do tempo. Transmissão de novas cepas entre países ou entre os

continentes e substituição de alguns sorotipos por outros podem ocorrer. O tratamento das infecções por adenovírus é controverso porque faltam estudos prospectivos e triagens terapêuticas randomizadas (LYNCH *et al.*, 2011).

Infecções do SNC por adenovírus tem sido relatadas após transplante de medula óssea e parece estar associada à indução da depleção de células T *in vivo* (SCHMIDT-HIEBER *et al.*, 2011; FRANGE *et al.*, 2011). Os sinais clínicos e radiológicos podem apresentar-se atípicos e o quadro pode ser bastante grave (FRANGE *et al.*, 2011).

2.2.4 John Cunningham vírus

O John Cunningham vírus (JCV) é classificado dentro da família *Poliomaviridae*. Este vírus é, geralmente, de baixa patogenicidade para os indivíduos imunocompetentes. Contudo, a reativação em indivíduos imunocomprometidos, especialmente com imunodeficiência celular, tem sido associada com complicações sérias. A transmissão ocorre, provavelmente, através da rota respiratória e, talvez, pela rota fecal-oral (WEINBERG; MIAN, 2010).

O JCV é um vírus neurotrópico e a reativação da infecção latente provoca leucoencefalopatia multifocal progressiva (LEMP), uma doença desmielinizante neurológica fatal em indivíduos imunocomprometidos. A reativação da poliomavírus humano também pode ocorrer em pessoas saudáveis de forma assintomática (MAJOR; AULT, 1995).

2.2.5 Arbovírus

Os arbovírus são responsáveis por várias manifestações clínicas, que podem ser brandas ou severas, incluindo febres hemorrágicas e doenças neuroinvasivas. São mais frequentes em regiões tropicais e o vírus mais frequentemente associados a manifestações neurológicas são o Dengue vírus (DENV), o Zika vírus (ZIKV) e o Chikungunya vírus (CHIKV) (VIEIRA *et al.*, 2018).

2.2.6 Dengue vírus

O DENV é um arbovírus que possui um RNA de cadeia única. Ele pertence ao gênero *Flavivirus* da família *Flaviviridae*. As infecções pelo DENV estão entre as doenças transmitidas por artrópodes mais comuns no mundo. Existem quatro tipos de vírus, imunologicamente, relacionados (sorotipos), conhecidos como DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4 (NAVECA *et al.*, 2012). Em 2013, foi anunciado a descoberta de um 5º sorotipo de DENV (DENV-5). Contudo, este sorotipo parece estar restrito ao continente asiático, mas não se sabe bem qual o real *status quo* epidemiológico deste tipo de vírus (MUSTAFA *et al.*, 2015).

A dengue é considerada uma das mais importantes arboviroses em humanos. Ocorre nas regiões tropicais e subtropicais do mundo e apresenta importante grau de morbidade e mortalidade. Cerca de 2,5 bilhões de pessoas correm o risco de serem infectadas por este vírus. O dengue vírus, por muito tempo, foi considerado um vírus não-neurotrópico para humanos. No entanto, alguns autores descreveram a presença deste vírus no líquido e de antígenos virais no tecido cerebral (DOMINGUES *et al.*, 2008; SOLOMON *et al.*, 2000). Além disso, encefalite, encefalomielite disseminada aguda, neuropatias, e síndrome de Guillain-Barré (GBS) têm sido associadas a infecção pelo dengue vírus em regiões endêmicas (LI *et al.*, 2017, PUCCIONI-SOHLER *et al.*, 2012).

As manifestações neurológicas causadas pelo dengue vírus incluem confusão mental e encefalite difusa. Este quadro geralmente é benigno. Não está claro se as manifestações neurológicas são resultado de desbalanço metabólico, invasão viral direta ou dano tecidual imunomediado (DOMINGUES; TEIXEIRA, 2009).

2.2.7 Zika vírus

O ZIKV é um flavivírus de RNA com um genoma de aproximadamente 11Kb. O diâmetro do *virion* é de aproximadamente 50-60 nm e o seu arranjo do nucleocapsídeo possui formato icosaédrico. É transmitido por muitos mosquitos do gênero *Aedes*, mas principalmente pelo *Aedes aegypti* (JAVED *et al.*, 2018).

O ZIKV foi identificado pela primeira vez em macacos *Rhesus* na floresta Zika em Uganda, em 1947. O ZIKV se tornou uma preocupação de saúde pública em vários países e tem sido associado à microcefalia em neonatos e à síndrome de Guillain-Barré em adultos (WHITE

et al., 2016, JAVED *et al.*, 2018). Em 2015, houve uma epidemia no Brasil com mais de 1 milhão de casos suspeitos.

Os sintomas da infecção pelo ZIKV aparecem de 3 a 11 dias após a picada do mosquito e podem ser diversos (dor de cabeça, exantema maculopapular, febre, conjuntivite e dores nas articulações). Manifestações neurológicas foram demonstradas em camundongos independentemente da idade e incluíam encefalites com infiltração celular e degeneração neuronal, entre outras (JAVED *et al.*, 2018). O ZIKV também tem sido apontado como causador de microcefalia e estudos identificaram RNA viral no líquido amniótico de duas mulheres cujas crianças foram diagnosticadas com microcefalia (OLIVEIRA-MELO *et al.*, 2016).

2.2.8 *Chikungunya vírus*

O Chikungunya é um vírus encapsulado com diâmetro em torno de 70 nm, pertencente ao gênero *Alphavirus* da família *Togaviridae*. Seu genoma é de aproximadamente 12 Kb e constituído por RNA (SILVA; TERENCE, 2017).

Ele foi identificado como patógeno humano em 1952, quando foi isolado em um paciente com artrite debilitante na Tanzânia. Sua transmissão também ocorre pela picada de um mosquito *Aedes* infectado. Dentre os sintomas por ele causados estão manifestações dermatológicas múltiplas, hemorragia, hepatite, miocardite, doença ocular e neurológica. As manifestações neurológicas incluem dor de cabeça, meningoencefalites, encefalopatias, síndrome de Guillain-Barré, paresia, paralisias e neuropatia (GANESAN *et al.*, 2017, SILVA; TERENCE, 2017).

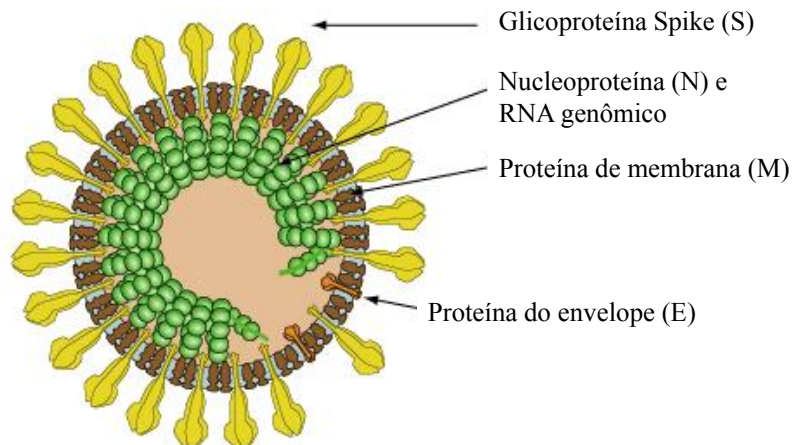
A febre Chikungunya é facilmente confundida com outras arboviroses como dengue e zika. O seu diagnóstico laboratorial é feito pela pesquisa do vírus por testes moleculares (tipicamente PCR) nos primeiros dias de sintomas. Após o oitavo dia essa ferramenta perde sua utilidade devido à queda da viremia e a pesquisa de anticorpos IgM por métodos sorológicos a partir do segundo dia é recomendada (GANESAN *et al.*, 2017, GRIVARD *et al.*, 2007).

2.2.9 Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2

Os Coronavírus são uma família muito diversa de vírus envelopados de RNA de sentido positivo (FIG.5). Eles infectam humanos, outros mamíferos e aves e têm se tornado um desafio para a saúde pública, veterinária e uma preocupação econômica. A família *Coronaviridae* pertence à ordem *Nidovirales* e subordem *Coronavirineae*. Essa família contém a subfamília *Orthocoronavirinae*, que possui quatro gêneros: *Alfacoronavirus*, *Betacoronavirus*, *Gamacoronavirus* e *Deltacoronavirus*. Enquanto os *Alfacoronavirus* e *Betacoronavirus* infectam exclusivamente espécies de mamíferos, os *Gamacoronavirus* e *Deltacoronavirus* infectam, além dos mamíferos, as aves (HU *et al.*, 2021).

No final de 2019, um novo coronavírus, denominado de *Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2)* surgiu na cidade de Wuhan, na China, e causou um surto de pneumonia viral com características incomuns. Com alta taxa de transmissão, essa nova doença causada por coronavírus, denominada de COVID-19, se espalhou rapidamente pelo mundo, e em 11 de março de 2020, foi caracterizada como uma pandemia pela OMS (WU *et al.*, 2020; V'KOVSKI *et al.*, 2020).

Figura 5 – Ilustração da estrutura dos Coronavírus



Fonte: SWISS INSTITUTE OF BIOINFORMATICS, 2021.

Os coronavírus infectam as células hospedeiras por meio da ligação de glicoproteínas expressas em sua superfície ao receptor da Enzima Conversora de Angiotensina 2 (ECA-2), que está presente no epitélio do trato respiratório, pulmão, parênquima e outras áreas como o trato gastrointestinal, nas células endoteliais, entre outros. O acometimento

respiratório é o mais comum nos pacientes confirmados com COVID-19, porém já existem relatos de manifestações neurológicas. Já é sabido que outros coronavírus causam acometimento no SNC e estudos em animais e em humanos revelaram que a provável via de infecção neural seja através do nervo olfatório (CARDONA *et al.*, 2020).

2.3 Diagnóstico laboratorial das infecções no sistema nervoso central

A análise de alguns parâmetros do LCR é utilizada rotineiramente para tentar diferenciar as infecções bacterianas, que apresentam maior letalidade, das outras infecções que podem acometer o SNC. A contagem e diferenciação das células, a concentração de proteínas e glicose são alguns destes parâmetros. Nos casos de meningite ou encefalite viral, nas análises do LCR são observados tipicamente: pleocitose linfocítica (5 a 500 células/mL), moderada elevação de proteínas (50 a 200 mg/dL) e níveis normais de glicose no LCR (60-80% da glicose plasmática), embora o líquido sem alterações destes parâmetros também não exclua o diagnóstico de infecção viral (BONTHIUS, 2012; WHITE *et al.*, 2012).

O isolamento em cultura de células e os testes sorológicos foram considerados por muito tempo como “padrão ouro” no diagnóstico de infecções virais. O diagnóstico etiológico rápido pode oferecer informações importantes para o manejo de pacientes com doença neurológica e suspeita de origem viral. Entretanto, diversos obstáculos no desenvolvimento destas técnicas como, por exemplo, o tempo lento de detecção causam um retardo no diagnóstico (PEAPER; LANDRY, 2014; PALAZZO; YAHIA, 2012).

O diagnóstico baseado no isolamento viral a partir do líquido também possui uma sensibilidade relativamente baixa (CALVARIO *et al.*, 2002). Em um estudo realizado por Furione *et al.* (1998) comparando o isolamento de enterovírus por cultivo celular com a detecção de RNA enteroviral pelo método de qPCR, exemplificou a maior sensibilidade das técnicas moleculares. Das 47 amostras por eles testados, 12 (25,5%) tiveram cultivos celulares positivos e 23 (48,9%) foram positivas quando utilizada a técnica de qPCR. O efeito citopático dos cultivos foi observado de 5-15 dias após a inoculação. Além disso, o isolamento viral por cultivo celular é um procedimento que exige uma estrutura laboratorial difícil de ser implantada na maioria dos serviços de saúde.

A qPCR é altamente recomendada por sua alta sensibilidade de detecção logo nos períodos iniciais da infecção, tornando possível um melhor direcionamento nos tratamentos. Métodos moleculares revolucionaram o diagnóstico viral. Hoje a padronização da qPCR

de amostras de LCR substitui técnicas mais invasivas como por exemplo, biópsias de tecido cerebral e menos sensíveis e específicas como a cultura (PEAPER; LANDRY, 2014; ROWLEY *et al.*, 1990). A detecção por qPCR é o método mais sensível e permite não somente o diagnóstico, mas também acompanhar a evolução da doença e do tratamento. Atualmente é indicada como metodologia “padrão ouro” no diagnóstico das neuroinfecções virais (MCGILL *et al.*, 2017; VANCÍKOVÁ; DVORÁK, 2001).

A demonstração de reposta imune humoral intratecal (IgG específica) pode, também, fornecer diagnóstico para alguns vírus como o HSV e VZV. No entanto, os níveis de anticorpos começam a aumentar no líquido apenas quando a carga viral diminui neste mesmo material biológico (GRAHN *et al.*, 2011). A detecção de anticorpos específicos em líquido contra CMV demonstra menor capacidade diagnóstica que métodos moleculares (WEBER *et al.*, 1994). Em pacientes com esclerose múltipla, a detecção intratecal de IgG contra antígeno de capsídeo viral do EBV (VCA) tem sido realizada. Os títulos de anticorpos contra o VCA aumentam em reativação viral indicando que o EBV pode estar envolvido com esta doença (JACQUIÉRI *et al.*, 2010). No entanto, não existe, até o momento, estudo que comprove que a detecção de anticorpos intratecais contra o EBV poderia ser usada para diagnóstica das infecções por este vírus no SNC. Em suma, a detecção de anticorpos intratecais contra herpesvírus poderiam fornecer diagnóstico imprecisos e demorados para uso rotineiro.

A qPCR permite a detecção de DNA viral em poucas horas de ensaio e apresenta grande sensibilidade e especificidade. A detecção de genoma de vírus de RNA também é possível após a obtenção de cDNA pelo uso da enzima transcriptase reversa. Após a transcrição reversa do RNA viral em cDNA, a qPCR pode ser realizada da mesma forma que para os vírus de DNA. A qPCR tem sido usada com sucesso para diagnóstico de uma variedade de síndromes neurológicas causadas por estes agentes (BERGALLO *et al.*, 2007; BOARETTI *et al.*, 2008).

Um cuidado importante é considerar que a detecção de DNA de Herpesvírus em fluidos biológicos pode não indicar, necessariamente, infecção ativa. A determinação da carga viral pode ser, muitas vezes, importante para uma melhor correlação com a clínica (THOMASINI *et al.*, 2008; COSTA *et al.*, 2011).

Recentemente, a qPCR tem sido utilizada para detecção e quantificação de DNA e RNA viral com grande vantagem em relação à PCR convencional. Além da possibilidade de quantificação em “tempo real” da carga viral, há um ganho de sensibilidade do método (RAMAMURTHY *et al.*, 2011).

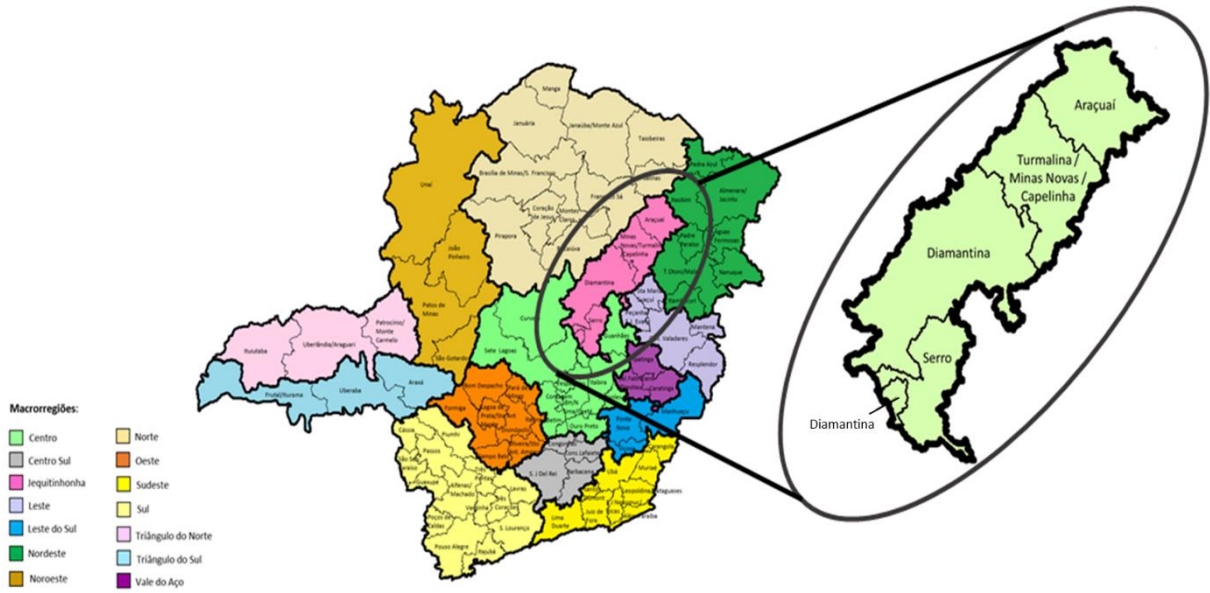
Entre os principais vírus causadores de manifestações neurológicas estão: ENTV, ADV, JCV, HSV-1, HSV-2, VZV, EBV, CMV, HHV-6 A/B, HHV-7. Estes vírus podem ser pesquisados e suas cargas virais quantificadas por qPCR após extração de DNA e RNA a partir do líquido. O diagnóstico rápido das infecções virais no SNC é de grande importância para o correto manejo do paciente. Muitos vírus causam impacto considerável em pacientes imunossuprimidos como os transplantados, HIV-positivos e no pós-quimioterapia. O desenvolvimento de uma plataforma diagnóstica que apresente resultados rápidos e quantitativos dos principais vírus causadores de infecção no SNC pode auxiliar na decisão para o tratamento destes pacientes.

Além disso, outros vírus menos comuns e alguns vírus emergentes como o DENV, o ZIKV e o CHIKV, cujas manifestações neurológicas ainda são pouco conhecidas, podem ser testados, fornecendo assim, melhores informações sobre a circulação e a prevalência desses de agentes que não são rotineiramente pesquisados e podem estar sendo subnotificados.

2.4 Caracterização da macrorregião de saúde Jequitinhonha de Minas Gerais

A macrorregião de saúde Jequitinhonha é constituída pelas microrregiões de Araçuaí, Diamantina, Serro e Turmalina/Minas Novas/Capelinha (FIG.6). Ela compreende uma extensão territorial de 27.718 Km² englobando 31 municípios. A população estimada em 2019 era de 407.645 habitantes. Diamantina é a cidade polo dessa macrorregião. A Santa Casa de Caridade de Diamantina é um hospital filantrópico, fundado em 1790. Ela é o hospital de referência para atendimento de diversas especialidades, dentre elas o serviço de neurologia e neurocirurgia.

Figura 6 – Representação da Macrorregião de saúde Jequitinhonha / MG



Fonte: Adaptado de: Secretaria Estadual de Saúde de Minas Gerais – SES/MG.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivos gerais

Aplicar uma plataforma em formato de “mini-arranjo” baseada na reação de qPCR para os vírus HSV-1/2, EBV, VZV, CMV, HHV-6 A/B, HHV-7, ADV, JCV, ENTV, DENV, ZIKV e CHIKV em amostra de líquido de pacientes com suspeita de infecção viral no Sistema Nervoso Central e avaliar a frequência e o perfil destas infecções.

Detectar possíveis casos de SARS-CoV-2 no líquido dos pacientes incluídos neste estudo durante o período pandêmico.

3.2 Objetivos específicos

Testar uma plataforma em formato de “mini-arranjo” baseada em qPCR em amostra de líquido de pacientes com suspeita de infecção viral no Sistema Nervoso Central.

Avaliar a etiologia viral associado às infecções no Sistema Nervoso Central em pacientes internados no setor de neurologia da Santa Casa de Caridade de Diamantina – MG.

Investigar indícios de infecção viral no SNC por meio do exame de rotina do líquido, incluindo parâmetros físicos, bioquímicos, citológicos e microbiológicos.

Comparar os resultados do qPCR com os dados clínicos dos pacientes por meio da análise dos prontuários médicos.

Investigar a presença de SARS-Cov-2 nas amostras de líquido coletadas durante o período da pandemia.

4 JUSTIFICATIVA

As infecções virais no Sistema Nervoso Central são importantes causas de morbidade e mortalidade em humanos. Grande parte dos vírus abordados neste estudo podem causar impactos consideráveis em pacientes imunossuprimidos e os seus tratamentos geram um grande custo para a rede de assistência à saúde.

As técnicas de isolamento viral são procedimentos lentos e pouco sensíveis, além de possuírem uma certa complexidade, o que impede que as mesmas sejam implantadas na maior parte dos sistemas de saúde.

O diagnóstico rápido dessas infecções é importante para o correto tratamento dos pacientes. Desta forma, o desenvolvimento de um painel diagnóstico baseado em PCR em tempo real que apresente resultados rápidos e quantitativos dos principais vírus causadores de infecção no SNC poderia auxiliar neste propósito.

Embora estudos dessa natureza sejam realizados em diversas partes do mundo, pouco se sabe sobre a incidência de agentes virais envolvidos nas infecções do SNC no Brasil. É sabido que condições climáticas, geográficas, econômicas e socioculturais impactam na circulação de certos patógenos. Um exemplo é a presença de artrópodes vetores de alguns vírus, o que faz com que o nosso país seja endêmico para o dengue vírus, por exemplo. Essas condições favorecem também a emergência e reemergência de vírus com potencial neurotrópico.

Neste sentido, este estudo se torna importante não só pelo conhecimento dos possíveis agentes virais causadores de infecções no SNC circulantes em nossa região e até então negligenciados, mas também pelo auxílio de elaboração de protocolos mais específicos e direcionados para problemas de saúde do Vale do Jequitinhonha.

5 METODOLOGIA

5.1 Desenho do estudo

Foram incluídas no estudo amostras de Líquido Cefalorraquidiano (LCR) de pacientes de ambos os sexos, sem limitação por idade, com desordens neurológicas, internados, que apresentaram suspeita clínica de infecção no Sistema Nervoso Central provenientes do serviço de Neurologia/Neurocirurgia da Santa Casa de Caridade de Diamantina/MG no período de janeiro de 2019 a julho de 2021. As amostras biológicas (LCR) foram coletadas pelos médicos responsáveis e incluídas no estudo somente se já fizessem parte da investigação clínico-laboratorial do paciente.

