



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS

LIDIA CRISTIAN DE OLIVEIRA BOFFI

INVESTIGAÇÃO MOLECULAR DE ARBOVÍRUS EM LÍQUIDO
CEFALORRAQUIDIANO (LCR) DE PACIENTES PEDIÁTRICOS COM
INDÍCIOS DE NEUROINFECÇÃO

CAMPINAS

2022

LIDIA CRISTIAN DE OLIVEIRA BOFFI

INVESTIGAÇÃO MOLECULAR DE ARBOVÍRUS EM LÍQUIDO
CEFALORRAQUIDIANO (LCR) DE PACIENTES PEDIÁTRICOS COM
INDÍCIOS DE NEUROINFECÇÃO

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Médicas da
Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos
exigidos para a obtenção do título de Mestra em Ciências, na área
de Saúde da Criança e do Adolescente.

ORIENTADORA: PROF^a DR^a SANDRA HELENA ALVES BONON

ESTE TRABALHO CORRESPONDE À VERSÃO
FINAL DA DISSERTAÇÃO DEFENDIDA PELA
ALUNA LIDIA CRISTIAN DE OLIVEIRA BOFFI, E ORIENTADO PELA
PROFA. DRA. SANDRA HELENA ALVES BONON.

CAMPINAS

2022

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Ciências Médicas
Maristella Soares dos Santos - CRB 8/8402

B633i Boffi, Lidia Cristian de Oliveira, 1988-
Investigação molecular de arbovírus em líquido cefalorraquidiano (LCR) de
pacientes pediátricos com indícios de neuroinfecção / Lidia Cristian de Oliveira
Boffi. – Campinas, SP : [s.n.], 2022.

Orientador: Sandra Helena Alves Bonon.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade
de Ciências Médicas.

1. Arbovírus. 2. Crianças. 3. Dengue. 4. Zika virus. 5. Líquido
cefalorraquidiano. 6. Doenças do sistema nervoso. I. Bonon, Sandra Helena
Alves. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas.
III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Arbovirus associated with neurological syndromes in pediatric
patients of a university hospital, 2017-2018 : arboviruses in children with neurological
syndrome

Palavras-chave em inglês:

Arboviruses

Children

Dengue

Zika virus

Cerebrospinal fluid

Nervous system diseases

Área de concentração: Saúde da Criança e do Adolescente

Titulação: Mestra em Ciências

Banca examinadora:

Sandra Helena Alves Bonon [Orientador]

Maria Rita Donalisio Cordeiro

Gláucia Elisete Barbosa Marcon

Data de defesa: 21-02-2022

Programa de Pós-Graduação: Saúde da Criança e do Adolescente

Identificação e informações acadêmicas do(a) aluno(a)

- ORCID do autor: <http://orcid.org/0000-0002-2107-5920>

- Currículo Lattes do autor: <http://lattes.cnpq.br/5794156144280815>

COMISSÃO EXAMINADORA DA DEFESA DE MESTRADO

LIDIA CRISTIAN DE OLIVEIRA BOFFI

ORIENTADORA: PROFA. DRA. SANDRA HELENA ALVES BONON

MEMBROS:

- 1. PROFA. DRA. SANDRA HELENA ALVES BONON**
- 2. PROFA. DRA. MARIA RITA DONALÍSIO CORDEIRO**
- 3. PROFA. DRA. GLÁUCIA ELISETTE BARBOSA MARCON**

Programa de Pós-Graduação em Saúde da Criança e do Adolescente da
Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

A ata de defesa com as respectivas assinaturas dos membros encontra-se no
SIGA/Sistema de Fluxo de Dissertação/Tese e na Secretaria do Programa da
FCM.

Data de Defesa: 21/02/2022

DEDICATÓRIA

À Deus e minha família pelo amor incondicional e pelo apoio presente nessa jornada.

À Prof^a. Dra. Sandra Helena Alves Bonon por todas as orientações, ensinamentos e incentivo transmitidos ao longo do desenvolvimento deste trabalho pela contribuição no meu crescimento acadêmica e profissional.

Ao Laboratório de Líquidos Biológicos do HC/UNICAMP por cederem as amostras biológicas usadas para realização deste estudo.

Ao Laboratório de Virologia da Faculdade de Ciências Médicas/UNICAMP por todo suporte na realização de cada experimento, a todos os seus integrantes pela acolhida e contribuições.

Aos meus amigos do mestrado, alunos de doutorado e funcionários pela convivência, companheirismo e incentivo.