5.1.2 Critérios de inclusão

Pacientes com suspeita clínica de meningite, meningoencefalite, encefalite disseminada aguda, mielite, radiculite, mieloradiculite e Síndrome de Guillain-Barré foram consideradas elegíveis para participar do estudo. Todos os pacientes encontravam-se internados na clínica neurológica ou no Centro de Terapia Intensiva (CTI) e eram acompanhados pela equipe da neurologia/neurocirurgia.

5.1.3 Critérios de exclusão

Os pacientes foram excluídos do estudo quando houve evidência conclusiva e exclusiva de etiologia não-viral da doença neurológica ou quando não houve indicação clínica para a coleta do LCR ou quando não houve indicação de internação.

5.2 Aspectos éticos

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri sob parecer CAAE: 96391118.1.0000.5108 (ANEXO A).

Todos os pacientes (ou seus respectivos responsáveis) que aceitaram participar da pesquisa assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (ANEXOS B). As amostras foram identificadas por códigos para preservar a identidade dos pacientes.

Como houve acesso ao patrimônio genético, o projeto foi cadastrado no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SISGEN) sob número AEA5D00 (ANEXO C), obedecendo ao estabelecido na lei 13.123 (BRASIL, 2015).

5.3 Análise de parâmetros do líquido

5.3.1 Características físicas

Inicialmente foram realizadas as análises de rotina do líquido. Foram avaliadas características físicas como cor e aspecto. Habitualmente, o líquido se apresenta incolor. Alterações na coloração podem ocasionar líquidos leitosos, xantocrômicos ou hemorrágicos. Os aspectos observados poderiam ser o límpido, o ligeiramente turvo e o turvo, sendo que o normal é o líquido possuir um aspecto límpido.

5.3.2 Dosagem de proteínas

As proteínas foram dosadas por um método colorimétrico baseado na metodologia de Vermelho de Pirogalol utilizando um kit comercial (Analisa®). Resumidamente, 25µL das amostras foram misturadas a 500µL do reagente de cor em tubos de ensaio. A mistura foi incubada por 5 minutos a 37°C. Posteriormente foi realizada a leitura em um analisador semi-automático de bioquímica (Bioplus-200®) em comprimento de onda de 620 nm. O aparelho foi zerado com o branco (reagente de cor sem a amostra) e calibrado com um padrão de 50 mg/dL proveniente do kit.

5.3.3 Parâmetros citológicos

A citometria foi realizada pela contagem em câmara de Neubauer. Foram determinados o número de células nucleadas e de hemácias. Para tanto, foi utilizado o líquido de Turck (mistura de ácido acético e violeta de genciana). Foi preparada uma diluição de 1:2 (100µL de amostra + 100µL do Líquido de Turck). Foram transferidos 10uL dessa preparação

para a Câmara de Neubauer e contadas as células nucleadas. Um volume de 10 μ L da amostra *in natura* também foi inserida na câmara para contagem das hemácias.

A determinação dos tipos celulares foi realizada da seguinte forma: o líquido foi centrifugado a 2.000 rpm por 5 minutos. Após transferência do sobrenadante para outro tubo estéril, foram pipetados 5 μ L em uma lâmina de vidro e confeccionados esfregaços. Após secagem e fixação da amostra, o esfregaço foi corado com May-Grunwald e Giemsa e levado ao microscópio óptico em aumento de 1.000x.

5.3.4 Análises microbiológicas

A pesquisa de fungos foi realizada pelo método da Tinta da China. Foram pipetados 5 μ L do sedimento do líquido e colocados em uma lâmina de vidro. À amostra foram adicionados 5 μ L de Tinta da China. A mistura foi coberta por uma lamínula e levada ao microscópio óptico para observação.

A pesquisa de bactérias foi feita pela coloração de Gram. Do sedimento do líquido foram retirados 5 μ L, inseridos em uma lâmina de vidro e submetidos ao processo de coloração. A lâmina corada foi levada ao microscópio óptico e observada em aumento de 1.000x.

5.4 Extração dos ácidos nucleicos

Os ácidos nucleicos foram extraídos com o uso do kit MiniPrep para extração de DNA/RNA viral de fluidos corporais (Axygen Corning, EUA) seguindo as instruções do fabricante. Resumidamente, a amostra foi centrifugada e o sobrenadante separado em outro tubo livre de DNA/RNase. Este último foi utilizado para a extração de ácidos nucleicos. Em seguida, o tubo foi homogeneizado em agitador vórtex. A um tubo de centrifugação, foram adicionados 200 μ L da amostra, 200 μ L de tampão de lise. A mistura foi incubada em temperatura ambiente por 5 minutos. Logo depois, foram adicionados 75 μ L tampão de precipitação de proteínas, seguidos de agitação e centrifugação a 12.000 x g por 5 minutos. O sobrenadante clarificado foi transferido para um tubo, ao qual foram adicionados 250 μ L de solução de ácido acético e isopropanol.

A solução resultante foi transferida para uma coluna MiniPrep acoplada a um tubo e centrifugado a 6.000 x g por 1 minuto. O filtrado foi descartado e a coluna posicionada em

outro tubo de centrifugação. Foram adicionados 500 μL de tampão de lavagem, seguido de centrifugação a 12.000 x g por 1 minuto. Uma lavagem final foi realizada pela adição de 800 μL de tampão de dessalinização e centrifugação a 12.000 x g por 1 minuto. Por fim, a coluna foi acoplada no interior de um tubo de centrifugação e os ácidos nucleicos a ela adsorvidos foram eluídos pela adição de 50 μL de água livre de DNase/RNase e centrifugação a 12.000 x g por 1 minuto. O eluato contendo DNA e RNA extraídos foi utilizado logo em sequência para a síntese de cDNA e posterior armazenamento a -20°C até a etapa seguinte da análise.

5.4.1 Síntese de cDNA

O cDNA de cada amostra foi preparado utilizando-se o *Platus Transcriber RNase H-cDNA First Strand Kit* (Sinapse Inc). A reação foi preparada da seguinte forma: em um tubo livre de DNA/RNase foram adicionados 0,5 μL (0,5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) de *primers* randômicos, 2 μL de tampão de reação 5x, 0,5 μL de inibidor de RNase, 1 μL (10mM) de mistura de dNTP, 0,5 μL (200U/ μL) de H Minus Transcriptase Reversa, 2 μL de amostra (RNA extraído) e 3,5 μL de água livre de DNase/RNase, totalizando 10 μL de reação final. Os tubos foram incubados a 25°C por 5 minutos, seguidos por 60 minutos a 42°C e por 5 minutos a 70°C . Os cDNAs obtidos, foram mantidos a -20°C até a utilização nas reações de RT-PCR.

5.4.2 Primers utilizados nas reações de qPCR

Os *primers* utilizados no estudo foram obtidos na literatura ou desenhados utilizando o *software Primer 3 Plus* (<https://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>) em um estudo prévio do próprio grupo de pesquisa (não publicado) e se referem a regiões conservadas dos vírus. A Tabela 2 apresenta as informações sobre estes *primers*. A ferramenta *OligoAnalyzer*TM foi utilizada para checar as informações sobre os *primers* como o conteúdo C-G, Temperatura de Dissociação (TM), identificação de potenciais estruturas secundárias e possibilidade de formação de dímeros. Todos os *primers* foram escolhidos para que amplificassem eficientemente o alvo em temperaturas de anelamento semelhantes para que fosse possível a utilização do painel em bloco de reação em formato de “miniarranjo”.

Tabela 2 – Detalhamento dos *primers* utilizados para as reações de qPCR

Vírus	Primers Forward / Reverse	Amplicon	Localização no genoma	Referência	TM*
HSV 1/2	GCCAAGAAAAAGTACATCGGCGTCATC (50 µM)	292 pb	DNA polimerase	Tanaka <i>et al.</i> , 2009	60,1
	TGAGGACAAAGTCCTGGATGTCCCTCT (900 µM)			Tanaka <i>et al.</i> , 2009	62,5
VZV	TTTCAATTCCTCCGTATCG (900 nM)	154 pb	Gene 71	N/A	55,9
	GAGAATCGGGTGTGGAAGAC (900 nM)			N/A	59
EBV	CCCGCCTACACACCAACTAT (300 nM)	104 pb	Gene EBER	Bai <i>et al.</i> , 1997	56,9
	GCGTAGGTCCTGAGGTTTTG (900nM)			N/A	55,9
CMV	TACCCCTATCGCGTGTGTTC (900 nM)	188 pb	Glicoproteína B	Thomasini <i>et al.</i> , 2017	56,7
	ATAGGAGGCGCCACGTATTC (900 nM)			Thomasini <i>et al.</i> , 2017	56,9
HHV-6 A/B	ATGCGCCATCATAATGCTCGGATACA (40 nM)	183 pb	DNA polimerase	Tanaka <i>et al.</i> , 2009	60,4
	CCCTGCATTCTTACGGAAGCAAAACG (40 nM)			Tanaka <i>et al.</i> , 2009	60,4
HHV-7	CACAAAAGCGTCGCTATCAA (900 nM)	319 pb	<i>Major Capsid Protein</i>	Bai <i>et al.</i> , 1997	53,6
	CGCATAACCAACCCTACTG (900 nM)			Bai <i>et al.</i> , 1997	55,5
ADV	GACATGACTTTCGAGGTCGATCCCATGGA	140 pb	EXON 3	Watanabe <i>et al.</i> , 2005	62,8
	CCGGCTGAGAAGGGTGTGCGCAGGTA			Watanabe <i>et al.</i> , 2005	68

(Continua)

(Continuação)

Vírus	Primers Forward / Reverso	Amplicon	Localização no genoma	Referência	TM*
JCV	AAGAAATTAAACCTTTCAACTAAC (500 nM)	140 pb	Tag	N/A	60,4
	TATAATGCCCAAATTTTGCAG (500 nM)			N/A	63,4
ENTV	CCCTGAATGCGGCTAA	120 pb	5'-UTR	Beuret, 2004	52
	TGTCACCATAAGCAGCCA			Beuret, 2004	54
DENV	TTGAGTAAACYRTGCTGCCTGTAGCTC	258 pb	3'-UTR	Lai <i>et al.</i> , 2007	60,4
	GAGACAGCAGGATCTCTGGTCTYTC			Lai <i>et al.</i> , 2007	59,2
ZIKV	CCTTGGATTCTTGAACGAGGA	192 pb	N5S	Balm <i>et al.</i> , 2012	54,5
	AGAGCTTCATTCTCCAGATCAA			Balm <i>et al.</i> , 2012	53,5
CHIKV	TCACTCCCTGTTGGACTTGATAGA	126 pb	ORF-2	Lanciotti <i>et al.</i> , 2007	57,1
	TTGACGAACAGAGTTAGGAACATACC			Lanciotti <i>et al.</i> , 2007	56,4

*TM: Temperatura de Desnaturação (*Temperature of Melting*) Calculado pelo OligoAnalyzer© 2021 Integrated DNA Technologies, Inc.

ADV: Adenovírus; CHIKV: Chikungunya vírus; CMV: Citomegalovírus; DENV: Dengue vírus; EBV: Epstein Barr vírus; ENTV: Enterovírus; HSV-1/2: Herpes Simples Vírus 1 e 2; HHV-6: Herpesvírus Humano-6 A/B; HHV-7: Herpesvírus Humano-7; JCV: John Cunningham vírus; VZV: Vacicela-Zoster vírus; ZIKV: Zika vírus.

Os *primers* foram testados em amostras de DNA ou cDNA viral mantidos em estoque no Núcleo de Estudos de Patologias Inflamatórias e Infecciosas da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri (NEPii-UFVJM). Os *primers* foram também testados de forma cruzada para verificar se não haveria amplificação inespecífica entre os vírus estudados. Inicialmente, os *primers* foram testados em concentrações equimolares de 1.000, 500 e 100 nM. Os que apresentaram algum grau de reação inespecífica foram titulados em combinações de concentrações conforme matriz esquematizada na Tabela 3. Os que mantiveram ampliações inespecíficas foram substituídos por novas sequências.

Tabela 3 – Matriz de titulação dos *primers*.

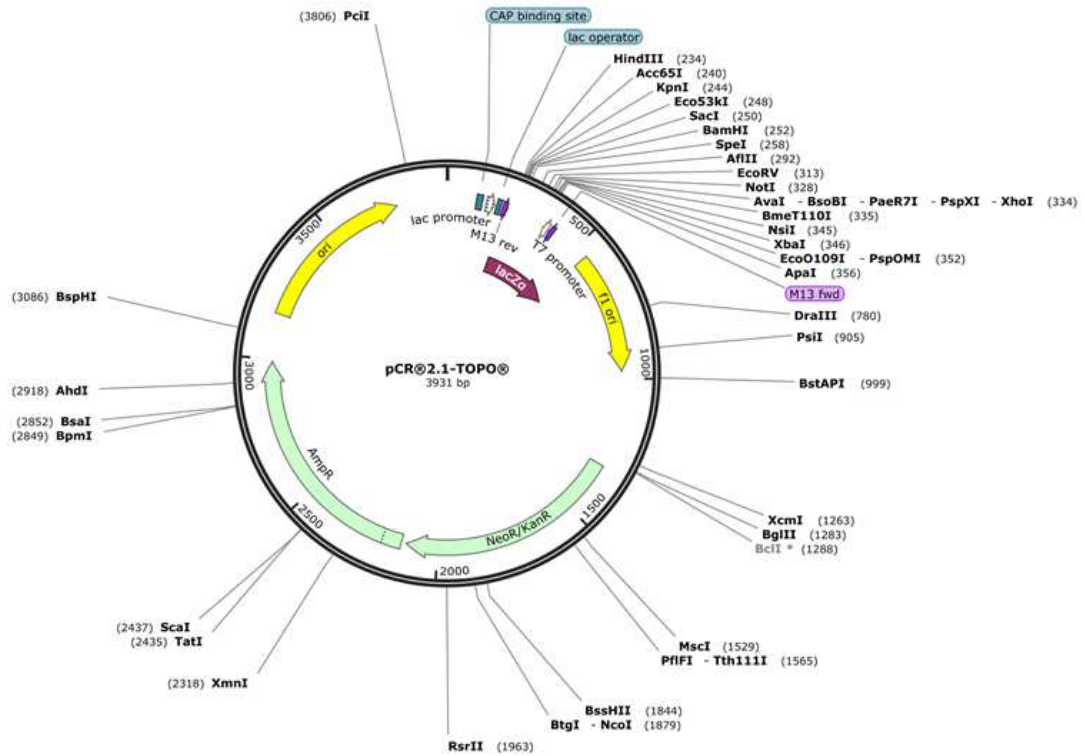
<i>Forward / Reverso (μM)</i>			
900/900	900/300	900/100	900/50
300/900	300/300	300/100	300/50
100/900	100/300	100/100	100/50
50/900	50/300	50/100	50/50

5.4.3 Controles positivos utilizados nas reações de qPCR

Os controles positivos utilizados no estudo eram plasmídeos ou sequências sintéticas contendo as sequencias virais alvo dos *primers*. Os plasmídeos e as sequências sintéticas foram construídas por estudos prévios do grupo de pesquisa e mantidas em estoque linearizadas a -20°C.

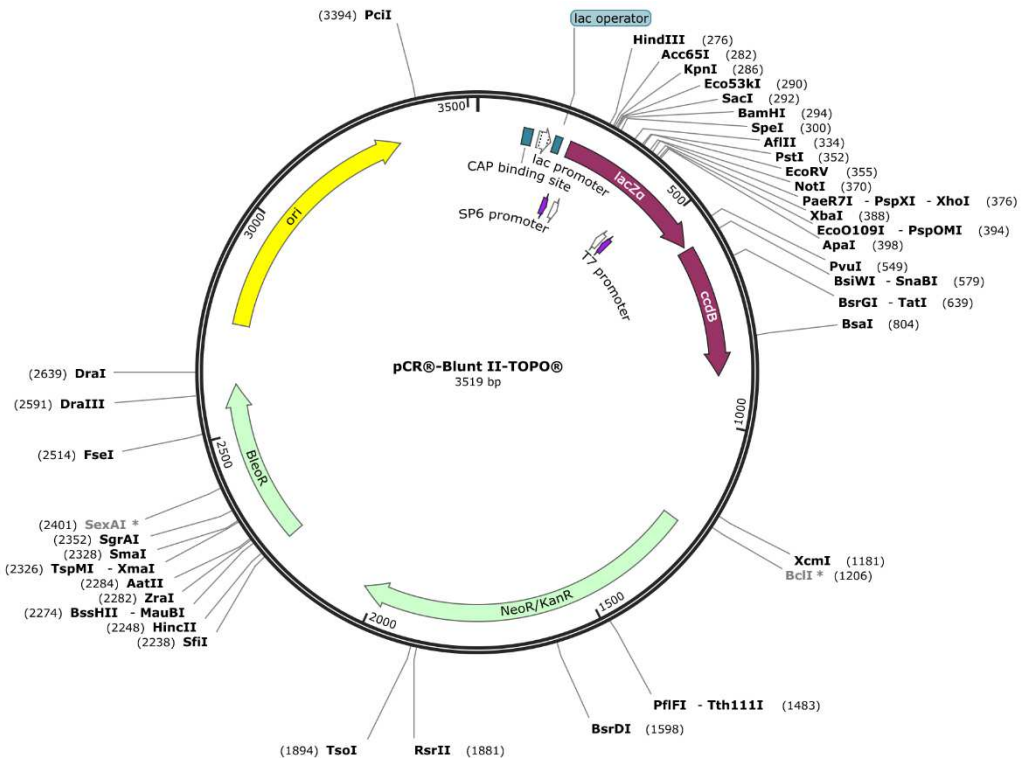
As Figuras 7, 8 e 9 mostram estruturas dos plasmídeos utilizados para inserção das sequencias virais. Os detalhamentos de cada alvo estão presentes na Tabela 4. Os plasmídeos em estoque, já haviam sido linearizados com a enzima de restrição EcoRV, que não cliva nenhuma das sequências alvo. As sequencias sintéticas já são, em sua origem, lineares (*String DNA Fragment*© 2021 Invitrogen).

Figura 7 – Representação do plasmídeo TOPO 2.1©



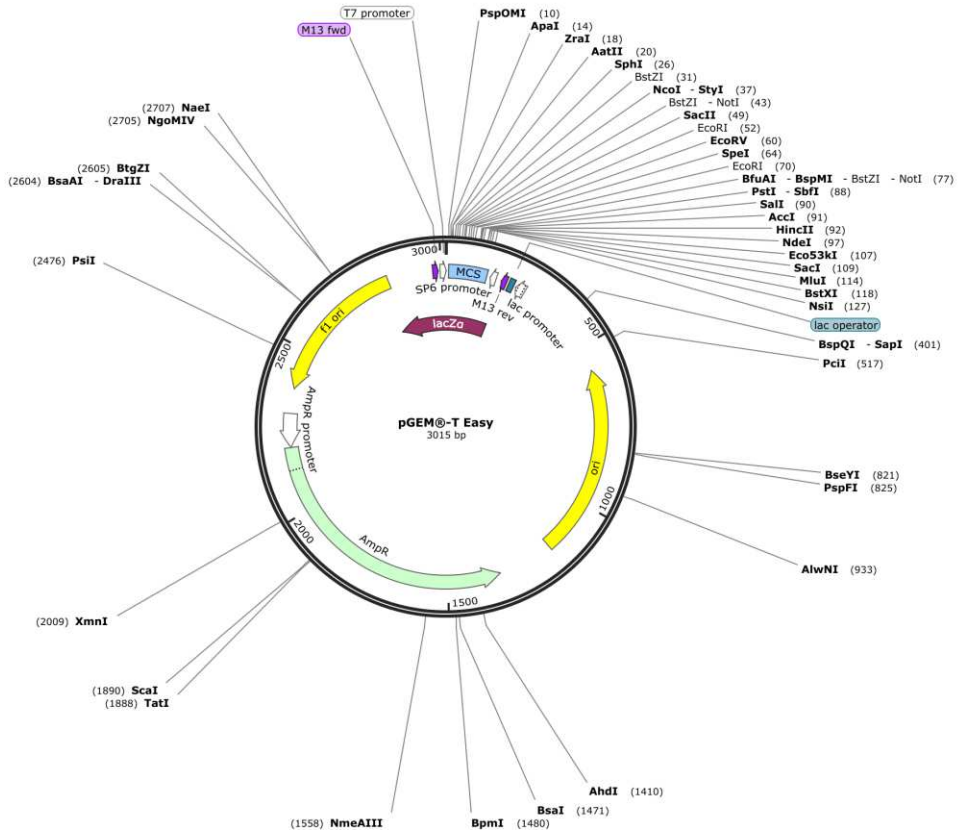
Fonte: SNAPGENE, 2021 (<http://snapgene.com>)

Figura 8 – Representação do plasmídeo BLUNT II TOPO ©



Fonte: SNAPGENE, 2021 (<http://snapgene.com>)

Figura 9 – Representação do plasmídeo PGEM-T Easy©



Fonte: SNAPGENE, 2021 (<http://snapgene.com>)

Tabela 4 – Detalhamentos dos controles positivos utilizados para as reações de PCR

Vírus	Inserto	Vetor	Tamanho Vetor + Inserto
HSV 1/2	292 pb	PGEM-T Easy ⁽¹⁾	3.307 pb
VZV	304 pb	TOPO 2.1 ⁽²⁾	4.235 pb
EBV	210 pb	TOPO 2.1 ⁽²⁾	4.141 pb
CMV	254 pb	TOPO 2.1 ⁽²⁾	4.185 pb
HHV-6 A/B	183 pb	PGEM-T Easy ⁽¹⁾	3.198 pb
HHV-7	319 pb	TOPO 2.1 ⁽²⁾	4.250 pb
ADV	140 pb	TOPO 2.1 ⁽²⁾	4.071 pb
JCV	140 pb	Sintético ⁽³⁾	N/A
ENTV	120 pb	Sintético ⁽³⁾	N/A
DENV	258 pb	TOPO 2.1 ⁽²⁾	4.189 pb
ZIKV	192 pb	Sintético ⁽³⁾	N/A
CHIKV	126 pb	BLUNT II TOPO ⁽⁴⁾	3.645 pb

ADV: Adenovírus; CHIKV: Chikungunya vírus; CMV: Citomegalovírus; DENV: Dengue vírus; EBV: Epstein Barr vírus; ENTV: Enterovírus; HSV-1/2: Herpes Simples Vírus 1 e 2; HHV-6: Herpesvírus Humano-6 A/B; HHV-7: Herpesvírus Humano-7; JCV: John Cunningham vírus; VZV: Vacicela-Zoster vírus; ZIKV: Zika vírus. N/A: Não Aplicável.

⁽¹⁾ - PGEM-T Easy© 2021 Promega Corporation.

⁽²⁾ - TOPO 2.1© 2021 Thermo Fisher Scientific.

⁽³⁾ - *String DNA Fragment*© 2021 Invitrogen.

⁽⁴⁾ - BLUNT II TOPO © 2021

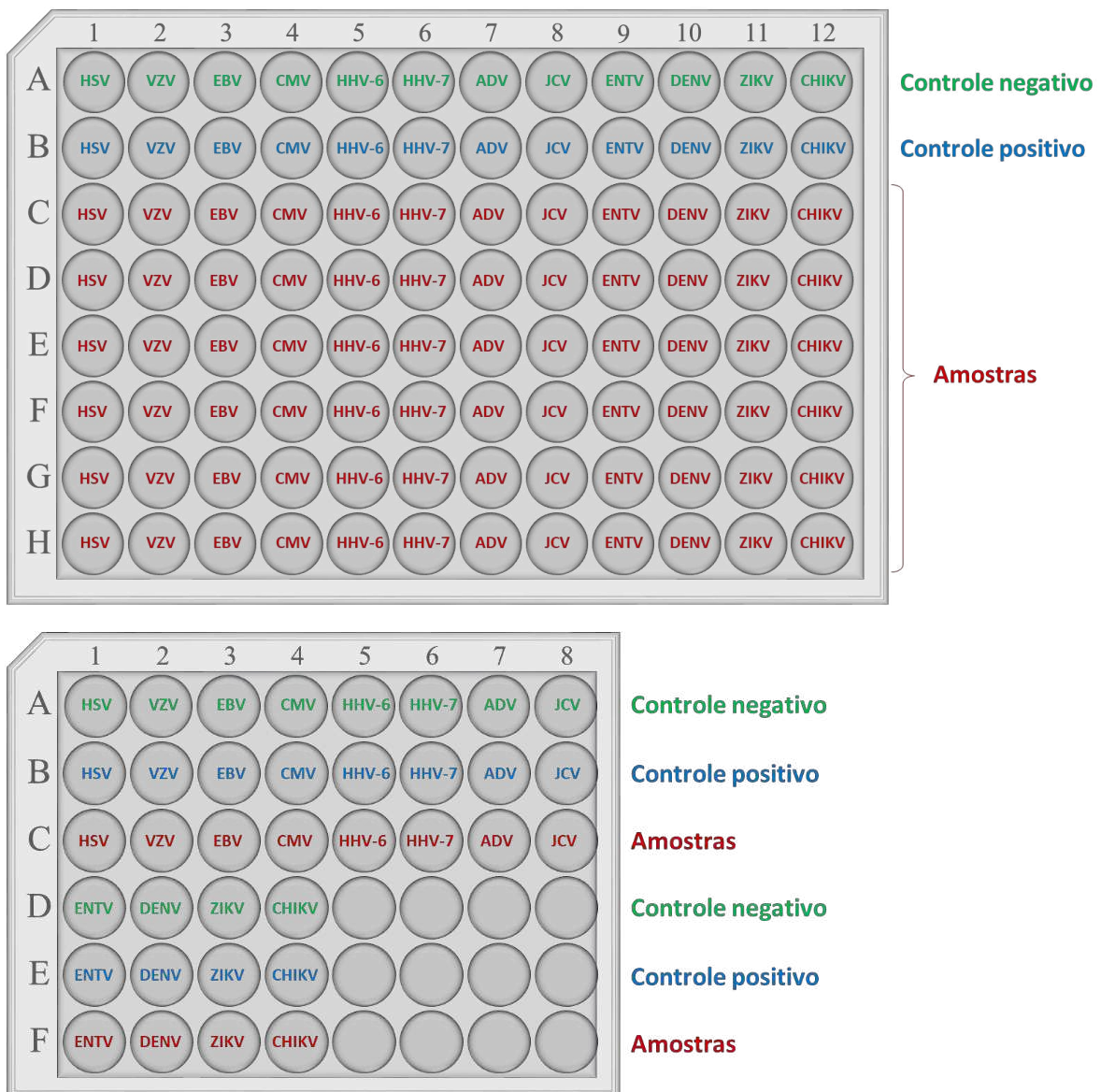
5.4.4 Reação de qPCR em formato de “mini-arranjo”

As reações foram realizadas usando o protocolo de detecção SYBR® Green no equipamento de qPCR StepOne™ ou StepOne™ PLUS (Life Technologies, Carlsbad, Califórnia, EUA). Cada mistura de PCR consistiu de 0,5 µL de *primers* (TAB. 2), 1 µL de amostra (DNA ou cDNA) ou controle negativo (água livre de DNA/RNase) ou controle positivo (TAB. 4), 2,5 µl mistura principal SYBR® Green (2x) e água livre de nuclease para um volume final de 5 µL de reação. Cada reação foi realizada em placas de 48 ou 96 poços ou, ainda, em tiras de 8 tubos.

Os formatos das reações foram desenhados para que fossem aplicados arranjos de poços padronizados e em volume de reação de PCR reduzido (“*low profile*”). Para tal, placas de 48, 96 poços ou tiras de tubos de 8 poços de 0,1 mL foram arranjadas conforme os esquemas

abaixo (FIG 10). Para as tiras de 8 poços, foi utilizada a mesma distribuição das placas de 48 poços com exceção que os controles negativos e positivos dos vírus de RNA foram aplicadas na mesma tira. As reações foram realizadas com misturas de reações pré-preparadas e distribuídas em volume de 4 µL de cada mistura nos poços em posições padronizadas.

Figura 10 – Distribuição de misturas de reação em formato de “miniarranjo” em placa de PCR de 96 e 48 poços “low profile”.



Elaborado pelo próprio autor. ADV: Adenovírus; CHIKV: Chikungunya vírus; CMV: Citomegalovírus; DENV: Dengue vírus; EBV: Epstein Barr vírus; ENTV: Enterovírus; HSV: Herpes Simples Vírus 1 e 2; HHV-6: Herpesvírus Humano-6 A/B; HHV-7: Herpesvírus Humano-7; JCV: John Cunningham vírus; VZV: Vacicela-Zoster vírus; ZIKV: Zika vírus.

Primeiramente as reações foram realizadas em formato qualitativo para todos os vírus. Controle negativo, controles positivos e amostras foram aplicadas em volume de 1 μL . As placas foram seladas ou, os tubos de 8 poços foram vedados com as tiras específicas. Todas etapas de preparação das misturas e aplicação nas placas foram realizadas sobre gelo picado.

As condições de reação foram: desnaturação inicial e ativação enzimática por 10 minutos a 94°C , seguido por 40 ciclos de 15 segundos a 94°C para desnaturação, 15 segundos a 57°C para anelamento de *primers*, e 72°C por 1 minuto para extensão e coleta de fluorescência. As curvas de dissociação foram realizadas de forma automática pelo equipamento após o término da reação.

As análises das reações foram realizadas usando o software StepOne® Software Version 2.3 (Life Technologies, Carlsbad, Califórnia, EUA).

Para os herpesvírus e ADV, foi determinado a carga viral através da mesma técnica descrita acima. Foram utilizadas curvas-padrão de plasmídios em concentrações conhecidas como referência para cálculo das cargas virais nas amostras. As curvas-padrão foram construídas por diluição dos plasmídios em concentrações de 1.000.000, 100.000, 10.000, 1.000 e 100 cópias / μL . Após o cálculo de número de cópias / μL na amostra, o resultado final foi calculado dividindo-se o valor por 4 (200 μL de líquido foi concentrado para 50 μL na extração de ácido nucleico) e multiplicado por 1.000 para se obter o número de cópias /mL de líquido.

5.5 PCR convencional e eletroforese em gel de agarose

As amostras positivas para ZIKV foram reamplificadas por PCR convencional para confirmação do tamanho de fragmento devido à alta frequência de detecção deste vírus no presente estudo. Para tal, 1 μL do produto de qPCR foi diluído em água ultrapura 1:10 e 1 μL desta diluição foi utilizado como amostra para o segundo PCR. As reações foram realizadas usando o protocolo de PCR convencional com reagente GoTaq® DNA Polymerase PCR Reagentes (Promega, WI, EUA) no equipamento termociclador (AmpliTherm, Thermal Cycler, Madison, WI, USA). Cada mistura de PCR consistiu de 1 μL de cada *primer* (os mesmos utilizados para o qPCR), 1 μL de tampão FlexiBuffer, 1 μL de MgCl_2 , 0,2 μL de DNTP Mix, 0,05 μL de GoTaq Polimerase, 1 μL de *PCR Enhancer* (Invitrogen®, Life Technologies, CA, USA) 1 μL de amostra ou controle positivo ou controle negativo (água ultrapura) e ajustado para um volume final de reação de 10 μL com água livre de nuclease. Cada reação foi realizada em tubos plásticos de 0,2 mL.

As condições de reação foram: desnaturação inicial e ativação enzimática por 2 minutos a 95°C, seguido por 40 ciclos de 30 segundos a 95°C para desnaturação, 15 segundos a 57°C para anelamento de *primers*, e 72°C por 1 minuto e, extensão final 5 minutos a 72°C.

Os produtos do segundo PCR foram submetidos a eletroforese em gel de agarose 2% em tampão Tris-Acetato a 100V por 1 hora e observados em transiluminador UV após coloração com brometo de etídio.

5.6 Pesquisa de SARS-CoV-2

Nas amostras coletadas durante os anos de 2020 e 2021 também foram realizados testes para pesquisa do vírus *SARS-CoV-2*, utilizando o protocolo de detecção do Centers for Disease Control and Prevention (CDC 2019-Novel Coronavirus 2019-nCoV Real-Time-PCR Diagnostic Panel). As análises foram realizadas no Laboratório Escola de Análises Clínicas da UFMJM pelo grupo de trabalho de diagnóstico molecular de COVID-19.

O protocolo do CDC detecta 2 regiões do gene do Nucleocapsídeo (N) do vírus (regiões N1 e N2), além de utilizar um controle interno endógeno que detecta o gene da RNase P humana. O método utiliza o sistema Taqman com sondas contendo fluoróforos FAM. As reações foram preparadas seguindo a Tabela 5.

Tabela 5 – Preparação do *mix* para qPCR para pesquisa de SARS-CoV-2

Reagente	Tubo N1	Tubo N2	Tubo RP
GOTaq Master mix	R x 10 µl	R x 10 µl	R x 10 µl
Água livre de DNase e RNase	R x 3,1 µl	R x 3,1 µl	R x 3,1 µl
Primer/sonda	R x 1,5 µl	R x 1,5 µl	-
Primer p/ RNase P	-	-	R x 1,5 µl
Enzima (GOScript)	R x 0,4 µl	R x 0,4 µl	R x 0,4 µl
Volume total	R x 15 µl	R x 15 µl	R x 15 µl

* R = número de reações

Os mixes preparados foram colocados em placas de 96 poços (15µL em cada poço) e misturados a 5µL das amostras. O controle negativo consistiu de água livre de DNase/RNase e o controle positivo utilizado foi um pool de amostras virais sabidamente positivas para *SARS-CoV-2* preparadas pelo laboratório. A reação ocorreu de acordo com as seguintes condições: transcrição reversa a 45°C por 15 min, inativação da transcriptase reversa e ativação da GO®Taq DNA-polimerase a 95 °C por 2 min, seguidos por 45 ciclos de 15 s para desnaturação,

e 1min a 60°C para anelamento dos *primers* e extensão, com posterior coleta de fluorescência pelo equipamento de qPCR StepOne™ PLUS (Life Technologies, Carlsbad, Califórnia, EUA).

5.7 Análise estatística

A estatística descritiva de frequência, tendência central (média e mediana), coeficiente de variação e de conjunto (diagrama de Venn) foram utilizados para expressar o perfil de detecção dos agentes virais. Teste exato de Fisher ou Qui-Quadrado foram utilizados para averiguar correlação entre as variáveis categóricas. Determinação do risco relativo foi calculado para investigar a correlação entre infecção por vírus ADV, ZIKV e ENT e reativação de vírus que potencialmente causam latência.

O coeficiente de correlação de Spearman e Análise de Regressão Linear foram utilizados para analisar a correlação entre o número de casos mensais de ZIKV detectados neste estudo em comparação com o número de casos confirmados no mesmo mês e publicados pelo SINAN.

O nível de significância adotado foi $\alpha=0,05$ para todas as variáveis investigadas. Para a análise estatística dos dados, foi utilizado o programa GraphPad Prism para Windows versão 5.0.

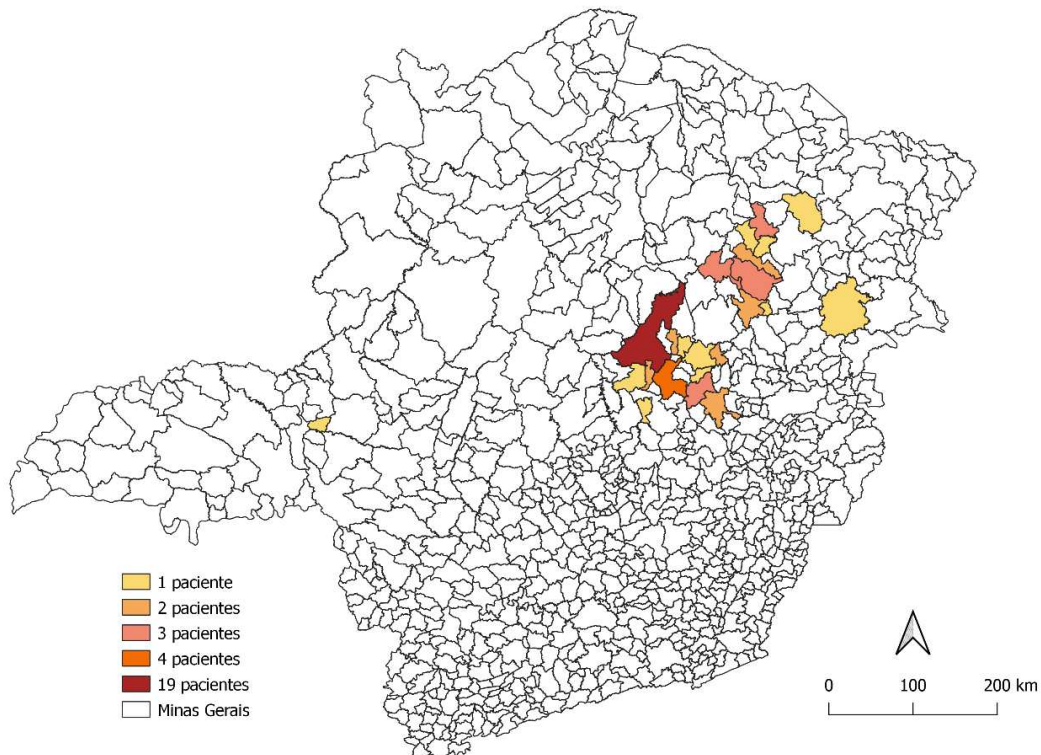
6 RESULTADOS

6.1 Caracterização da população estudada

Um total de 73 pacientes foram incluídos neste estudo. Uma amostra de LCR para cada paciente foi analisada. As coletas foram realizadas por punção lombar de pacientes do serviço de neurologia/neurocirurgia da Santa Casa de Caridade de Diamantina-MG no período de janeiro de 2019 a julho de 2021. Dos 73 pacientes, 41 foram atendidos em 2019, 27 em 2020 e 5 em 2021. A idade média dos pacientes foi de 51 anos (16 a 86 anos), 42 (57,5%) eram do sexo masculino e 31 (42,5%) do sexo feminino.

A Figura 11 mostra a distribuição dos pacientes por município de residência. Foram atendidos pacientes de 25 municípios de Minas Gerais, sendo 22 pertencentes à Macrorregional de Saúde do Jequitinhonha. Três pacientes foram provenientes de outras Regionais de Saúde: Itinga (Gerência Regional de Saúde - Pedra Azul), Teófilo Otoni (Superintendência Regional de Saúde - Teófilo Otoni) e Iraí de Minas (Superintendência Regional de Saúde - Uberlândia). O município com maior número de pacientes atendidos foi Diamantina (26%).

Figura 11 – Distribuição de pacientes do estudo por município de residência.



Fonte: IBGE. Elaborado pelo próprio autor, 2021.

6.2 Detecção molecular de agentes etiológicos no LCR

As amostras de LCR foram analisadas em uma plataforma de reação de qPCR para pesquisa dos seguintes vírus: HSV-1/2, VZV, EBV, CMV, HHV-6 A/B, HHV-7, ADV, JCV, ENTV, DENV, ZIKV e CHIKV. Foram identificadas infecções virais em 39 amostras, correspondendo a um índice de positividade de 53,42%. Os dados gerais estão exibidos na Tabela 6.

Houve maior número de casos de ZIKV 27/73 (36,99%), seguido por CMV 5/73 (6,85%), EBV 4/73 (5,48%), HHV-6 A/B 4/73 (5,48%), ADV 4/73 (5,48%) e ENTV 4/73 (5,48%), HHV-7 3/73 (4,11%), HSV-1/2 e JCV 2/73 (2,74%) (TAB. 7). Os vírus VZV, DENV, CHIKV e também o SARS-CoV-2 não foram detectados em nenhuma das amostras analisadas. O ZIKV foi identificado em 27/39 (69,23%) das amostras positivas. Das 27 amostras positivas para ZIKV, 19 (70,37%) tiveram esse vírus como o único patógeno identificado.

Além disso, foram detectados 9 casos de coinfeção entre o ZIKV, ADV, ENTV e os vírus da família *Herpesviridae* (FIG. 12).

Tabela 6 – Características gerais das amostras de LCR positivas para vírus pela plataforma de qPCR e dados clínicos dos pacientes

Código#	Data da coleta	Idade	Sexo	Município	Vírus Encontrados	Outros Patógenos	Diagnóstico	Febre	Comorbidade
ENC 4*	17/02/2019	54	F	Serro	HSV-1/2, HHV-6, ENTV	<i>Toxoplasma gondii</i>	Neurotoxoplasmose	Sim	HIV
ENC 5	27/02/2019	25	F	Guanhães	HHV-7	-	Meningite herpética	Sim	-
ENC 8	12/03/2019	24	M	Carbonita	ZIKV	<i>Cryptococcus neoformans</i>	Neurocriptococose	Sim	HIV
ENC 17	05/04/2019	78	F	Diamantina	ENTV	-	Doença Desmielinizante	Não	-
ENC 20	30/04/2019	47	F	Chapada do Norte	EBV	-	Neuromielite optica	Não	-
ENC 23	15/05/2019	74	F	Felício dos Santos	ENTV	-	Infecção com foco no sistema urinário	Sim	-
ENC25	28/05/2019	42	M	Coluna	HHV-6	-	Neurocitomegalovírus	Não	Esclerose múltipla
ENC 28	07/06/2019	69	M	São Gonçalo do Rio Preto	EBV, ADV, ZIKV	-	Neurossífilis	Não	-
ENC 30	12/06/2019	30	F	Diamantina	ZIKV	-	Hipertensão intracraniana idiopática	Não	-
ENC 31	13/06/2019	70	F	Diamantina	CMV, ZIKV	-	Neurocriptococose	Não	-
ENC 47	12/09/2019	49	M	Capelinha	ZIKV	-	Crise convulsiva	Não	-
ENC 50*	17/09/2019	54	M	Serro	ZIKV	-	Neurocriptococose	Sim	-
ENC 51	07/10/2019	42	F	Coronel Murta	ZIKV	-	Cadasil	Não	-

(continua)**(continuação)**

Código#	Data da coleta	Idade	Sexo	Município	Vírus Encontrados	Outros Patógenos	Diagnóstico	Febre	Comorbidade
ENC 52	22/10/2019		M	ND	HHV-6, ZIKV	ND	ND	ND	ND
ENC 53*	07/01/2020	63	M	Serro	ZIKV	-	Doença Renal Crônica	Não	Doença Renal Crônica
ENC 54	09/01/2020	85	M	Angelândia	ZIKV	-	Paraplesia Flácida Aguda	Não	Neoplasia maligna
ENC 55	30/01/2020	44	F	Diamantina	EBV	-	Meningite	Sim	-
ENC 56	14/02/2020	48	M	Iraí de Minas	ZIKV	-	Polineuropatia periférica	Não	-
ENC 57	21/02/2020	81	F	Chapada do Norte	ZIKV	-	Sepse	Não	-
ENC 58	05/03/2020	34	M	Diamantina	ZIKV	-	Encefalite viral	Não	-
ENC 59	01/04/2020	47	M	Coronel Murta	CMV	-	Síndrome de Guillain-Barré	Não	-
ENC 63	11/04/2020	65	M	Coronel Murta	ZIKV	-	Síndrome de Guillain-Barré	Não	-
ENC 64*	13/04/2020	67	F	Diamantina	ADV	-	Síndrome paraneoplásica	Não	Neoplasia maligna
ENC 65	14/05/2020	62	M	Turmalina	ZIKV	-	Encefalite viral	Não	Doença Renal Crônica
ENC 66	24/05/2020	31	F	Diamantina	ZIKV	-	Hipertensão intracraniana idiopática	Não	-
ENC 67	29/05/2020	39	M	Diamantina	ZIKV	-	Neuropatia óptica bilateral	Não	-
ENC 69*	09/07/2020	68	F	Diamantina	HHV-7, ZIKV	-	Schwannoma/nefropatia/glaucoma	Não	Lupus Eritematoso Sistêmico
ENC 70	21/07/2020		F	ND	ZIKV	ND	ND	ND	ND

(continua)

(continuação)

Código#	Data da coleta	Idade	Sexo	Município	Vírus Encontrados	Outros Patógenos	Diagnóstico	Febre	Comorbidade
ENC 71	01/08/2020	59	F	Minas Novas	HSV-1/2, HHV-7, ADV, ZIKV	-	Meningoencefalite herpética	Sim	-
ENC 72*	03/08/2020	86	M	Virgem da Lapa	ZIKV	-	Síndrome de Guillain-Barré	Não	-
ENC 73*	11/08/2020	76	F	Sabinópolis	ZIKV	-	AVC	Não	-
ENC 74	13/08/2020	80	M	Diamantina	CMV, HHV-6, ZIKV	-	ND	ND	-
ENC 75*	17/08/2020	76	F	Sabinópolis	CMV, ZIKV	-	AVC	Não	-
ENC 77*	10/09/2020	35	F	Capelinha	ZIKV	-	Septicemia não especificada	Não	Lupus Eritematoso Sistêmico
ENC 78	22/06/2020	45	M	Guanhães	ZIKV	Leveduras	Síndrome do encarceramento	Não	-
ENC 80	25/06/2021	49	M	Francisco Badaró	JCV	<i>Listeria sp.</i>	Romboencefalite	Não	-
ENC 82	08/07/2021	57	M	Carbonita	JCV	-	Encefalite viral	Não	-
ENC83	10/07/2021	46	F	Minas Novas	ENTV	-	Encefalite autoimune	Sim	-
ENC 84	19/07/2021	25	F	Conceição do Mato Dentro	EBV, CMV, ADV, ZIKV	-	Acidente Vascular Encefálico	Não	-

Amostras de líquido cefalorraquidiano positivas para vírus (n=39) de pacientes do setor de neurologia da Santa Casa de Caridade de Diamantina, coletadas entre janeiro de 2019 a julho de 2021. Dados clínicos obtidos dos prontuários médicos. ADV: Adenovírus; CMV: Citomegalovírus; EBV: Epstein Barr vírus; ENTV: Enterovírus; HSV-1/2: Herpes Simplex Vírus 1 e 2; HHV-6: Herpesvírus Humano-6 A/B; HHV-7: Herpesvírus Humano-7; LCR: Líquido Cefalorraquidiano; ND: Não disponível; ZIKV: Zika vírus. # Codificação interna do estudo (não permite identificar o paciente). *Óbito.