A todos aqueles que contribuíram, direta ou indiretamente, para a construção e conclusão deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (**FAPESP**), que financiou a pesquisa que deu origem ao trabalho, “*processo nº 2016/17031-4, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)*”.

“O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001”.

RESUMO

Objetivos: Investigar a presença de genomas de arbovírus transmitidos pelo *Aedes spp*, através de testes de biologia molecular a partir de líquido cefalorraquidiano (LCR) de crianças com suspeita de infecção no sistema nervoso, e associar os resultados com os sinais e sintomas de disfunção neurológica e/ou sistêmica e resultado dos exames bioquímicos, microbiológicos e citológicos no LCR.

Métodos: Este estudo transversal incluiu 184 amostras de LCR de crianças de 1 (um) dia de vida a 18 anos de idade (mediana de 2,2 anos) com testes microbiológicos negativos, atendidas em um hospital universitário e com suspeita de infecção viral no sistema nervoso. Foi coletado por punção o LCR dos pacientes e extraído o RNA. Foram utilizadas técnicas de biologia molecular RT-Nested-PCR e RT-qPCR para identificação de genomas dos arbovírus das famílias *Togaviridae* (Alfavírus), *Flaviviridae* (Flavivírus) e *Bunyaviridae*, e os resultados foram analisados de acordo com os achados clínicos.

Resultados: Do total de 184 crianças incluídas, 57% eram do sexo masculino. Usando os testes moleculares, foi identificada a prevalência do genoma dos vírus Dengue e Zika em 23,9% (44/184) das amostras de LCR, sendo que em 59% (26/44) era pelo vírus Dengue e 38,6% (17/44) pelo vírus Zika. Uma amostra apresentou coinfeção Dengue+Zika (2,3%). Destes pacientes com LCR-positivo, 16/67 (23,9%) tinham suspeita de infecção/seps, 3/26 (11,5%) meningite; 5/22 (22,7%) hidrocefalia; 5/20 (25%) convulsão e 1/4 (25%) encefalite; 3/5 (60%) tiveram hipertensão intracraniana (HIC); 1/3 (33,3%) cada, dos casos de neurite e meningoencefalite; 3/8 (37,5%) em outros e 2/2 dos casos de rebaixamento do nível de consciência, síndrome de Guillain-Barré e arbovirose/zika, cada. Os resultados microbiológicos no LCR foram negativos. Pleocitose no LCR ocorreu em 25% dos casos positivos e o uso de antibióticos foi realizado em 56,8% dos pacientes.

Conclusões: A prevalência dos vírus Zika e Dengue no LCR de crianças com síndromes neurológicas foi considerada alta e a maioria das amostras positivas não apresentaram alterações no LCR. O quadro clínico apresentado nos casos

positivos foram infecção/seps, meningite, hidrocefalia, convulsão, encefalite, hipertensão intracraniana, neurite, meningoencefalite, rebaixamento do nível de consciência e síndrome de Guillain-Barré (SGB). Com a incorporação dos exames moleculares no líquido cefalorraquidiano (LCR), o diagnóstico de infecções neurológicas é mais rápido e preciso e isso é essencial na identificação de genomas de patógenos virais nas neuroinfecções, conseqüentemente, seria reduzida a utilização de antibióticos e dos períodos de hospitalização.

Palavras-Chave: arbovírus; crianças; dengue; zika; doenças do sistema nervoso; líquido cefalorraquidiano.

ABSTRACT

Objectives: To investigate the presence of arbovirus genomes transmitted by *Aedes spp*, using molecular biology techniques from cerebrospinal fluid (CSF) samples from children with suspected of neuroinfection, and to associate the results with the signs and symptoms of dysfunction neurological and/or systemic and results of biochemical, microbiological and cytological exams in the CSF.

Methods: This cross-sectional study included children aged from 1 (one) day to 18 years, treated at a university hospital and suspected of having a viral infection in the nervous system. Patients' CSF was collected by puncture and RNA was extracted. Molecular biology techniques were used to identify genomes of arboviruses from the families *Togaviridae* (Alfavirus), *Flaviviridae* (Flavivirus), and *Bunyaviridae*

Results: Of the total of 184 children included, 57% were male. Using molecular tests, the prevalence of the genome of Dengue and Zika viruses was identified in 23.9% (44/184) of CSF samples, 59% (26/44) of which was due to Dengue virus and 38.6% (17/44) by the Zika virus. One sample had Dengue+Zika coinfection (2.3%). Of these CSF-positive patients, 16/67 (23.9%) had suspected infection/sepsis, 3/26 (11.5%) meningitis; 5/22 (22.7%) hydrocephalus; 5/20 (25%) seizure and 1/4 (25%) encephalitis; 3/5 (60%) had intracranial hypertension (ICH); 1/3 (33.3%) each, of the cases of neuritis and meningoencephalitis; 3/8 (37.5%) in others and 2/2 of the cases of decreased level of consciousness, Guillain-Barré syndrome and arbovirus/Zika, each. Microbiological results in the CSF were negative. CSF pleocytosis occurred in 25% of positive cases and antibiotic use was performed in 56.8% of patients.

Conclusions: The prevalence of Zika and Dengue viruses in the CSF of children with neurological syndromes was high and most positive samples did not show changes in the CSF. Symptoms of positive cases were infection/sepsis, meningitis, hydrocephalus, seizure, encephalitis, intracranial hypertension, neuritis, meningoencephalitis, lowered level of consciousness and Guillain-Barré syndrome (GBS). With the incorporation of molecular exams in the cerebrospinal fluid (CSF), the diagnosis of neurological infections is faster and more accurate

and this is essential in the identification of pathogen genomes in neuroinfections, consequently, the use of antibiotics and periods of hospitalization would be reduced.

Keywords: arboviruses; children; dengue; zika; nervous system diseases; cerebrospinal fluid.

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Representação esquemática do genoma dos <i>FLAVIVIRUS</i>	20
Figura 2. Organização do genoma dos <i>ALPHAVIRUS</i> .	29
Figura 3. Organização do genoma do gênero <i>ORTHOBUNYAVIRUS</i> .	34

LISTA DE TABELAS

	Pág.
Tabela 1. Sequência dos iniciadores utilizados na identificação do gênero e espécie dos arbovírus estudados utilizando as técnicas de RT-Nested-PCR e RT-qPCR	40
Artigo 1	
Table 1: Patient's characteristics, genome prevalence of DENV and ZIKV arboviruses in CSF samples in relation with IDH	56
Table 2: Positive results of the molecular tests for DENV and ZIKV genomes in CSF samples of pediatric patients with neurological manifestations and association with IDH	57
Table 3: Comparison between positive and negative CSF for DENV and ZIKV viruses of patients in relation to the Initial Diagnostic Hypothesis (HDI)	58
Table 4: Patients with DENV and ZIKV positive genomes and association with the main signs and symptoms, biochemical and cytological parameters in CSF, and treatment.	59

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AURAV	Vírus Aura
CDC	Centers for Disease Control and Prevention
CHIKV	Vírus Chikungunya
DENV	Vírus Dengue
ECSA	East; Central; South;African
EEEV	Vírus Encefalite Equina do Leste
EUA	Estados Unidos da América
GVE	Grupo de Vigilância Epidemiológica
IgG	Imunoglobulina G
ILHV	Vírus Ilhéus
JEV	Vírus Encefalite Japonesa
Kb	Kilobase
LCR	Líquido cefalorraquidiano
MAYV	Vírus Mayaro
MS	Ministério da Saúde
nm	Nanômetro
OMS	Organização Mundial da Saúde
OROV	Vírus Oropouche
RNA	Ácido Ribonucléico
ROCV	Vírus Rocio
SE	Semana Epidemiológica

SLEV	Vírus Saint Louis
SNC	Sistema Nervoso Central
USA	United States of American
VEEV	Vírus Encefalite Equina Venezuelana
WEEV	Vírus Encefalite Equina do Oeste
WNV	Vírus West Nile
YFV	Vírus Febre Amarela
ZIKV	Vírus Zika