Tabela 7 – Frequência de detecção de vírus nas amostras de LCR testadas pela plataforma de qPCR.

Vírus	Número de amostras positivas	Percentual (%) do total de amostras (n=73)	Percentual (%) de resultados positivos (n= 39)
ZIKV	27	36,99	69,23
CMV	5	6,85	12,82
ADV	4	5,48	10,26
ENTV	4	5,48	10,26
HHV-6	4	5,48	10,26
EBV	4	5,48	10,26
HHV-7	3	4,11	7,69
HSV 1/2	2	2,74	5,13
JCV	2	2,74	5,13
CHIKV	0	0,00	0,00
DENV	0	0,00	0,00
VZV	0	0,00	0,00
SARS-CoV-2	0	0,00	0,00

Amostras de líquido (n = 73) de pacientes do setor de neurologia da Santa Casa de Caridade de Diamantina, coletadas entre janeiro de 2019 a julho de 2021. ADV: Adenovírus; CHIKV: Chikungunya vírus; CMV: Citomegalovírus; DENV: Dengue vírus; EBV: Epstein Barr vírus; ENTV: Enterovírus; HSV-1/2: Herpes Simplex Vírus 1 e 2; HHV-6: Herpesvírus Humano-6 A/B; HHV-7: Herpesvírus Humano-7; JCV: John Cunningham vírus; SARS-CoV-2: Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavírus 2; VZV: Vacicela-Zoster vírus; ZIKV: Zika vírus.

Figura 12 – Coinfecções virais nas amostras de líquido.

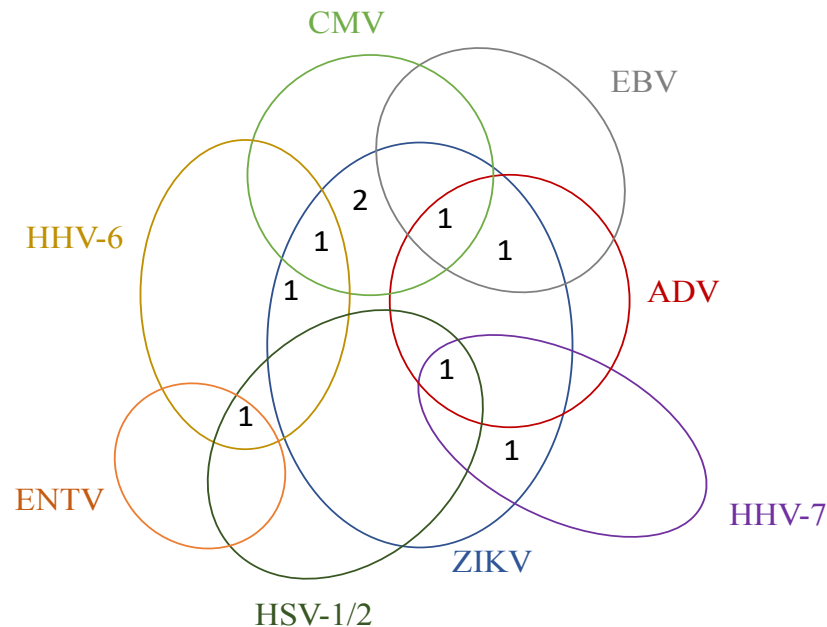


Diagrama de Venn ilustrando as coinfeções entre vírus pesquisados em amostras de líquido de pacientes do setor de neurologia da Santa Casa de Caridade de Diamantina – MG, coletadas entre janeiro de 2019 e julho de 2021. ADV: Adenovírus; CMV: Citomegalovírus; EBV: Epstein Barr vírus; ENTV: Enterovírus; HSV-1/2: Herpes Simples Vírus 1 e 2; HHV-6: Herpesvírus Humano-6 A/B; HHV-7: Herpesvírus Humano-7; ZIKV: Zika vírus.

Houve ainda 4 casos de coinfeção entre vírus e outros patógenos não virais, incluindo *T. gondii*, *C. neoformans*, *Listeria* sp e leveduras (TAB. 8). Não foi observada nenhuma tendência específica de associações entre os patógenos. O caso de neurotoxoplasmose (coinfeção com HSV, HHV-6 e ENTV) e o caso de neurocriptococose (coinfeção com ZIKV) foram associados a pacientes HIV-positivos. O caso de romboencefalite por *Listeria* sp. (coinfeção com JCV) e o caso de levedura não identificada (coinfeção com ZIKV) não foram associados a qualquer quadro imunossupressivo (que tenha sido identificado) (TAB. 6).

Tabela 8 – Distribuição de casos de coinfeção entre vírus e patógenos não virais.

Patógenos	n (%)
<i>T. gondii</i> + HSV/HHV-6/ENTV	1 (25%)
<i>C. neoformans</i> + ZIKV	1 (25%)
<i>Listeria</i> sp + JCV	1 (25%)
Leveduras* + ZIKV	1 (25%)

Coinfecções entre vírus e patógenos não virais em amostras de líquido (n=4) de pacientes atendidos no setor de neurologia da Santa Casa de Caridade de Diamantina no período de janeiro de 2019 a julho de 2021. ENTV: Enterovírus; HSV: Herpes Simples Vírus 1 e 2; HHV-6: Herpesvírus Humano-6 A/B; JCV: John Cunningham vírus; ZIKV: Zika vírus. *Leveduras não identificadas (morfologia não compatível com *Cryptococcus* ou *Paracoccidioides*).

Nos casos em que o ZIKV foi o único patógeno detectado 17/19 (89,47%) os pacientes apresentaram-se afebris. Os casos em que foram detectados qualquer um dos vírus, a febre não foi associada (Teste Exato de Fisher; $p=0,77$), mesmo após a exclusão dos casos em que foi detectado unicamente o ZIKV (Teste Exato de Fisher; $p=0,32$).

Não houve associação, estatisticamente significativa, entre a detecção do ZIKV e a ocorrência da síndrome de Guillain-Barré (Teste Qui-Quadrado; $p=0,94$). O CMV também não foi associado à mesma síndrome (Teste Qui-Quadrado com Correção de Yates; $p=0,97$). De sete casos de Síndrome de Guillain-Barré, 4 (57,14%) não foram associados a qualquer patógeno investigado detectado ao tempo da coleta do líquido.

A detecção de vírus não foi associada aos casos de óbito 9/14 (64,28%) (Teste Exato de Fisher $p=0,39$) (TAB. 6).

6.3 Parâmetros bioquímicos e citológicos das amostras positivas para vírus

Por meio da análise de rotina do líquido verificou-se os parâmetros físicos das amostras estavam em conformidade com a normalidade, sem alterações importantes.

Na Tabela 9 estão incluídos parâmetros bioquímicos e citológicos das amostras positivas para vírus. O valor da mediana da concentração de proteínas no LCR foi de 54 mg/dL (16-196 mg/dL) e a dos leucócitos foi 5 células/mm³ (2-196). Os linfócitos foram o tipo celular predominante nas amostras de todos os pacientes com resultado de qPCR (100% dos casos com contagem de leucócitos totais > 0).

Tabela 9 – Parâmetros bioquímicos e citológicos das amostras com resultado positivo para vírus

	Resultado	Valor de Referência em Adultos*
Proteínas (mg/dL)	Mediana: 67,5 Mínimo: 16,0 Máximo: 194,0	15 a 45
Leucócitos (células/uL)	Mediana: 5,0 Mínimo: 2,0 Máximo: 196,0	0 a 5
Tipo celular predominante	Linfócitos	-

Parâmetros bioquímicos e citológicos das amostras de líquido positivas para pelo menos um dos vírus pesquisados (n = 39) de pacientes atendidos no setor de neurologia da Santa Casa de Caridade de Diamantina – MG entre janeiro de 2019 e julho de 2021 *(STRASINGER, 2014).

6.4 Cargas virais dos herpesvirus e adenovirus

A Tabela 10 mostra o valor das cargas virais dos herpesvírus e do adenovírus nas amostras de LCR dos pacientes. Notoriamente, as cargas virais apresentaram altos coeficientes de variação. Devido ao baixo número de casos de cada vírus detectado, não foi possível investigar a relação entre a carga viral e quadros clínicos particulares. Portanto, pontos de cortes para cargas virais não puderam ser sugeridos.

Tabela 10 – Valores das cargas virais do adenovírus e dos herpesvírus nas amostras de líquido.

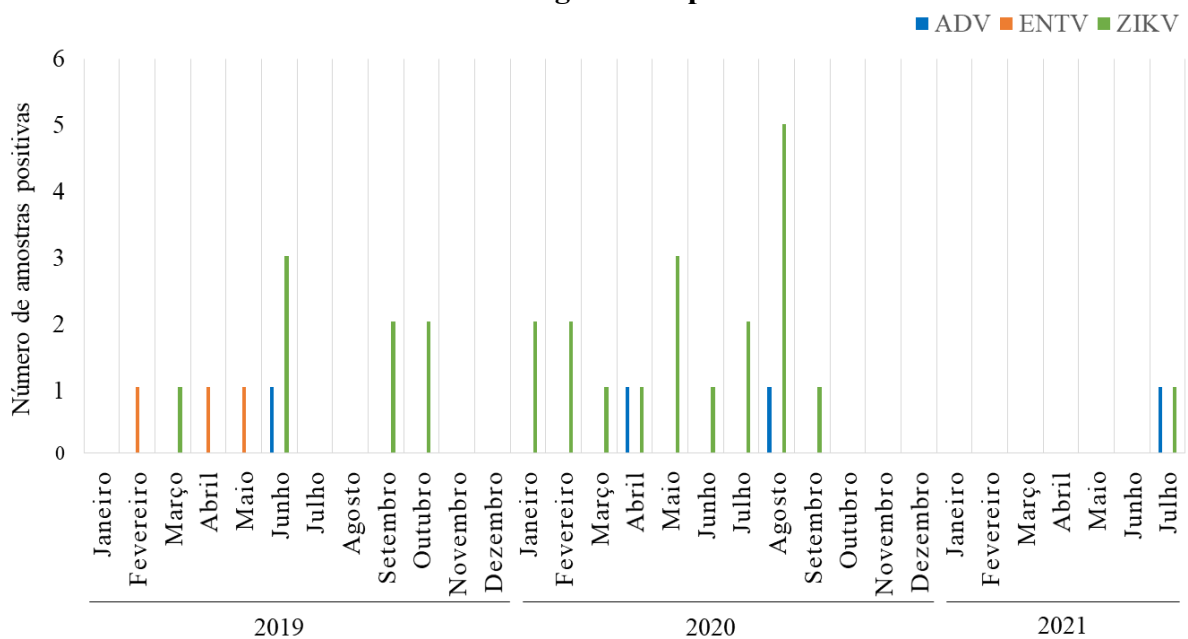
Vírus	Código#	Carga Viral (cópias/mL)	Carga Viral Média (cópias/mL)	Coefficiente de Variação (%)
ADV	ENC 28	1	11	98
	ENC 84	5		
	ENC 64	12		
	ENC 71	25		
CMV	ENC 31	6.511	12.346	34
	ENC 84	10.292		
	ENC 59	13.000		
	ENC 74	14.318		
	ENC 75	17.610		
EBV	ENC 28	243	1.553	104
	ENC 20	1.472		
	ENC 84	2.945		
HHV-6	ENC 52	313	1.538	141
	ENC25	518		
	ENC 74	540		
	ENC 4	4.780		
HHV-7	ENC 71	10.700	15.887	40
	ENC 69	13.969		
	ENC 5	22.993		
HSV-1/2	ENC 4	1.497	3.307.749	141
	ENC 71	6.614.000		

Amostras de líquido de pacientes do setor de neurologia da Santa Casa de Caridade de Diamantina, coletadas entre janeiro de 2019 a julho de 2021. ADV: Adenovírus; CMV: Citomegalovírus; EBV: Epstein Barr vírus; HSV-1/2: Herpes Simples Vírus 1 e 2; HHV-6: Herpesvírus Humano-6 A/B; HHV-7: Herpesvírus Humano-7. # Codificação interna do estudo (não permite identificar o paciente).

6.5 Avaliação da incidência sazonal de ADV, ENTV, DENV, ZIKV e CHIKV

Entre os vírus que não causam latência e possuem presumidamente caráter de incidência sazonal (ADV, ENTV, DENV, ZIKV e CHIKV), observou-se que o ADV foi mais frequente nos períodos de outono (1 caso) e inverno (3 casos) (FIG. 13). Os ENTV foram detectados apenas no primeiro semestre de 2019 e o ZIKV não apresentou evidência clara de incidência sazonal. DENV e CHIKV não foram detectados.

Figura 13 – Distribuição das amostras positivas para ADV, ENTV e ZIKV ao longo do tempo.



Número de amostras de líquor positivas para ADV (Adenovírus), ENTV (Enterovírus) e ZIKV (Zika vírus) em de pacientes do setor de neurologia da Santa Casa de Caridade de Diamantina, distribuídos pelos meses do estudo.

Entre os vírus que não causam latência detectados e, presumidamente, apresentam caráter de incidência sazonal (ADV, ENTV e ZIKV), observou-se correlação significativa entre as infecções por ADV coexistindo com vírus da família *Herpesviridae* (RR = 10,69, IC=1,1 – 95,9) (TAB. 11).

Tabela 11 – Influência da infecção por ADV, ENTV ou ZIKV na detecção de DNA viral de vírus da família *Herpesviridae*.

Vírus	Valor-P	Risco Relativo
ADV	<u>0,03*</u>	<u>10,69</u>
ENTV	1,00	1,29
ZIKV	0,13	1,86

Amostras de líquido de pacientes atendidos no setor de neurologia da Santa Casa de Caridade de Diamantina no período de janeiro de 2019 a julho de 2021. ADV: Adenovírus; ENTV: Enterovírus; ZIKV: Zika vírus. * Teste Exato de Fisher.

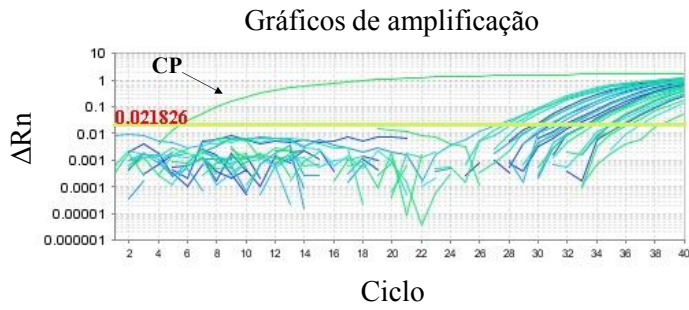
6.5 Análise em PCR convencional para as amostras positivas para ZIKV

Tendo em vista a maior frequência de detecção do ZIKV (69,23 %, TAB. 7) na reação de qPCR em relação aos outros vírus, realizou-se uma etapa adicional de análise dessas amostras por PCR convencional seguido de eletroforese em gel de agarose, para corroborar o resultado encontrado pela plataforma de qPCR em formato de “mini-arranjo”. Também foi realizada por esta técnica a investigação de resultados atípicos de 6 amostras para DENV (curvas de dissociação exibindo pico em região próxima, mas inferior ao pico de dissociação típico observado para os 4 sorotipos de DENV).

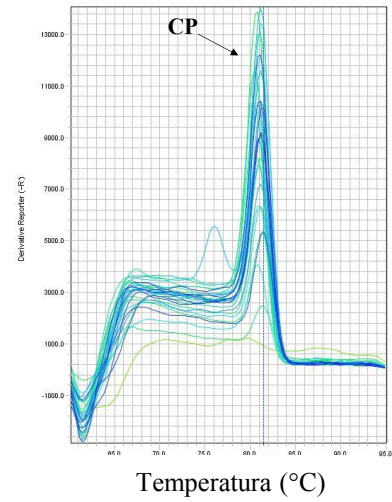
A Figura 14 mostra os gráficos de amplificação e curva de dissociação da reação de qPCR para as 27 amostras positivas para ZIKV e as 6 suspeitas para DENV. O resultado da eletroforese em gel de agarose está apresentado na Figura 15. Para as 27 amostras analisadas, observou-se um padrão de bandas compatível com os tamanhos dos fragmentos esperados para o ZIKV (192pb). Os fragmentos das amostras duvidosas para DENV apresentaram padrão de bandas próximas a 50pb, sendo incompatíveis com o amplificado esperado (258pb).

Figura 14 – Gráficos de amplificação e curva de dissociação das reações de qPCR para ZIKV (A) e DENV (B).

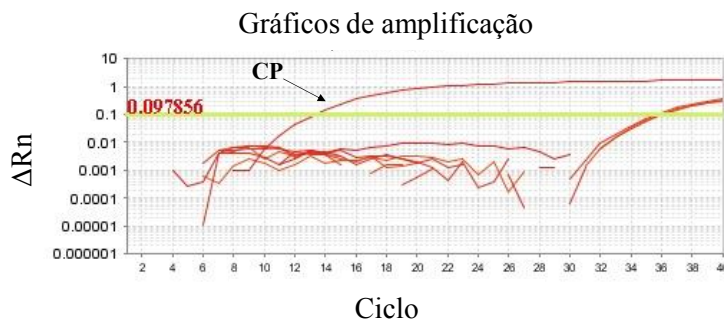
A - ZIKV



Curva de dissociação



B - DENV



Curva de dissociação

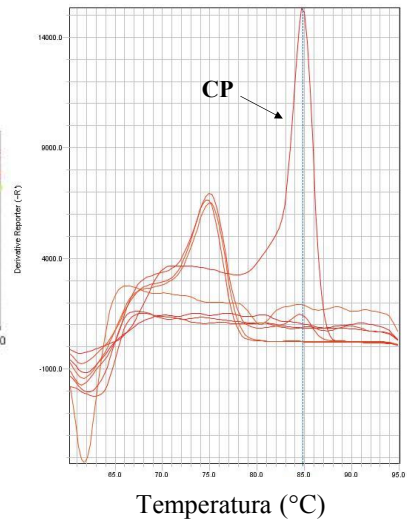
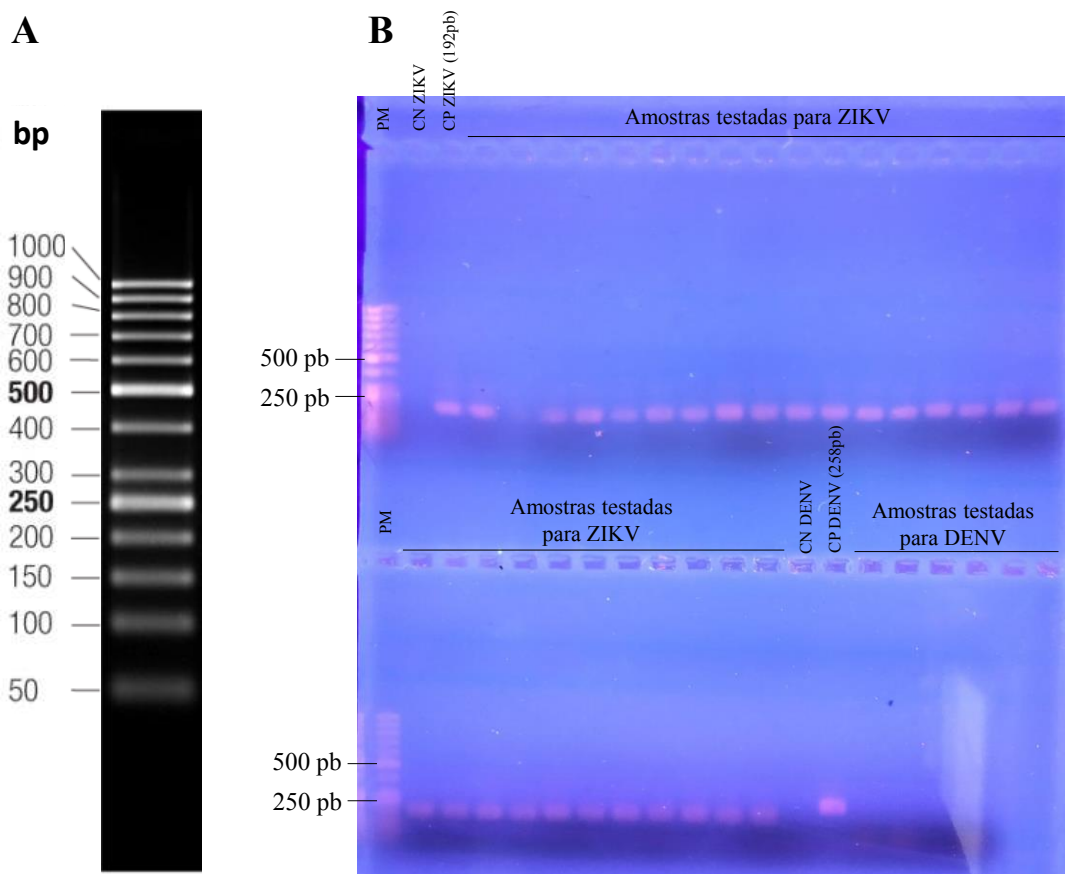


Figura 15 – Eletroforese em gel de agarose

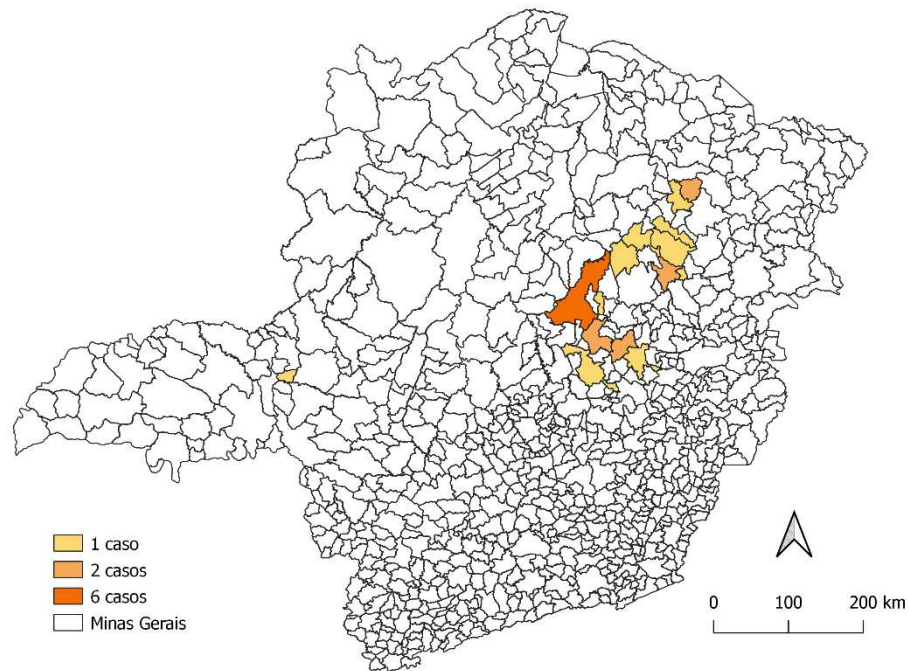


Eletroforese em gel de agarose. Parte superior: 1 – Padrão de Peso molecular, 2 – ZIKV Controle Negativo, 3- ZIKV Controle Positivo (192 pb), 4 a 20 – Amostras testadas para ZIKV (fragmentos \approx 192 pb). Parte inferior: 1 – Padrão de Peso molecular, 2 – 12 Amostras testadas para ZIKV (fragmentos \approx 192 pb).

6.7 Caracterização dos pacientes com amostras positivas para ZIKV

A Figura 16 mostra a distribuição dos pacientes com amostras de líquido positivas para ZIKV por município de residência. Apenas um paciente não era proveniente da Macrorregião de Saúde do Jequitinhonha. O município do Diamantina foi o que apresentou maior número de pacientes com amostras positivas para ZIKV (6 casos). Os pacientes tinham idade média de 56 anos (24-86), sendo 15 (55,6%) do gênero masculino e 12 (44,4%) do gênero feminino.

Figura 16 – Distribuição dos pacientes com amostra de líquido cefalorraquidiano positiva para ZIKV por município de residência.

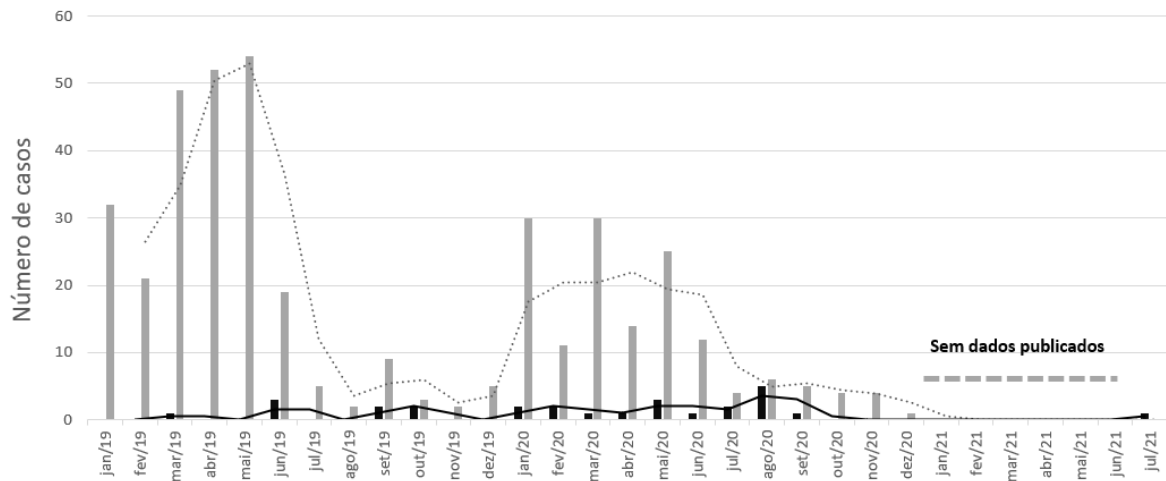


Fonte: IBGE. Elaborado pelo próprio autor.

6.8 Comparação entre o número de amostras positivas para ZIKV e o número de notificações confirmadas da doença no Estado de Minas Gerais, ao longo do tempo

A Figura 17 mostra a distribuição ao longo do tempo do número de amostras positivas para ZIKV neste estudo, bem como do número de casos de ZIKV notificados e confirmados no Estado de Minas Gerais pelo Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN). O gráfico inclui ainda as linhas de média móvel. Observa-se que há casos confirmados no Estado de Minas Gerais em todos os períodos em que foram detectados ZIKV nas amostras deste trabalho. Todavia, a análise de regressão linear ($R^2=0,004145$; $p=0,7308$) e o teste de correlação de *Spearman* ($R=0,3542$; $p=0,05$) não demonstraram associação significativa entre os casos do estudo e aqueles notificados e confirmados no Estado de Minas Gerais.

Figura 17 – Distribuição ao longo do tempo do número casos confirmados de ZIKV no Estado de Minas Gerais e do número de amostras positivas para ZIKV neste estudo



Fonte: SINAN. Elaborado pelo próprio autor. Comparação entre o número amostras positivas para ZIKV neste estudo e o número de casos confirmados de ZIKV no Estado de Minas Gerais, extraído do Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN), ao longo dos meses.

7 DISCUSSÃO

As infecções virais no SNC apresentam distribuição global e são importantes causas de morbidade e mortalidade. Várias espécies de vírus apresentam tropismo pelo SNC e utilizam formas diversas para conseguir penetrar nesse sistema, causando doenças (SOARES *et al.*, 2011).

No Brasil, a pesquisa de agentes etiológicos virais como causadores de infecções no SNC não é realizada como rotina. Na grande maioria dos serviços de saúde é realizado o diagnóstico empírico dessas infecções, não sendo possível obter informações sobre os agentes etiológicos, suas possíveis sazonalidades e regionalidades.

Os testes unificados em um sistema de diagnóstico tornam mais eficiente, econômica e abrangente a identificação de agentes virais (LUTFALLA; UZE, 2006). Neste sentido, uma plataforma em formato de “miniarranjo” foi desenvolvida e aplicada em amostras de LCR coletadas em pacientes internados na Santa Casa de Caridade de Diamantina/MG. A escolha dos alvos foi realizada de forma a incluir os agentes que, classicamente, causam infecções no SNC no mundo, como os herpesvírus e enterovírus, cuja importância epidemiológica para os casos de infecção no SNC no Brasil já foi demonstrada (SOARES *et al.*, 2011; BASTOS *et al.*, 2014; OLSEN *et al.*, 2015;). Também foram selecionados agentes neurotrópicos emergentes, como DENV, CHIKV e ZIKV, que são endêmicos em vários países do mundo e constantemente causam epidemias (ARAÚJO *et al.*, 2012; SOARES *et al.*, 2011; BASTOS *et al.*, 2014).

Tendo em vista a demonstração por vários estudos de que o *SARS-CoV-2* pode infectar ou causar manifestações no SNC (CARDONA *et al.*, 2020; MEINHARDT *et al.*, 2021), as amostras coletadas após o início da pandemia também foram submetidas à pesquisa desse vírus por protocolo de qPCR já estabelecido (CDC, 2020). Porém, não houve detecção de *SARS-CoV-2* em nenhuma das amostras analisadas. Vale ressaltar que, de acordo com os prontuários, somente um dos pacientes do estudo manifestou sintomas respiratórios condizentes com a Síndrome Respiratória Aguda Grave (SRAG), causada por esse vírus. Portanto, embora as amostras tenham sido coletadas em período pandêmico, a infecção pelo *SARS-CoV-2* não era a principal suspeita clínica, que poderia justificar a ausência de resultados positivos para esse vírus.

Foi obtida uma positividade de 53,4% nas amostras analisadas, sendo que a maior parte é de indivíduos imunocompetentes e sem coinfeção com outros agentes. Em 46,6% das

amostras de LCR não foi detectado material genético de nenhum dos vírus pesquisados. Não está excluída a possibilidade de infecção viral nessas amostras negativas. Pode ter ocorrido infecção viral por outro agente etiológico não incluído na plataforma do estudo, ou ainda presença de carga viral abaixo do limite de detecção das técnicas utilizadas neste trabalho.

As análises citológicas e bioquímicas das amostras positivas do estudo mostraram compatibilidade com infecção de etiologia viral: níveis de proteínas dentro dos valores considerados normais ou com ligeiras elevações e uma pleocitose não marcante, com predomínio de células mononucleares.

Estudos semelhantes no Brasil mostraram diferentes índices de positividade para infecções virais no LCR, sendo o ENTV o mais prevalente na maioria dos trabalhos.

Em um estudo realizado no estado do Amazonas em 2014 com 165 amostras de LCR, Bastos *et al.*, obtiveram uma taxa de positividade de 29,7%, sendo o ENTV o mais detectado, estando presente em 32,6% dos casos positivos, seguido por EBV (22,4%), VZV (20,4%) e CMV (18,3%).

Ferreira *et al.* (2019), no estado de São Paulo, não identificaram agente viral em mais de 90% dos casos com suspeita de infecção no SNC nos anos de 2012 e 2013. Neste estudo, os agentes pesquisados foram DENV, SLEV, HSV-1, EBV, CMV, HHV-6, VZV e ENTV, sendo o ENTV o mais encontrado, em 34,6% dos casos positivos.

Mendoza *et al.*, (2007), em um estudo com 200 adultos no ano de 2003 e 2004, na cidade de Ribeirão Preto/SP, obtiveram uma taxa de positividade de 23,34%. Dentre os vírus mais detectados estavam o ENTV (51,1%), CMV (27,9%) e HSV-1 (23,2%).

Em estudos conduzidos em outros países o ENTV também foi o vírus mais frequente. De Ory *et al.*, (2012), em um estudo prospectivo com 581 casos de 17 hospitais na Espanha, relataram, 49,4% de detecção do agente etiológico em casos de meningite, encefalites e meningoencefalite. Os ENTV foram os principais causadores dessas infecções (59,6%), seguidos dos HSV-1/2 (15,9%) e VZV (13,3%). Hasbun *et al.*, (2019) avaliaram a epidemiologia dos agentes virais no SNC em crianças nos Estados Unidos e encontraram o ENTV como o principal causador, sendo responsável por 58,4% dos casos.

Embora os ENTV sejam os agentes etiológicos mais prevalentes na maioria dos estudos que avaliam infecções virais no SNC, no presente trabalho, não foram os mais detectados, estando presente em apenas 5,48% das amostras positivas. Os ENTV são um gênero da família *Picornaviridae* que apresentam distribuição global e número de infecções influenciados pelo clima. Em regiões temperadas, o maior número de casos ocorre no verão e

início do outono (B'KRONG *et al.*, 2018). Nas regiões tropicais e subtropicais, apresentam maior número de casos de julho a setembro, embora haja uma permanência nos outros meses do ano. Sua principal forma de transmissão é via oral-fecal e acometem principalmente em crianças. As medidas de prevenção contra o *SARS-CoV-2* difundidas em todo o mundo durante o período da pandemia (a partir de março de 2020): lavagem frequente das mãos, uso de máscara e álcool em gel, podem ter contribuído para uma diminuição do número de casos de enterovírus, o que poderia justificar a detecção desses vírus apenas no início do presente estudo.

A presença do material genético dos Herpesvírus e do JCV nas amostras de líquido dos pacientes, provavelmente, está relacionada à reativação desses vírus no organismo. A soroprevalência destes vírus na população em geral é alta e, portanto, infecção primária é menos provável. Embora apenas 2 dos 14 pacientes cujas amostras testaram positivo para algum vírus da família Herpesvírus possuíssem condições imunossupressoras (HIV e Lupus), diversos outros fatores, tais como doenças crônicas, condições de estresse e até mesmo internação em unidade de terapia intensiva podem ter contribuído para a retomada dos seus ciclos replicativos (KHALILI *et al.*, 2007).

Embora Minas Gerais seja uma região endêmica para o DENV, não houve nenhuma amostra positiva para esse vírus neste estudo. De forma semelhante, Säll *et al.*, (2019) também não encontraram DENV em amostras de líquido em uma região endêmica para esse vírus no Nepal. Porém, De Oliveira *et al.*, (2017) e Soares *et al.*, (2011) encontraram 11,7 % e 10 % de amostras de líquido positivas para DENV de crianças e de adultos, respectivamente, em regiões endêmicas.

Assim como para DENV, nenhum caso de CHIKV ou VZV foi detectado em nosso estudo. O primeiro caso de encefalite devido ao CHIKV no Brasil foi descrito por Bandeira *et al.* em 2016. Embora complicações neurológicas causadas por este vírus sejam raras, sua pesquisa como possível agente de infecção no SNC tem ganhado uma grande importância, devido ao aumento de circulação desse vírus. Evangelista *et al.* (2021), em um estudo com 149 pacientes de um hospital de referência para doenças infecciosas na cidade de Salvador, na Bahia, identificaram o CHIKV em apenas 1,34% das amostras.

Já o VZV causa uma grande variedade de infecções no SNC, incluindo meningite, encefalite, meningoencefalite, mielite e cerebelite. Nos adultos, a maioria das infecções no SNC são causadas por reativação do VZV devido, principalmente, a situações imunossupressoras. A frequência do vírus está diretamente relacionada ao status vacinal da população (STUDAHL, 2013). Esses fatores podem ter influenciado a negatividade para o VZV

em nosso trabalho. Além disso, outros estudos apresentaram baixa taxa de positividade para o VZV no SNC, variando de 0,5 a 11,2% (GRAHN, 2015).

No presente trabalho, também foi observada uma baixa taxa de detecção do ADV (TAB.7), sempre com baixa carga viral (TAB.10). Tal fato pode ser justificado pela pesquisa do vírus em amostras de líquido de adultos em sua maioria imunocompetentes, uma vez que as infecções por ADV acometem principalmente crianças e pessoas com imunossupressão. É um vírus sazonal, com a maioria dos casos ocorrendo no inverno ou no início da primavera. Este vírus infecta principalmente o trato respiratório superior ou inferior, faringe, conjuntiva ou trato gastrointestinal (LYNCH *et al.*, 2011) e raramente possuem, como foco primário, o SNC. Meningite causada por ADV foi identificada como complicação de pneumonia em indivíduos imunocomprometidos (STUDAHL *et al.*, 1998). Belsy *et al.* (2009) reportaram casos de cerebelite e meningite em crianças inicialmente diagnosticadas com infecção de foco respiratório causadas por ADV.

Foram detectados 9 casos de coinfeção entre vírus e 4 casos de coinfeção de vírus com outros patógenos. Beadling (2004) sugere que as infecções virais causem estresse na resposta imune do hospedeiro, tornando o paciente mais susceptível a infecções secundárias a outros agentes. A detecção de coinfeções é um paradigma microbiológico e imunológico, pois ainda é desconhecido a importância de cada patógeno para a doença e a participação de cada um dos agentes na neuroinvasão. Não é possível determinar qual agente facilita a entrada do outro no SNC, qual é o primeiro que consegue quebrar o equilíbrio fisiológico da barreira hematoencefálica. Ainda não existem respostas claras para estes questionamentos, mas o conhecimento de quais agentes estão envolvidos em coinfeções pode ajudar no estudo da fisiopatologia da doença (OLIVEIRA, 2015). Esses dados reforçam a importância de testes de diagnóstico focados na detecção de múltiplos agentes.

Entre os vírus que foram detectados que não causam latência e, presumidamente, apresentam caráter de incidência sazonal (ADV, ENTV e ZIKV), observou-se correlação significativa entre as infecções por ADV e vírus da família *Herpesviridae* (coinfeção).

Dos pacientes com coinfeção, 2 eram sabidamente HIV-positivos. Um deles teve o óbito como desfecho clínico. Outro paciente possuía Lúpus Eritematoso sistêmico. Para os demais casos de coinfeção não havia informações precisas sobre comorbidades nos prontuários analisados.

O ZIKV foi detectado em 69,23% das amostras positivas (TAB. 7), sendo o vírus com mais alta taxa de detecção deste trabalho. No entanto, de acordo com os prontuários

analisados, em nenhum dos pacientes positivos para ZIKV, a suspeita principal era infecção por arboviroses.

O índice de positividade para ZIKV em amostras de líquido tem-se mostrado variável em diferentes trabalhos: Da Silva *et al* (2017), em um estudo com adultos na cidade do Rio de Janeiro, entre os meses de dezembro de 2015 e maio de 2016 obtiveram 88% de evidência sorológica e/ou molecular no líquido ou soro de pacientes com suspeita de infecção neurológica por ZIKV. Evangelista *et al* (2021) na cidade de Salvador, na Bahia, encontraram ZIKV no líquido de 13,34 % de pacientes adultos admitidos em um hospital de referência.

Durante o período do estudo foram notificados 4.590 casos de ZIKV em Minas Gerais: 3.223 em 2019 e 1.367 em 2020 (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2021). Do total de casos notificados, 399 (8,69%) foram confirmados, 253 (7,84%) em 2019 e 146 (10,68%) em 2020 (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2021). Não foi demonstrada associação significativa entre as o número de notificações confirmadas e as detecções em nosso estudo. Vale ressaltar que o presente trabalho avaliou somente amostras de líquido, enquanto as notificações e confirmações incluem outros critérios. Contudo, há casos confirmados em todos os períodos em que foram detectados o ZIKV no líquido.

A infecção pelo ZIKV durante a gravidez pode levar ao desenvolvimento de microcefalia em fetos. Em alguns casos pode afetar o SNC, causando a Síndrome de Guillain-Barré e outras complicações neurológicas como a mielite transversal e meningite (EVANGELISTA, 2021). A infecção por ZIKV também tem sido associada a outras condições como convulsão (WIWANITKIT, 2017) e acidente vascular cerebral (BRITO FERREIRA *et al*, 2020).

Os achados laboratoriais e de imagem para as infecções por ZIKV e para os arbovírus de uma forma geral, podem ser inespecíficos ou normais em grande parte dos casos (WASAY, 2015).

Estudos recentes têm mostrado a persistência de RNA do ZIKV em amostras de diversos fluidos corporais, após a infecção. Stone *et al*. (2020), mostraram a presença do RNA viral, em média, por 95 dias nas hemácias, 73 dias no sangue total, 14 dias na urina e 26 dias na saliva. AID *et al*. (2017), identificaram o RNA viral nos linfonodos por até 72 dias e no líquido por até 42 dias após o controle da viremia pelo organismo. Nestes pacientes não houve detecção de IgM para o ZIKV no líquido, o que pode ter contribuído para a persistência do vírus no SNC, tornando sua eliminação dependente de outros mecanismos imunes (AID *et al*, 2017).

Em 17/19 (89,47%) dos casos em que o ZIKV foi o único patógeno detectado, os pacientes apresentaram-se afebris, indicando, provavelmente, uma infecção viral não sintomática. A permanência do RNA viral em fluidos biológicos após controle da viremia pode explicar a ausência de sintomas no momento da coleta da amostra. Nestes casos são necessários meios para diferenciar a detecção de um RNA viral aguda assintomática, de uma possível reativação da doença ou ainda de uma reinfecção.

Nossos achados evidenciam a circulação de Zika vírus durante o período de coleta das amostras, além de reforçar a importância de se considerar este agente como causador de infecções no sistema nervoso central.

É importante mencionar que um resultado positivo de PCR para um vírus específico no LCR deve ser interpretado com cautela, uma vez que pode haver permanência de material genético viral latente no organismo do hospedeiro ou ainda uma coinfeção com outros agentes patogênicos e o vírus em questão não ter papel importante no desenvolvimento da doença ativa. É o que ocorre, por exemplo, com o DNA do EBV, que pode ser encontrado no LCR concomitantemente com o material genético de agentes causadores de outras doenças infecciosas do SNC, como tuberculose, meningite bacteriana e encefalite por HSV (STUDAHL *et al*, 1999; MARTELIUS *et al*, 2011).

Neste sentido, a soroconversão, a detecção de IgM ou um aumento significativo do título de anticorpos séricos contra um antígeno viral específico, associados ao resultado positivo do PCR, podem indicar uma infecção presente ou recente. Todavia, somente a análise de anticorpos, também não é suficiente para provar uma conexão causal com os sintomas do SNC (SOLOMON *et al*, 2012).

Além disso, na admissão de um paciente com sintomas neurológicos graves indicando uma doença infecciosa, as causas não infecciosas diferenciais, como condições autoimunes, doenças vasculares e metabólicas, toxicidade de drogas e neoplasias devem ser levadas em consideração (GRANERÖD *et al*, 2010). Torna-se necessário ainda, avaliar o estado imunológico geral do hospedeiro, uma vez que pode influenciar nas manifestações clínicas da doença viral (STUDAHL *et al*, 2013).

Não houve relação direta entre a detecção de vírus no líquido dos pacientes com a ocorrência de óbitos e com a síndrome de Guillain-Barré.

8 CONCLUSÃO

A plataforma de “mini-arranjo” de qPCR para HSV 1/2, VZV, EBV, CMV, HHV-6 A/B, HHV-7, ADV, JCV, ENTV, DENV, ZIKV e CHIKV demonstrou ser uma ferramenta útil na detecção desses agentes virais como potenciais causadores de infecções no SNC.

Os testes moleculares indicaram o ZIKV como agente etiológico mais detectado, indicando uma circulação desse vírus durante o período do estudo. As infecções assintomáticas sugerem sua permanência por um maior período no SNC, após o controle da viremia.

Os resultados de testes baseados em PCR precisam ser interpretados com cautela, especialmente, aqueles com baixa carga viral. Sugere-se que, a determinação da carga viral com definição de pontos de corte possa ser mais elucidador que detecção em formato qualitativo, principalmente para vírus que causam latência.

9 PERSPECTIVAS

- Realizar o sequenciamento das amostras positivas para ZIKV e construir a árvore filogenética para identificar qual a variante correspondente (Asiática ou Africana).
- Realizar estudo com coleta pareada de outros materiais como soro, urina (além do líquido), aplicando análises por métodos moleculares e sorológicos para tentar entender melhor as infecções por ZIKV.

REFERÊNCIAS

- AID, M. *et al.* Zika Virus Persistence in the Central Nervous System and Lymph Nodes of Rhesus Monkeys. **Cell**. v. 169, n. 4, p. 610-620, 2017.
- AMIR, J. *et al.* Is lenticulostriated vasculopathy a sign of central nervous system insult in infants with congenital CMV infection? **Arch Dis Child**. v. 96, n. 9, p. 846-850, 2011.
- ANDERSON, A.M. *et al.* Human immunodeficiency virus-associated cytomegalovirus infection with multiple small vessel cerebral infarcts in the setting of early immune reconstitution. **J Neurovirol**. v. 16, n. 2, p. 179-184, 2010.
- ARAÚJO, F. *et al.* Dengue in Patients with Central Nervous System Manifestations, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 18, p. 677-792, 2012.
- BAI, X. *et al.* Quantitative polymerase chain reaction for human herpesvirus diagnosis and measurement of Epstein-Barr virus burden in posttransplant lymphoproliferative disorder. **Clin Chem**. v. 43, n. 10, p. 1843-1849, 1997.
- BAI, X. *et al.* Quantitative polymerase chain reaction for human herpesvirus diagnosis and measurement of Epstein-Barr virus burden in posttransplant lymphoproliferative disorder. **Clin Chem**. v. 43, n. 10, p.1843-1849, 1997.
- BALM, M.N., *et al.* A diagnostic polymerase chain reaction assay for Zika virus. **J Med Virol**. v. 84, n. 9, p. 1501-1505, 2012.
- BANDEIRA, Antonio Carlos *et al.* Neonatal encephalitis due to Chikungunya vertical transmission: First report in Brazil. **IDCases**. v. 5 p. 57-9, 2016.
- BEADLING, C; SLIFKA, M. K. How do viral infections predispose patients to bacterial infections? **Curr Opin Infect Dis**. vol. 17, p. 185-91, 2004.
- BEN ABDELHAFIDH, N. *et al.* Cytomegalovirus myelitis in immunocompetent adult. **Rev Med Interne**. v. 27, n. 11, p. 883-885, 2006.
- BEN-AMOR, S. *et al.* Post varicella zoster virus myelitis in immunocompetent patients. **Neurosc (Riyadh)**. v. 16, n. 2, p. 156-158, 2011.
- BERGALLO, M. *et al.* Development of a multiplex polymerase chain reaction for detection and typing of major human herpesviruses in cerebrospinal fluid. **Can J Microbiol**. v. 53, n. 10, p. 1117-1122, 2007.
- BEURET, C. Simultaneous detection of enteric viruses by multiplex real-time RT-PCR. **J Virol Methods**. 115(1):1-8, 2004.
- BOARETTI, M. *et al.* A two-year prospective study of clinical criteria and polymerase chain reaction assay of cerebrospinal fluid for the diagnosis of viral infections of the central nervous system. **New Microbiol**. v. 31, n. 4, p. 445-450, 2008.

BONTHIUS, D. J. Viral Infections of the pediatric nervous system. Introduction. **Seminars in pediatric neurology**. v. 19, n.3 p. 87-88, 2012.

BOSNJAK, V. M. *et al.* Malformations of cortical development in children with congenital cytomegalovirus infection - A study of nine children with proven congenital cytomegalovirus infection. **Coll Antropol**. v. 35, n.1, p.229-234, 2011.

BOUCHER, A. *et al.* Epidemiology of infectious encephalitis causes in 2016. **Médecine et maladies infectieuses**. v. 47, n. 3, p. 221-235, 2017.

BRITO FERREIRA, Maria Lúcia *et al.* Neurological disease in adults with Zika and chikungunya virus infection in Northeast Brazil: a prospective observational study. **The Lancet. Neurology**. v. 19, n.10 p. 826-839, 2020.

CALVARIO, A. *et al.* Herpes Consensus PCR test: a useful diagnostic approach to the screening of viral diseases of the central nervous system. **J Clin Virol**. v. 25 Suppl 1: S71-8, 2002.

CARDONA, C. G. *et al.* Neurotropism of SARS-CoV 2: Mechanisms and manifestations. **Journal of the Neurological Sciences**. v. 412, p. 116824, 2020.

CASAS, I. *et al.* Viral Diagnosis of Neurological Infection by RT Multiplex PCR: A Search for Entero- and Herpesviruses in a Prospective Study. **J Med Virol**. v. 57, p. 145–151, 1999.

CDC. **CDC 2019-Novel Coronavirus (2019-nCoV) Real-Time RT-PCR Diagnostic Panel**. Atlanta: CDC, 2020. 48 p.

CHESKY, M. *et al.* Polymerase chain reaction for the laboratory diagnosis of aseptic meningitis and encephalitis. **Arq Neuropsiquiatr**. v. 58, p. 836-842, 2000.

CINQUE, P.; KORALNIK, I. J.; CLIFFORD, D.B. The evolving face of human immunodeficiency virus-related progressive multifocal leukoencephalopathy: defining a consensus terminology. **J Neurovirol**. v. 9, n. 1, p. 88-92, 2003.

COHEN, F. S. How Viruses Invade Cells. **Biophysical Journal**, v. 110, n. 5, p. 1028-1032, 2016.

CORTI, M. *et al.* Acute meningoencephalomyelitis due to varicella-zoster virus in an AIDS patient: report of a case and review of the literature. **Rev Soc Bras Med Trop**. v. 44, n. 6, p. 784-786, 2011.

COSTA, F. A. *et al.*, Simultaneous monitoring of CMV and human herpesvirus 6 infections and diseases in liver transplant patients: one-year follow-up. **Clinics (Sao Paulo)**. v. 66, n.6, p. 949-953, 2011.

CRISPIM, A. P. C. **Detecção e isolamento de Flavivírus em líquido cefalorraquidiano de pacientes em Minas Gerais no período de 2018 a 2019**. 2020. 88f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2020.

CROM, S. C. M. Characteristics of pediatric patients with enterovirus meningitis and no cerebral fluid pleocytosis, **Eur J Pediatr.** v. 171, n. 5, p. 795-800, 2012.

CUNHA, B.A.; WARREN-FAVORITO, H.; MICKAIL, N. Unusually severe varicella zoster (VZV) virus viral (aseptic) meningitis in an unimmunized, immunocompetent host with chickenpox. **Heart Lung.** v. 40, n. 4, p. 349-351, 2011.

DA SILVA, S.R.; DE OLIVEIRA, D. E. HIV, EBV and KSHV: viral cooperation in the pathogenesis of human malignancies. **Cancer Lett.** v. 305, n. 2, p. 175-185, 2011.

DAHM, T. *et al.* Neuroinvasion and Inflammation in Viral Central Nervous System Infections. **Mediators of inflammation.** v. 2016, 16p., 2016.

DE MORAIS BRONZONI, R.V. *et al.* Duplex reverse transcription-PCR followed by nested PCR assays for detection and identification of Brazilian alphaviruses and flaviviruses. **J Clin Microbiol.** v. 43, n. 2., p. 696-702, 2005.

DE ORY, F. *et al.* Viral infections of the central nervous system in Spain: a prospective study. **Journal of medical virology.** v. 85, n. 3, p. 554-62, 2013.

DI CARLO, P. *et al.* Unusual MRI findings in an immunocompetent patient with EBV encephalitis: a case report. **BMC Med Imaging.** v. 24, 2011.

DOMINGUES, R. N.; TEIXEIRA, A.L. Management of Acute Viral Encephalitis in Brazil Renan Barros. **BJID** v.13, p. 433-439, 2009.

DOS SANTOS, G. P. Enterovirus meningitis in Brazil, 1998-2003. **J Med Virol.** v.78, p. 98-104, 2006.

DRAGO, L. *et al.* Comparison of nested PCR and real time PCR of Herpesvirus infections of central nervous system in HIV patients. **BMC Infect Dis.** v.30, n. 4, 2004.

DUPUIS, M. *et al.* Molecular detection of viral causes of encephalitis and meningitis in New York State. **J Med Virol.** v. 83, n. 12, p. 2172-2181, 2011.

DWORKIN, L. L.; GIBLER, T.M.; VAN GELDER, R. N. Real-time quantitative polymerase chain reaction diagnosis of infectious posterior uveitis. **Arch Ophthalmol.** v. 120, n. 11, p. 1534-1539, 2002.

ESPINOZA, I. O. *et al.* Infecciones del sistema nervioso central por enterovirus en niños atendidos en un hospital de lima, Perú, **Rev Peru Med Exp Salud Publica.** v. 28(4):602-609, 2011.

EVANGELISTA, Gabriela de Almeida Oliveira. *et al.* Meningoencephalitis associated with Zika virus and Chikungunya virus infection. **Jpn J Infect Dis.** Abril 30, 2021.

FERREIRA, J. E. *et al.* Molecular characterization of viruses associated with encephalitis in São Paulo, Brazil. **PloS one.** v. 14, 10p., 2019.

- FRANGE, P. et al. Adenoviral Infection Presenting as an Isolated Central Nervous System Disease without Detectable Viremia in Two Children after Stem Cell Transplantation, **J Clin Microbiol.** v. 1, p. 2361–2364, 2011.
- FURIONE, M. et al. Rapid detection of enteroviral RNA in cerebrospinal fluid (CSF) from patients with aseptic meningitis by reverse transcription-nested polymerase chain reaction. **New Microbiol.** v. 21, n. 4, p. 343-51, 1998.
- GAIDANO, G. *et al.* Analysis of Human Herpesvirus Type 8 Infection in AIDS-Related and AIDS-Unrelated Primary Central Nervous System Lymphoma. **J Infect Dis.** v. 175, p. 1193-1197, 1997.
- GANESAN, V. K. *et al.* Chikungunya Virus: Pathophysiology, Mechanism, and Modeling. **Viruses.** v. 9, 14p. 2017.
- GORGIEVSKI-HRISOHO, M. *et al.* Detection by PCR of enteroviruses in cerebrospinal fluid during a summer outbreak of aseptic meningitis in Switzerland. **J Clin Microbiol.** v. 36, n. 9, p.2408-12, 1998.
- GRAHN, A. *et al.* Varicella-zoster virus (VZV) glycoprotein E is a serological antigen for detection of intrathecal antibodies to VZV in central nervous system infections, without cross-reaction to herpes simplex virus 1. **Clin Vaccine Immunol.** v. 18, n.8, p.1336-1342, 2011.
- GRAHN, A; STUDAHL, M. Varicella-zoster virus infections of the central nervous system – Prognosis, diagnostics and treatment. **J Infect.** v. 71, n. 3, p. 281-293, 2015.
- GRANERÖD, J. *et al.* Causes of encephalitis and differences in their clinical presentations in England: a multicentre, population-based prospective study. **Lancet Infect Dis.** v. 10, n. 12, p. 835-844, 2010.
- GREGOIRE, S. M. *et al.* Polymerase chain reaction analysis and oligoclonal antibody in the cerebrospinal fluid from 34 patients with varicella-zoster virus infection of the nervous system. **J Neurol Neurosurg Psychiatry.** v. 77, n, 8, p. 938-942, 2006.
- GRIVARD, P. *et al.* Molecular and serological diagnosis of Chikungunya virus infection. **Pathologie-biologie.** v. 55, n.10, p. 490-4, 2007.
- GUALCO, G. *et al.* Diffuse large B-cell lymphoma involving the central nervous system. **Int J Surg Pathol.** v.19, n. 1, p. 44-50, 2011.
- HASBUN, R. *et al.* Epidemiology of meningitis and encephalitis in infants and children in the United States, 2011–2014. **Pediatr Infect Dis J.** v. 83, p. 37-41, 2019.
- HAUG, A. *et al.* Recurrent polymorphonuclear pleocytosis with increased red blood cells caused by varicella zoster virus infection of the central nervous system: Case report and review of the literature. **J Neurol Sci.** v. 292(1-2), p. 85-88, 2010.
- HOLDEN S. R.; VAS, A. L. Severe encephalitis in a haematopoietic stem cell transplant recipient caused by reactivation of human herpesvirus 6 and 7. **J Clin Virol.** v. 40, n.3, p. 245-247, 2007.

- HOSHINO, A. *et al.* Epidemiology of acute encephalopathy in Japan, with emphasis on the association of viruses and syndromes. **Brain Dev.** v. 34, n. 5, p. 337-343, 2011.
- HU, B. *et al.* Characteristics of SARS-CoV-2 and COVID-19. **Nat Rev Microbiol.** v. 19, n. 3, p. 141-154, 2021.
- JACOBSON, C. A.; ABRAMSON, J.S. HIV-Associated Hodgkin's Lymphoma: Prognosis and Therapy in the Era of cART. **Adv Hematol.** V. 2012:1-8, 2012.
- JACOBSON, M.; LURAIN, N.; HUNT, P. Cytomegalovirus viraemia in the modern antiretroviral era. **HIV Med.** v. 12, n. 7, p. 387-388, 2011.
- JAQUIÉRY, E. *et al.* Intrathecal immune responses to EBV in early MS. **Eur J Immunol.** v. 40, n. 3, p. 878-887, 2010.
- JAVED, F. *et al.* Zika virus: what we need to know?. **Journal of basic microbiology.** v. 58, n.1 p. 3-16, 2018.
- KENNEDY, P. Viral encephalitis: causes, differential diagnosis, and management. **Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry.** v. 75(Suppl1), p.i10-i15, 2004.
- KHALILI, K. *et al.* Reactivation of JC virus and development of PML in patients with multiple sclerosis. **Neurology.** v.68, n.13, p. 985-990, 2007.
- KONEMAN, E. W. *et al.* **Diagnóstico microbiológico.** Rio de Janeiro: Editora médica e científica LTDA, 2001. cap 21, p.1225-1226.
- KOYUNCU, O.O.; HOGUE, I.B.; ENQUIST, L.W. Virus infections in the nervous system. **Cell Host Microbe.** v. 13, n. 4, p. 379-393, 2013.
- LAI, Y. L. *et al.*, Cost-effective real-time reverse transcriptase PCR (RT-PCR) to screen for Dengue virus followed by rapid single-tube multiplex RT-PCR for serotyping of the virus. **J Clin Microbiol.** v. 45, n.3, p. 935-941, 2007.
- LANCIOTTI, R. S. *et al.* Chikungunya virus in US travelers returning from India, 2006. **Emerg Infect Dis.** v. 13, n. 5, p. 764-7, 2007.
- LANCIOTTI, R. S. *et al.* Genetic and serologic properties of Zika virus associated with an epidemic, Yap State, Micronesia, 2007. **Emerg Infect Dis.** v. 14, n. 8, p. 1232-1239, 2008.
- LEE, Y. F. *et al.* A protein covalently linked to poliovirus genome RNA. **Proc Acad Sci USA.** v. 74, n. 1, p. 59-63, 1977.
- LI, G. H. *et al.* Neurological Manifestations of Dengue Infection. **Frontiers in cellular and infection microbiology.** v. 7 449, 2017.
- LIMA, M. R. Q. *et al.* A New Approach to Dengue Fatal Cases Diagnosis: NS1 Antigen Capture in Tissues. **Neglec Trop Dis.** v. 5, n. 5, p. 1147, 2011.
- LUTFALLA G.; UZE, G. Performing quantitative reverse-transcribed polymerase chain reaction experiments. **Methods Enzymol.** v. 410, p.386-400, 2006.

LYNCH, J.P. 3RD.; FISHBEIN, M.; ECHAVARRIA, M. Adenovirus. **Semin Respir Crit Care Med.** v. 32, n. 4, p. 494-511, 2011.

LYNCH, J.P. 3rd; FISHBEIN, M; ECHAVARRIA, M. Adenovirus. **Semin Respir Crit Care Med.** v. 32, n. 4, p. 494-11, 2011.

MADIGAN, M.; MARTINKO, J.; PARKER, J. Brock – **Biology of Microorganisms.** ed. 9. Prentice Hall; New Jersey, USA, 2000.

MAJOR, E. O.; AULT, G. S. Progressive multifocal leukoencephalopathy: clinical and laboratory observations on a viral induced demyelinating disease in the immunodeficient patient. **Curr Opin Neurol.** v. 8, n. 3, p. 184-190, 1995.

MARTELIUS, T. *et al.* Clinical characteristics of patients with Epstein Barr virus in cerebrospinal fluid. **BMC Infect Dis.** v. 21, n. 11, p. 281, 2011.

MCGILL, F. *et al.* Viral meningitis: current issues in diagnosis and treatment. **Current opinion in infectious diseases.** v. 30, n. 2, p. 248-256, 2017.

MEINHARDT, J. *et al.* Olfactory transmucosal SARS-CoV-2 invasion as a port of central nervous system entry in individuals with COVID-19. **Nat Neurosci.** v. 24, n. 2, p.168-175, 2021.

MENDOZA, L. P. *et al.* Viral infections of the central nervous system in Brazil. **Journal of Infection.** v. 54, p. 589-596, 2007.

MINISTÉRIO DA SAUDE. **Datasus. Sistema de informação de agravos de notificação – SINAN.** Disponível em <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?sinanet/cnv/zikamg.def>. Acesso em: 22 de ago. 2021.

MOHAMMAD, W. *et al.* Arbovirus infections of the nervous system: Current trends and future threats. **Neurology.** v. 84, n. 4, p. 421-423, 2015.

MUSTAFA, M.S. *et al.* Discovery of fifth serotype of dengue virus (DENV-5): A new public health dilemma in dengue control. **Med J Armed Forces India.** v. 71, n. 1, p. 67-70, 2015.

NAVECA, F. G. *et al.* Complete genome sequence of a Dengue virus serotype 4 strain isolated in Roraima. **Brazil. J Virol.** v. 86, n. 3, p. 1897-1898, 2012.

NIGROVIC, L. E. *et al.* Trends in the management of viral meningitis at United States children's hospitals. **Pediatrics.** v. 131, n.4, p. 670-6, 2013.

NUNES, C. F. **Etiologia das encefalites e meningites de líquido claro.** 2018. 140f. Tese (Doutorado em Ciências) – Instituto de Medicina Tropical de São Paulo. Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.

OLIVEIRA, D. B. **Desenvolvimento e avaliação de uma plataforma de diagnóstico para meningoencefalites virais por PCR em tempo real.** 2015. 172f. Tese (Doutorado em Microbiologia) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2015.

PALAZZO, E.; YAHIA, S. A. Progressive multifocal leukoencephalopathy in autoimmune diseases. **Joint Bone Spine**. v. 79, n. 4, p. 351-355, 2012.

PALLANSCH, M.; ROOS, R. Enteroviruses: polioviruses, coxsackieviruses, echoviruses, and newer enteroviruses. In: FIELDS, B. N. *et al.* **Fields virology**. 5th ed. Philadelphia: Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins. v. 1, p. 839-893, 2007.

PEAPER, D. R.; LANDRY, M. L. Laboratory diagnosis of viral infection. In: TSELIS, A.; BOSS, J. **Handbook of Clinical Neurology**. Elsevier 2014. ed. 3, v. 123, pp. 123-147.

PHOWTHONGKUM, P. *et al.* Basal ganglia and brainstem encephalitis, optic neuritis, and radiculomyelitis in Epstein-Barr virus infection. **J Infect**. v. 54, n. 3, p. 141-144, 2007.

PINTO, A. *et al.* CMV and HSV-2 myeloradiculitis in an HIV infected patient. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**. v. 53, n. 3, p.173-175, 2011.

PUCCIONI-SOHLER, M. *et al.* Dengue: a new challenge for neurology. **Neurology international**. v. 4, 2012.

RAMAMURTHY, M. *et al.* Comparison of a conventional polymerase chain reaction with real-time polymerase chain reaction for the detection of neurotropic viruses in cerebrospinal fluid samples. **Indian J Med Microbiol**. v. 29, n. 2, p. 102-109, 2011.

RAND, K.; HOUCK, H.; LAWRENCE, R. Real-time polymerase chain reaction detection of herpes simplex virus in cerebrospinal fluid and cost savings from earlier hospital discharge. **J Mol Diagn**. v. 7, n. 4, p. 511-516, 2005.

RANTALAIHO, T. *et al.* Acute encephalitis from 1967 to 1991. **J Neurol Sci**. v. 184, n. 2, p. 169-177, 2001.

RIGAMONTI, A. *et al.* Atypical transverse myelitis due to cytomegalovirus in an immunocompetent patient. **Neurol Sci**. v. 26, n. 5, p. 351-354, 2005.

ROMERO, J.R.; NEWLAND, J. G. Viral meningitis and encephalitis: traditional and emerging viral agents. **Semin Pediatr Infect Dis**. v. 14, n. 2, p. 72-82, 2003.

ROWLEY, A. H. *et al.* Rapid detection of herpes-simplex-virus DNA in cerebrospinal fluid of patients with herpes-simplex encephalitis. **The Lancet**, v. 335, p. 440-441, 1990.

SÄLL, O. *et al.* Etiology of Central Nervous System Infections in a Rural Area of Nepal Using Molecular Approaches. **Am J Trop Med Hyg**. v. 101, n. 1, p. 253-259, 2019.

SANTOS, D.C. **Estabelecimento de métodos moleculares para aplicação no diagnóstico rápido de vírus neurotrópicos**. 2009. 165f. Tese (Doutorado em Microbiologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

SAWYER, M. H. Enterovirus infections: diagnosis and treatment. **Semin Pediatr Infect Dis**. v. 12, n. 1, p. 40-7, 2002.

- SCHMIDT-HIEBER, M. *et al.* Viral encephalitis after allogeneic stem cell transplantation: a rare complication with distinct characteristics of different causative agents. **Haematologica**. v. 96, n. 1, p. 142-149, 2011.
- SEHBANI, L. *et al.* Specific and quantitative detection of human polyomaviruses BKV and JCV by Light Cycler real-time PCR. **J Clin Virol**. v. 36, n. 2, p. 159-162, 2006.
- SEJVAR, J. Neuroepidemiology and the epidemiology of viral infections of the nervous system. **Handbook of clinical neurology**. v. 123, p. 67-87, 2014.
- SHIMIZU, H. *et al.* Discrepancy in EBV-DNA load between peripheral blood and cerebrospinal fluid in a patient with isolated CNS post-transplant lymphoproliferative disorder. **Int J Hematol**. v. 94, n. 5, p. 495-498, 2011.
- SILVA, L. A.; TERENCE, S. D. Chikungunya virus: epidemiology, replication, disease mechanisms, and prospective intervention strategies. **The Journal of clinical investigation**. v. 127, n.3, p. 737-749, 2017.
- SILVA, M. T. T. Viral encephalitis. **Arquivos de neuro-psiquiatria**. v. 71, p. 703-9, 2013.
- SOARES, C. N. *et al.* Review of the etiologies of viral meningitis and encephalitis in a dengue endemic region. **Journal of the neurological sciences**. v. 303, n. 1-2, p. 75-9, 2011.
- SOLOMON, T. *et al.* Management of suspected viral encephalitis in adults. Association of British Neurologists and British Infection Association National Guidelines. **J Infect**. v. 64, n. 4, p. 347-373, 2012.
- SOLOMON, T. *et al.* Neurological manifestations of dengue infection. **Lancet**. v. 355, n. 9209, p. 1053-1059, 2000.
- STAHL, J.P. *et al.* Epidemiology of viral encephalitis in 2011. **Médecine et maladies infectieuses**. v. 41, p. 453-464, 2011.
- STALKUP, J. R.; CHILUKURI, S. Enterovirus infections: a review of clinical presentation, diagnosis, and treatment. **Dermatol Clin**. v. 20, n. 2, p. 217-223, 2002.
- STEINER, I. Herpes simplex virus encephalitis: new infection or reactivation? **Curr Opin Neurol**. v. 24, n. 3, p. 268-274, 2011.
- STONE, M. *et al.* Zika virus RNA and IgM persistence in blood compartments and body fluids: a prospective observational study. **The Lancet. Infectious diseases**, v. 20, n.12, p. 1446-1456, 2020.
- STUDAHL, M *et al.* Hematogenously spread herpesviruses are detected as frequently as neuronally spread herpesviruses in cerebrospinal fluid by polymerase chain reaction assay. **Clin Infect Dis**. v. 29, n. 1, p. 216-218, 1999.
- STUDAHL, M. *et al.* Acute Viral Infections of the Central Nervous System in Immunocompetent Adults: Diagnosis and Management. **Drugs**. v. 73, p. 131-158, 2013.

- SUGITA, Y. *et al.* Epstein-Barr virus-associated primary central nervous system lymphomas in immunocompetent elderly patients: analysis for latent membrane protein-1 oncogene deletion and EBNA-2 strain typing. **J Neurooncol.** v. 100, n. 2, p. 271-279, 2010.
- SUZUKI, M. *et al.* A case of Epstein-Barr virus associated post-transplant lymphoproliferative disorder with CNS involvement: pathological findings at both biopsy and autopsy. **Neuropathol.** v. 31, n. 4, p. 440-445, 2011.
- TANAKA, T. *et al.* Rapid and simultaneous detection of 6 types of human herpes virus (herpes simplex virus, varicella-zoster virus, Epstein-Barr virus, cytomegalovirus, human herpes virus 6A/B, and human herpes virus 7) by multiplex PCR assay. **Biomed Res.** v. 30, n. 5, p. 279-85, 2009.
- TANDON, A. *et al.* Epstein-Barr virus as a possible etiologic agent in primary central nervous system lymphoma in immunocompetent individuals. **Neurol India.** v. 57, n. 1, p. 36-40, 2009.
- TASCINI, C. *et al.* Acute varicella-zoster virus necrotizing meningoencephalomyelitis with sudden visual loss and paraparesis in an HIV-infected patient. **New Microbiol.** v. 33, n. 3, p. 267-269, 2010.
- TAVAKOLI, N. P. *et al.* Detection and typing of enteroviruses from CSF specimens from patients diagnosed with meningitis/encephalitis. **J Clin Virol.** v. 43, p. 207–211, 2008.
- THOMASINI, R. L. *et al.* Aged-associated cytomegalovirus and Epstein-Barr virus reactivation and cytomegalovirus relationship with the frailty syndrome in older women. **PLoS One.** v. 12, n. 7, 12 p., 2017.
- THOMASINI, R. L. *et al.* Betaherpesviruses in adult liver transplant recipients. In: ABDELDAYEM, H.; ALLAM, N. **Liver transplantation: Technical issues and complications.** IntechOpen, 2012.
- THOMASINI, R. L. *et al.* Detection of human herpesvirus-7 by qualitative nested-PCR: comparison between healthy individuals and liver transplant recipients. **Rev Soc Bras Med Trop.** v. 41, n. 6, p. 556-559, 2008.
- TONG, C.Y. *et al.* Prediction and diagnosis of cytomegalovirus disease in renal transplant recipients using qualitative and quantitative polymerase chain reaction. **Transplantation.** v. 15, p. 985-991, 2000.
- TRAN, C. *et al.* Neuromyelitis optica following CMV primo-infection. **J Intern Med.** v. 261, n. 5, p. 500-503, 2007.
- TURNER, P. *et al.* The aetiologies of central nervous system infections in hospitalised Cambodian children. **BMC Infect Dis.** v. 17, p. 806, 2017.
- TYLER, K. L. Human herpesvirus 6 and multiple sclerosis: the continuing conundrum. **J Infect Dis.** v. 187, p. 1360-1364, 2003.

TYLER, K. L. Emerging viral infections of the central nervous system: part 1. **Archives of neurology**. v. 66, n. 8, p. 939-48, 2009.

VANČÍKOVÁ, Z.; DVORÁK, P. Cytomegalovirus infection in immunocompetent and immunocompromised individuals--a review. **Current drug targets. Immune, endocrine and metabolic disorders**. vol. 1, n.2, p. 179-87, 2001.

VIDAL, L. R., *et al.* Enterovirus and herpesviridae family as etiologic agents of lymphomonocytary meningitis, Southern Brazil, **Arq Neuropsiquiatr**. v. 69, n. 3, p. 475-481, 2011.

VIEIRA, M. A. C. S. *et al.* Potential role of dengue virus, chikungunya virus and Zika virus in neurological diseases. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**. v. 113, n. 11, 2018.

V'KOVSKI, P. *et al.* Coronavirus biology and replication: implications for SARS-CoV-2. **Nat Rev Microbiol**. v. 19, n. 3, p. 155-170, 2021.

WADA, K. *et al.* Simultaneous Quantification of Epstein-Barr Virus, Cytomegalovirus, and Human Herpesvirus 6 DNA in Samples from Transplant Recipients by Multiplex Real-Time PCR Assay. **J Clin Microbiol**. v. 45, n. 5, p. 1426–1432, 2007.

WATANABE, M. *et al.* Detection of adenovirus DNA in clinical samples by SYBR Green real-time polymerase chain reaction assay. **Pediatr Int**. v. 47, n. 3, p. 286-291, 2005.

WEBER, T. *et al.* Comparative analysis of intrathecal antibody synthesis and DNA amplification for the diagnosis of cytomegalovirus infection of the central nervous system in AIDS patients. **J Neurol**. v. 241, n. 7, p. 407-414, 1994.

WEINBERG, G. A.; MIAN, A.N. BK virus nephropathy and other polyoma virus infections. **Pediatr Infect Dis J**. v. 29, n. 3, p. 257-260, 2010.

WHITE, K. *et al.* The utility of cerebrospinal fluid parameters in the Early microbiological assessment of meningitis. **Diagn Microbiol Infect Dis**. v. 73, n. 1, p. 27-30, 2012.

WHITE, M. K. *et al.* Zika virus: An emergent neuropathological agent. **Annals of neurology**. v. 80, n. 4, p. 479-89, 2016.

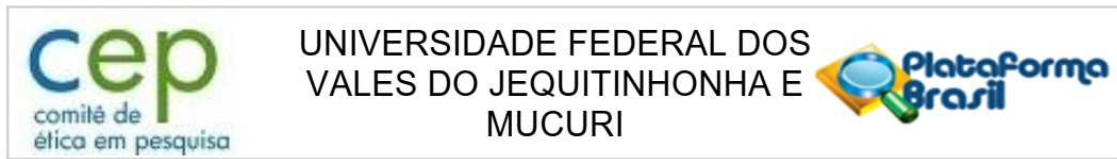
WIWANITKIT, V. Seizure and Zika virus infection. **Seizure**.v.45, n.1, 2017.

WU, F. *et al.* A new coronavirus associated with human respiratory disease in China. **Nature**. v. 580, n. 7803, 2020.

YIN-MURPHY, M.; ALMOND, J. W. Picornaviruses. In: BARON, S. **Medical Microbiology**. 4th ed. Galveston (TX): University of Texas Medical Branch at Galveston; cap. 53, 1996.

YOSHIDA, K. *et al.* Ascitic fluid due to type II herpes simplex virus infection: Report of a case with immunocytochemical confirmation. **Diagn Cytopathol**. v. 41, n. 4, p. 354-359, 2012.

ANEXO A – PARECER CONSUBSTANCIADO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: AVALIAÇÃO DE UMA PLATAFORMA PARA DETECÇÃO SIMULTÂNEA DE DIFERENTES MICRO-ORGANISMOS NO SISTEMA NERVOSO CENTRAL PELA TÉCNICA DE PCR EM TEMPO REAL

Pesquisador: Ronaldo Luis Thomasini

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 96391118.1.0000.5108

Instituição Proponente: Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.921.935

Apresentação do Projeto:

O projeto intitulado "AVALIAÇÃO DE UMA PLATAFORMA PARA DETECÇÃO SIMULTÂNEA DE DIFERENTES MICRO ORGANISMOS NO SISTEMA NERVOSO CENTRAL PELA TÉCNICA DE PCR EM TEMPO REAL" tem por objetivo validar um painel de Real Time-PCR para a detecção de Enterovírus, Adenovírus, HSV-1/2, VZV, EBV, CMV, HHV-6, HHV-7, JC, Saint-Louis, WestNile e Vírus da Dengue em amostras de líquido de pacientes com síndromes neurológicas infecciosas. Adicionalmente, será investigada a presença

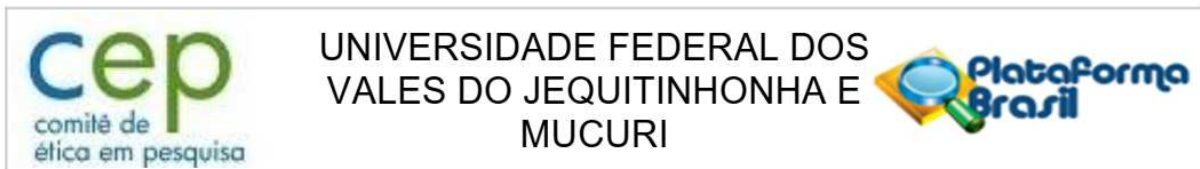
de Lysteria sp, Mycobacterium sp, Cryptococcus sp, Candida sp e gene 16S bacteriano utilizando a mesma metodologia. Serão incluídos no estudo, pacientes que apresentarem suspeita de infecção no sistema nervoso central. Espera-se que com a validação da técnica possa-se sugerir um método rápido, pouco trabalhoso e com custo reduzido para a detecção rotineira dos principais vírus além de algumas bactérias e fungos de difícil diagnóstico.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Realizar PCR em tempo real para a detecção de Enterovírus, Adenovírus, HSV-1/2, VZV, EBV, CMV, HHV6, HHV-7, JC, Saint-Louis, West Nile, Vírus da Dengue, Lysteria sp, Mycobacterium sp, Cryptococcus sp, Candida sp e gene 16S bacteriano em amostras de líquido de pacientes com síndromes neurológicas infecciosas.

Endereço: Rodovia MGT 367 - Km 583, nº 5000
Bairro: Alto da Jacuba **CEP:** 39.100-000
UF: MG **Município:** DIAMANTINA
Telefone: (38)3532-1240 **Fax:** (38)3532-1200 **E-mail:** cep@ufvjm.edu.br



Continuação do Parecer: 2.921.935

Objetivo Secundário:

Avaliar a associação da hipótese diagnóstica, confirmação diagnóstica e desfecho clínico (alta sem sequelas, alta com sequelas ou óbito) com o resultado das PCRs.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

Os riscos são o de identificação do paciente e de constrangimento. Para minimizar o risco de identificação, as amostras e as fichas clínicas serão identificadas por números sequenciais e apenas os pesquisadores terão acesso a identidade dos pacientes. Nenhum nome ou informação (endereço, número de leito, telefone, etc...) que possa comprometer o sigilo e a identidade dos participantes serão tornados públicos. O risco de constrangimento será minimizado explicando-se ao participante ou responsável que ele não é obrigado a participar da pesquisa e que sua eventual recusa não trará qualquer impacto no tratamento ou relação com a equipe médica e pesquisadores. Além disso será explicado que ele poderá desistir de participar a qualquer momento. Ninguém além da equipe médica ou pesquisadores estará no local da pesquisa.

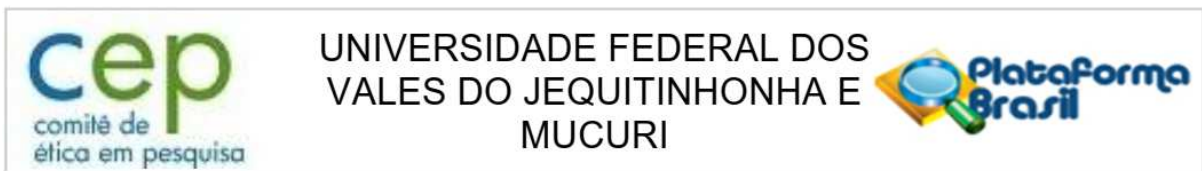
Benefícios:

Não haverá benefício direto para os participantes da pesquisa. Como benefício indireto, o desenvolvimento de um painel para um número relativamente grande de patógenos, que hoje não são identificados, passariam a ser identificados possibilitando um tratamento mais rápido e preciso. Isto poderia minimizar os efeitos neurológicos permanentes ou transitórios da infecção, sobretudo em pacientes imunossuprimidos

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Serão incluídos no estudo, pacientes com distúrbios neurológicos de ambos os sexos com idades entre 0 e 100 anos, que apresentarem suspeita de infecção no sistema nervoso central. Serão incluídos os pacientes com sintomas compatíveis com Meningite, Meningoencefalite, Encefalite Disseminada Aguda, Radiculite, Mieloradiculite e Mielite. Estes pacientes serão acompanhados pela equipe médica assistente e pela equipe do serviço de neuro-cirurgia da Santa Casa de Caridade de Diamantina. Os pacientes que ao exame clínico, apresentarem sintomas sugestivos destas infecções, quando houver indicação de punção, terão suas amostras coletadas (líquor) e encaminhadas ao laboratório para análise. Não haverá coleta de líquido quando não houver indicação para o exame de rotina, ou seja, não haverá coleta exclusiva para este estudo. Os procedimentos laboratoriais serão realizados nos Laboratórios Multi-usuário do CIPQ-Saúde

Endereço: Rodovia MGT 367 - Km 583, nº 5000
Bairro: Alto da Jacuba **CEP:** 39.100-000
UF: MG **Município:** DIAMANTINA
Telefone: (38)3532-1240 **Fax:** (38)3532-1200 **E-mail:** cep@ufvjm.edu.br



Continuação do Parecer: 2.921.935

(UFVJM). Serão realizados procedimentos de extração de DNA e RNA nas amostras utilizando kits de extração comercial a partir de líquido coletadas por punção suboccipital ou lombar e, serão realizadas as reações de PCR em tempo real. O PCR será padronizado utilizando kit comercial Real Time, de acordo com as características da máquina de amplificação Step-One AB Applied Biosystem. As quantidades de primers e amostra por reação serão otimizadas para cada um dos micro-organismos e a detecção será realizada através da fluorescência emitida por SYBR Green I. Para os vírus de RNA (ENTV e DENV), o RNA será, reversamente transcrito para cDNA antes da reação de PCR. A reação ocorrerá em uma placa de 48 poços. Será utilizado um poço de amostra para HSV-1/2, VZV, EBV, CMV, HHV-6, HHV-7, ENTV, ADV, Dengue, JC, Saint-Louis, West-Nile, Mycobacterium sp, Listeria sp, Cryptococcus sp, Candida sp e gene 16S cada. Poços contendo controles positivos para cada um dos vírus, fungos e bactérias serão adicionados (um para cada), além dos controles negativos. A detecção ocorrerá, simultaneamente, em "tempo real" através da medida da emissão de fluorescência específica pelo fluorocromo SYBR Green I que intercala entre as bases nitrogenadas nos amplicons formados. A intensidade de fluorescência formada é proporcional à quantidade de amplicons formados no final da reação. Devido à capacidade de latência dos vírus do grupo herpes e JCV, a determinação da carga viral é necessária para diferenciar latência de infecção ativa. Serão confeccionadas curvas-padrão para cálculo da carga viral das amostras em número de cópias de DNA viral por mililitro. Os vírus ENTV, ADV e DENV não serão quantificados, sendo, portanto, o resultado expresso em "Positivo" ou "Negativo". A Ficha Clínica será preenchida pelo médico assistente com informações adicionais sobre o paciente acerca dos dados clínicos, exames laboratoriais complementares e de imagem e desfecho clínico (favor, verificar "Ficha Clínica" em anexo). Os resultados dos PCRs serão comparados com os dados clínicos (sinais, sintomas e história clínica), exames de imagem e exames laboratoriais complementares (favor, verificar "Ficha Clínica" em Anexo). Serão realizadas análises estatísticas descritivas e de correlação das variáveis contínuas e categóricas como intuito principal de avaliar associação da hipótese diagnóstica, confirmação diagnóstica e desfecho clínico (alta sem sequelas, alta com sequelas ou óbito) com o resultado das PCRs.

Tamanho da Amostra no Brasil: 100

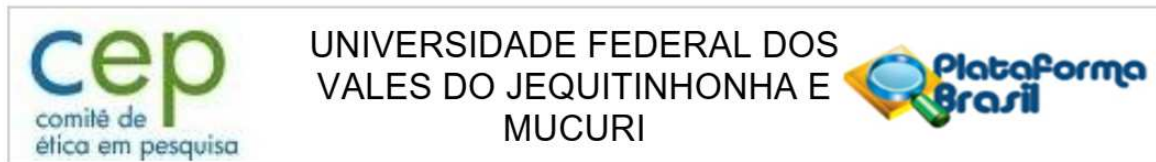
Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

A carta da Instituição Co-partícipe foi apresentada conforme Resolução 466/12.

Recomendações:

- Segundo a Carta Circular nº. 003/2011/CONEP/CNS, de 21/03/11, há obrigatoriedade de

Endereço: Rodovia MGT 367 - Km 583, nº 5000
Bairro: Alto da Jacuba **CEP:** 39.100-000
UF: MG **Município:** DIAMANTINA
Telefone: (38)3532-1240 **Fax:** (38)3532-1200 **E-mail:** cep@ufvjm.edu.br



Continuação do Parecer: 2.921.935

rubrica em todas as páginas do TCLE pelo sujeito de pesquisa ou seu responsável e pelo pesquisador, que deverá também apor sua assinatura na última página do referido termo.

- Relatórios parciais e final deverão ser apresentado ao CEP. Relatórios parciais: 1/04/2019; 1/10/2019; 1/04/2020; 1/10/2020; 1/04/2021; 1/10/2021. Relatório final em 01/01/2022 Considerase como antiética a pesquisa descontinuada sem justificativa aceita pelo CEP que a aprovou.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

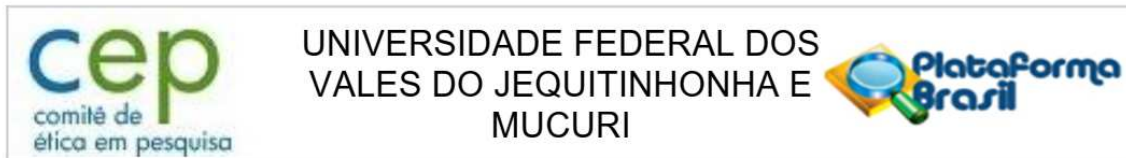
O projeto atende aos preceitos éticos para pesquisas envolvendo seres humanos preconizados na Resolução 466/12 CNS.

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1183335.pdf	25/09/2018 10:18:01		Aceito
Outros	Carta_Coparticipe_SCCD.pdf	25/09/2018 10:14:13	Ronaldo Luis Thomasini	Aceito
Outros	Ficha_Clinica.doc	26/07/2018 21:22:31	Ronaldo Luis Thomasini	Aceito
Folha de Rosto	Folha_de_rosto.pdf	26/07/2018 18:14:22	Ronaldo Luis Thomasini	Aceito
Orçamento	Orcamento.docx	26/07/2018 17:57:31	Ronaldo Luis Thomasini	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	Termo_de_Assentimento.doc	26/07/2018 17:56:46	Ronaldo Luis Thomasini	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_pais_responsaveis.doc	26/07/2018 17:56:30	Ronaldo Luis Thomasini	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.doc	26/07/2018 17:56:23	Ronaldo Luis Thomasini	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Autorizacao_uso_infraestrutura_CIPq.pdf	26/07/2018 17:55:53	Ronaldo Luis Thomasini	Aceito

Endereço: Rodovia MGT 367 - Km 583, nº 5000
Bairro: Alto da Jacuba **CEP:** 39.100-000
UF: MG **Município:** DIAMANTINA
Telefone: (38)3532-1240 **Fax:** (38)3532-1200 **E-mail:** cep@ufvjm.edu.br



Continuação do Parecer: 2.921.935

Cronograma	CRONOGRAMA.docx	26/07/2018 17:55:39	Ronaldo Luis Thomasini	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_detalhado.docx	26/07/2018 17:55:29	Ronaldo Luis Thomasini	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

DIAMANTINA, 27 de Setembro de 2018

Assinado por:
Simone Gomes Dias de Oliveira
(Coordenador(a))

Endereço: Rodovia MGT 367 - Km 583, nº 5000
Bairro: Alto da Jacuba **CEP:** 39.100-000
UF: MG **Município:** DIAMANTINA
Telefone: (38)3532-1240 **Fax:** (38)3532-1200 **E-mail:** cep@ufvjm.edu.br

ANEXO B – TERMOS DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
 Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri
 Comitê de Ética em Pesquisa



TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)

Você está sendo convidado(a) a participar de uma pesquisa intitulada: “AVALIAÇÃO DE UMA PLATAFORMA PARA DETECÇÃO SIMULTÂNEA DE DIFERENTES MICRO-ORGANISMOS NO SISTEMA NERVOSO CENTRAL PELA TÉCNICA DE PCR EM TEMPO REAL”, em virtude de ter indicação de coleta de líquido (um líquido que banha o cérebro e medula) para investigação de infecção no sistema nervoso central (cérebro e medula), coordenada pelo Professor Ronaldo Luis Thomasini e contará ainda com os Professores Silvio Pereira Ramos Júnior, Frederico Toledo Rocha, Fabiana Souza Máximo Pereira e as alunas Mônica Bertho Boaventura Serejo, Vivian Louise Syrio Pessoa e Nathany Dayrell Ferreira.

A sua participação não é obrigatória sendo que, a qualquer momento da pesquisa, você poderá desistir e retirar seu consentimento.

Os objetivos desta pesquisa é avaliar a capacidade de detecção de um painel de PCR em tempo real (uma técnica de laboratório) para descobrir se existem alguns tipos de vírus, fungos e bactérias em amostras de líquido de pacientes com doenças no cérebro ou medula causadas por estes micróbios.

Caso você decida aceitar o convite, parte do seu líquido que será coletado para exame será separado para a pesquisa e não afetará a qualidade do seu exame. Também, não será coletado líquido somente para a pesquisa, apenas quando houver necessidade de exame de líquido. O tempo previsto para a sua participação pode variar e depende do procedimento de coleta de líquido que não está relacionado diretamente com a pesquisa.

Os riscos relacionados com sua participação são os riscos de identificação e de constrangimento e serão minimizados pelo fato que seu nome, bem como, qualquer outro dado que permitiria a sua identificação (número de leito, endereço, telefone, etc...) não será divulgado e em nenhum momento, caso recuse ou desista de participar da pesquisa, o seu tratamento não será afetado ou influenciará na sua relação com a UFVJM, Santa Casa de Caridade de Diamantina, com a equipe médica ou pesquisadores. Além disso, ninguém além da equipe médica ou pesquisadores estará no local.

Você não terá benefícios diretos relacionados com a pesquisa, mas poderá ajudar a desenvolver exames novos mais precisos e que poderão ajudar outros pacientes no futuro.

Os resultados desta pesquisa poderão ser apresentados em seminários, congressos e similares, entretanto, os dados/informações pessoais obtidos por meio da sua participação serão confidenciais e sigilosos, não possibilitando sua identificação.

Não há remuneração com sua participação, bem como a de todas as partes envolvidas. Não está previsto indenização por sua participação, mas em qualquer momento se você sofrer algum dano, comprovadamente decorrente desta pesquisa, terá direito à indenização.

Não haverá pagamento de qualquer natureza visto que a pesquisa não terá custos para a sua participação.

Você receberá uma via deste termo onde constam o telefone e o endereço do pesquisador principal, podendo tirar suas dúvidas sobre o projeto e sobre sua participação agora ou em qualquer momento.

Coordenador do Projeto Prof. Dr. Ronaldo Luis Thomasini:

Endereço Av. Dr. Silvio Felício dos Santos, nº 1020, Bom Jesus, Diamantina, MG.

Telefone (31) 99955-0208

Declaro que entendi os objetivos, a forma de minha participação, riscos e benefícios da mesma e, aceito o convite para participar. Autorizo a publicação dos resultados da pesquisa, a qual garante o anonimato e o sigilo referente à minha participação.

Marcar aqui com um "X" caso deseje que sua identidade seja revelada (Resolução 510/16).

Nome do participante da

Assinatura do participante da pesquisa: _____



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri
Comitê de Ética em Pesquisa



TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)

Seu/sua filho(a) está sendo convidado(a) a participar de uma pesquisa intitulada: “AVALIAÇÃO DE UMA PLATAFORMA PARA DETECÇÃO SIMULTÂNEA DE DIFERENTES MICRO-ORGANISMOS NO SISTEMA NERVOSO CENTRAL PELA TÉCNICA DE PCR EM TEMPO REAL”, em virtude de ter indicação de coleta de líquido (um líquido que banha o cérebro e medula) para investigação de infecção no sistema nervoso central (cérebro e medula), coordenada pelo Professor Ronaldo Luis Thomasini e contará ainda com os Professores Silvio Pereira Ramos Júnior, Frederico Toledo Rocha, Fabiana Souza Máximo Pereira e as alunas Mônica Bertho Boaventura Serejo, Vivian Louise Syrio Pessoa e Nathany Dayrell Ferreira.

A participação de seu/sua filho(a) não é obrigatória sendo que, a qualquer momento da pesquisa, poderá desistir e retirar seu consentimento.

Os objetivos desta pesquisa é avaliar a capacidade de detecção de um painel de PCR em tempo real (uma técnica de laboratório) para descobrir se existem alguns tipos de vírus, fungos e bactérias em amostras de líquido de pacientes com doenças no cérebro ou medula causadas por estes micróbios.

Caso você decida aceitar o convite para seu/sua filho(a), parte do líquido dele/dela que será coletado para exame será separado para a pesquisa e não afetará a qualidade do exame dele/dela. Também, não será coletado líquido somente para a pesquisa, apenas quando houver necessidade de exame de rotina do líquido. O tempo previsto para a participação pode variar e depende do procedimento de coleta de líquido que não está relacionado diretamente com a pesquisa. Os riscos relacionados com a participação de seu/sua filho(a) são os riscos de identificação e de constrangimento e serão minimizados pelo fato que nome dele/dela, bem como, qualquer outro dado que permitiria a identificação dele/dela (número de leito, endereço, telefone, etc...) não será divulgado e em nenhum momento, caso recuse ou desista de participar da pesquisa, o tratamento dele/dela não será afetado ou influenciará na relação sua ou dele/dela com a UFVJM, Santa Casa de Caridade de Diamantina, com a equipe médica ou pesquisadores. Além disso, ninguém além da equipe médica ou pesquisadores estará no local.

Ele/ela não terá benefícios diretos relacionados com a pesquisa, mas poderá ajudar a desenvolver exames novos mais precisos e que poderão ajudar outros pacientes no futuro.

Os resultados desta pesquisa poderão ser apresentados em seminários, congressos e similares, entretanto, os dados/informações pessoais obtidos por meio da participação dele/dela serão confidenciais e sigilosos, não possibilitando identificação dele/dela.

Não há remuneração com participação dele/dela, bem como a de todas as partes envolvidas. Não está previsto indenização pela participação dele/dela, mas em qualquer momento se ele/ela sofrer algum dano, comprovadamente decorrente desta pesquisa, terá direito à indenização.

Não haverá pagamento de qualquer natureza visto que a pesquisa não terá custos para a participação dele/dela.

Você receberá uma via deste termo onde constam o telefone e o endereço do pesquisador principal, podendo tirar suas dúvidas sobre o projeto e sobre sua participação agora ou em qualquer momento.

Coordenador do Projeto Prof. Dr. Ronaldo Luis Thomasini:

Endereço Av. Dr. Silvio Felício dos Santos, nº 1020, Bom Jesus, Diamantina, MG.

Telefone (31) 99955-0208

Declaro que entendi os objetivos, a forma de minha participação, riscos e benefícios da mesma e, aceito o convite para participar. Autorizo a publicação dos resultados da pesquisa, a qual garante o anonimato e o sigilo referente à minha participação.

Marcar aqui com um "X" caso deseje que identidade dele/dela seja revelada (Resolução 510/16).

Nome do participante da pesquisa: _____

Assinatura do participante da pesquisa: _____

--

Termo de Assentimento do Menor

(12 a 18 anos incompletos)

O termo de assentimento não elimina a necessidade de fazer o termo de consentimento livre e esclarecido que deve ser assinado pelo responsável ou representante legal do menor.

Você está sendo convidado para participar da pesquisa “AVALIAÇÃO DE UMA PLATAFORMA PARA DETECÇÃO SIMULTÂNEA DE DIFERENTES MICRO-ORGANISMOS NO SISTEMA NERVOSO CENTRAL PELA TÉCNICA DE PCR EM TEMPO REAL” pelo motivo ter indicação de coleta de líquido (um líquido que banha o cérebro e medula) para investigação de infecção no sistema nervoso central (cérebro e medula). Seus pais permitiram que você participe. Queremos saber se um novo tipo de exame de laboratório é útil para descobrir se existem alguns tipos de vírus, fungos e bactérias em amostras de líquido de pacientes com doenças no cérebro ou medula causadas por estes micróbios. Os jovens que irão participar dessa pesquisa têm de 12 a 17 anos de idade. Você não precisa participar da pesquisa se não quiser, é um direito seu, não terá nenhum problema se desistir. A pesquisa será feita na Santa Casa de Caridade de Diamantina, onde os jovens que precisarem fazer exame de líquido terão uma parte da amostra separada para a pesquisa. Para isso, será usado parte do seu líquido que for coletado. A separação do líquido é considerada segura, pois, você não passará por qualquer procedimento a mais, mas é possível ocorrer de identificação ou constrangimento que serão minimizados pelo fato que seu nome ou qualquer outro dado que possa identificá-lo não será revelado. Também, o constrangimento será minimizado porque ninguém além da equipe médica ou pesquisadores estará no local e você não será pressionado a participar da pesquisa se não quiser. Caso aconteça algo errado, você pode nos procurar pelo telefone (31) 99955-0208 do pesquisador Ronaldo Luis Thomasini. Mas há coisas boas que podem acontecer como o desenvolvimento de novos exames para doentes no futuro. Ninguém saberá que você está participando da pesquisa, não falaremos a outras pessoas, nem daremos a estranhos as informações que você nos der. Os resultados da pesquisa vão ser publicados, mas sem identificar os jovens que participaram da pesquisa. Quando terminarmos a pesquisa iremos publicar o resultado em congressos, artigos científicos, conferências, etc..., mas nunca seus dados pessoais. Se você tiver alguma dúvida, você pode me perguntar ou a pesquisador Ronaldo Luis Thomasini. Eu escrevi os telefones na parte de baixo desse texto.

Eu _____ aceito participar da pesquisa “AVALIAÇÃO DE UMA PLATAFORMA PARA DETECÇÃO SIMULTÂNEA DE DIFERENTES MICRO-ORGANISMOS NO SISTEMA NERVOSO CENTRAL PELA TÉCNICA DE PCR EM TEMPO REAL”, que tem o objetivo saber se um novo tipo de exame de laboratório é útil para descobrir se existem alguns tipos de vírus, fungos e bactérias em amostras de líquido de pacientes com doenças no cérebro ou medula causadas por estes micróbios. Entendi as coisas ruins e as coisas boas que podem acontecer. Entendi que posso

dizer “sim” e participar, mas que, a qualquer momento, posso dizer “não” e desistir que ninguém vai ficar furioso. Os pesquisadores tiraram minhas dúvidas e conversaram com os meus responsáveis. Recebi uma via deste termo de assentimento e li e concordo em participar da pesquisa.

Diamantina, ____ de _____ de _____.

Assinatura do menor

Prof. Dr. Ronaldo Luis Thomasini
Pesquisador Responsável
Telefone do pesquisador: (31) 99955-0208

ANEXO C - CADASTRO NO SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL ASSOCIADO



Ministério do Meio Ambiente
CONSELHO DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO
SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL ASSOCIADO

Comprovante de Cadastro de Acesso
Cadastro nº AEA5D00

A atividade de acesso ao Patrimônio Genético, nos termos abaixo resumida, foi cadastrada no SisGen em atendimento ao previsto na Lei nº 13.123/2015 e seus regulamentos.

Número do cadastro:	AEA5D00
Usuário:	UFVJM
CPF/CNPJ:	16.888.315/0001-57
Objeto do Acesso:	Patrimônio Genético
Finalidade do Acesso:	Pesquisa

Espécie

Herpes Simples I/II
Epstein-Barr
Varicela-Zoster
Citomegalovirus
Herpesvirus Humano 6
Herpesvirus Humano 7
Adenovirus
John Cunningham Virus (JCV)
Enterovirus
Dengue vírus
Zika Virus
Chikungunya Vírus
West-Nile Virus

Saint-Louis Vírus

Cryptococcus neoformans

Paracoccidioides brasiliensis

Toxoplasma gondii

Cryptococcus gattii

Título da Atividade:

**MINI-ARRANJO DE PCR EM TEMPO REAL PARA DIAGNÓSTICO DE
INFECÇÕES VIRAIS E FÚNGICAS NO SISTEMA NERVOSO CENTRAL EM
HUMANOS**

Equipe

Ronaldo Luis Thomasini

UFVJM

THYAGO JOSE SILVA

UFVJM

Data do Cadastro:

09/03/2020 22:18:13

Situação do Cadastro:

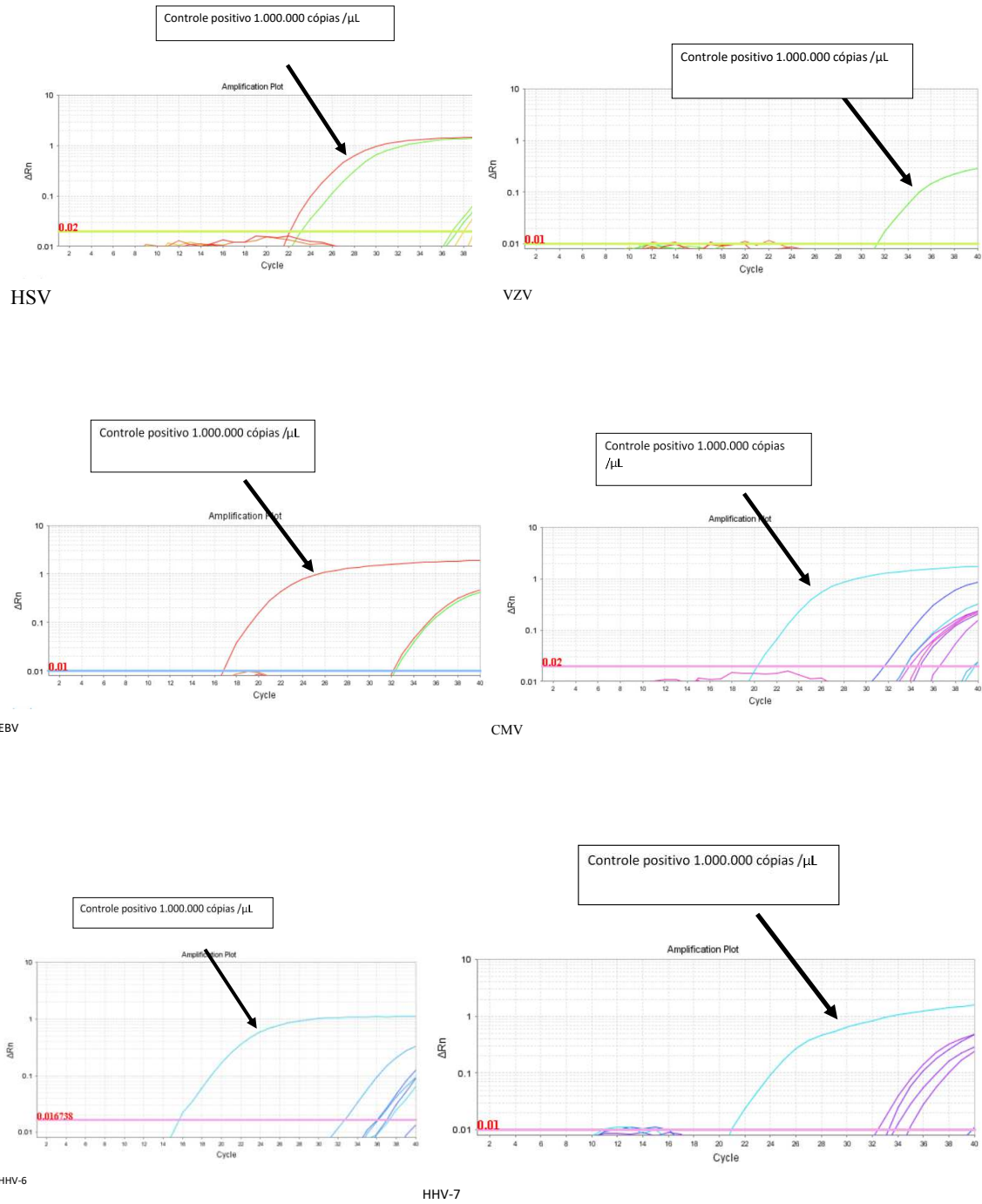
Concluído

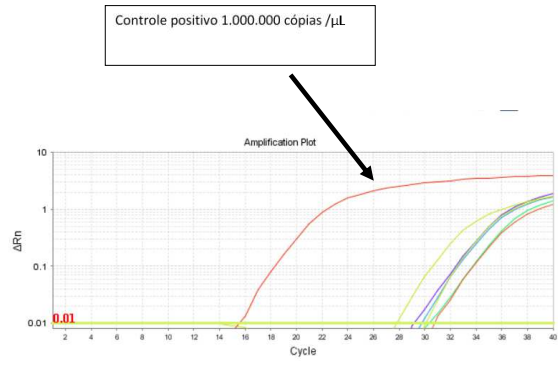
Conselho de Gestão do Patrimônio Genético
Situação cadastral conforme consulta ao SisGen em 22:18 de 09/03/2020.



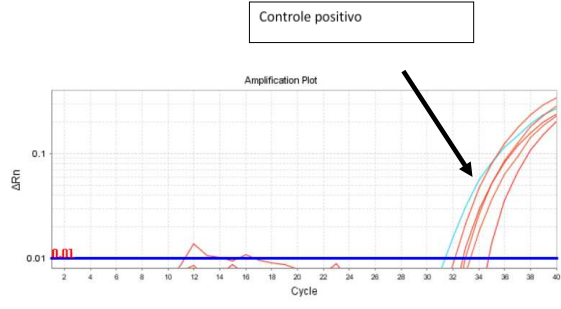
SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO
DO PATRIMÔNIO GENÉTICO
E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL
ASSOCIADO - **SISGEN**

ANEXO D - CURVAS DE AMPLIFICAÇÃO DOS CONTROLES POSITIVOS

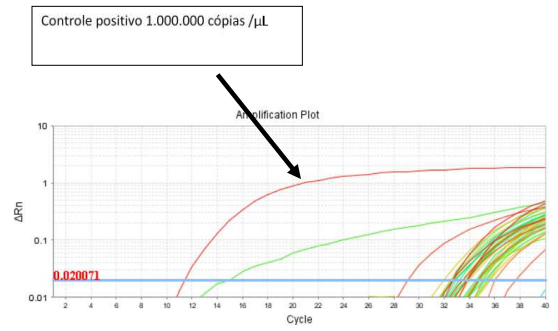




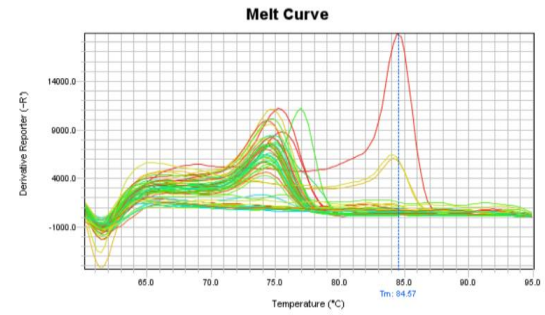
ADV



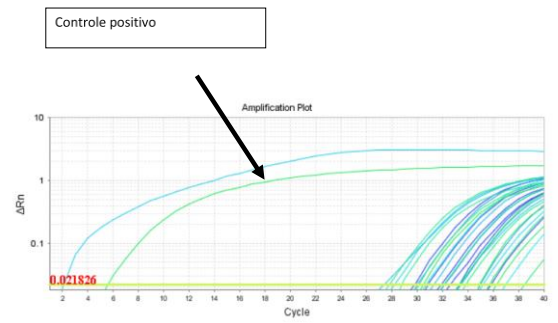
ENTV



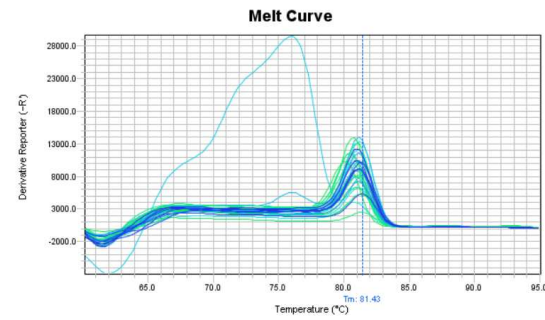
DENV



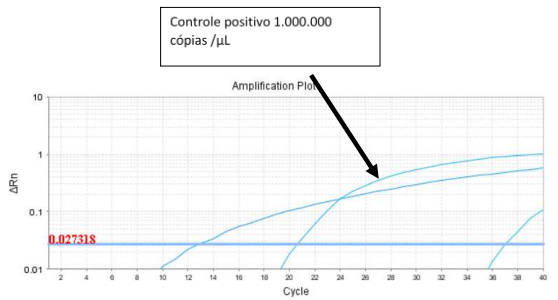
DENV - MELT



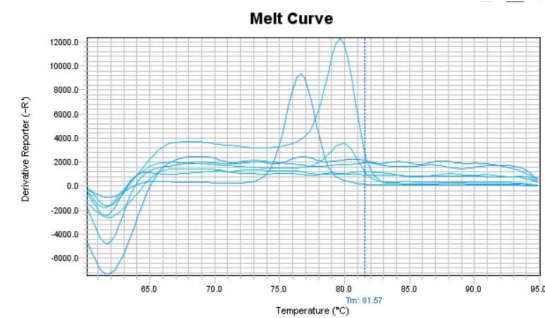
ZIKV



ZIKV MELT



CHIKV



CHIKV MELT