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	17
1.1 FAMÍLIA <i>FLAVIVIRIDAE</i>	19
1.1.1 Vírus Dengue (DENV)	20
1.1.2 Vírus da Encefalite de Saint Louis (SLEV)	21
1.1.3 Vírus Rocio (ROCV)	22
1.1.4 Vírus Oeste do Nilo (WNV)	23
1.1.5 Vírus Ilhéus (ILHV)	24
1.1.6 Vírus da Febre Amarela (YFV)	25
1.1.7 Vírus Zika (ZIKV)	26
1.2 FAMÍLIA <i>TOGAVIRIDAE</i>	28
1.2.1. Vírus Chikungunya (CHIKV)	29
1.2.2 Vírus da Encefalite Equina do Leste (EEEV)	30
1.2.3 Vírus da Encefalite Equina do Oeste (WEEV)	31
1.2.4 Vírus da Encefalite Equina Venezuelana (VEEV)	32
1.2.5 Vírus Mayaro (MAYV)	33
1.2.6 Vírus Aura (AURAV)	33
1.3 FAMÍLIA <i>BUNYAVIRIDAE</i>	34
1.3.1 Vírus Oropouche (OROV)	35
1.4 Arboviroses e manifestações neurológicas	36
2. OBJETIVOS.....	37
2.1 Objetivo geral	37
2.2 Objetivo específico	37
3. METODOLOGIA.....	38
3.1 Pacientes e Métodos	38
3.2 Critérios de Inclusão	38
3.3 Critérios de Exclusão	39
3.4 Métodos Laboratoriais	39
3.5 Análise estatística	42
4. RESULTADOS.....	43
ARTIGO 1. SUBMETIDO	43
ARTIGO 1.	44
5. CONCLUSÃO.....	63
6. REFERÊNCIAS.....	64

7. ANEXOS	72
ANEXO 1. APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA	72

1. INTRODUÇÃO

Os arbovírus (Arthropod-borne viruses) são vírus transmitidos aos seres humanos e alguns animais através do sangue pela picada de insetos hematófagos. Estes vírus utilizam artrópodes para se multiplicar, incluindo os insetos dípteros dos gêneros *Aedes* e *Culex*, que são os principais vetores da transmissão. Estima-se que existam mais de 500 espécies de arbovírus, sendo que cerca de 150 espécies causam doenças em seres humanos, a maioria de origem zoonótica, ou seja, envolvem um vetor e um animal silvestre, sendo que os seres humanos e os animais domésticos são hospedeiros por acaso.^{1,2}

As arboviroses são as doenças causadas pelos arbovírus, estão espalhados pelo mundo e frequentemente são relacionados a surtos epidêmicos, representando uma ameaça à saúde pública, causando síndromes articulares, síndromes hemorrágicas, infecções sistêmicas e neurológicas. Nos últimos anos, a prevalência de doenças transmitidas por vetores tem crescido consideravelmente, devido ao intenso tráfego humano e à expansão comercial, contribuindo para o aumento destes surtos. Várias espécies de arbovírus têm se tornado constantes ameaças, pela preferência por regiões que apresentam condições climáticas, ambientais e sociais mais favoráveis para a circulação do vetor, favorecendo a amplificação e transmissão viral.^{3,4}

A maioria das infecções causadas pelos arbovírus em seres humanos não apresentam sintomas, porém, podem levar às manifestações clínicas de quadros febris inespecíficos, seguidos por um ou mais sintomas de cefaleia, náusea, vômitos, dor retrorbital, mialgia, artralgia e petéquias, podendo levar a síndromes neurológicas mais graves, sendo que os sintomas são semelhantes tanto em crianças quanto em adultos.^{5,6}

Em crianças, as manifestações neurológicas mais descritas são convulsões, sinais de meningite com início agudo de febre, vômitos, cefaleia, rigidez de nuca, sinais de encefalite, alteração da consciência, aumento da pressão intracraniana, sonolência e tremores. Pacientes pediátricos com infecção no sistema nervoso causada por arbovírus não costumam apresentar sintomas clássicos destas infecções, portanto, a utilização de técnicas laboratoriais para diagnóstico diferencial das infecções neurológicas no LCR se

torna indispensável e também é evidente a importância da identificação do agente etiológico causador da neuroinfecção.⁵

O comprometimento neurológico causado por arbovírus pode ser originado durante ou após o início da infecção. Após a circulação dos arbovírus Dengue (DENV), Chikungunya (CHIKV) e Zika (ZIKV) no Brasil ao mesmo tempo, a epidemiologia das infecções neurológicas e das manifestações neurológicas tem sido monitoradas pelo Ministério da Saúde (MS), para avaliar o perfil destes casos, como também identificar os possíveis agentes etiológicos envolvidos e captar o aparecimento, disseminação ou a reemergência de outros arbovírus que apresentam tropismo pelo sistema nervoso.⁷

Entre 2017 a 2019, 715 casos suspeitos de doenças neuroinvasivas por arbovírus no Brasil foram notificados. Em 2017, foram 89 (12,5%) casos, em 2018 foram 244 (34,1%) casos em 2019 foram 382 (53,4%) casos. Em 2018 houve um aumento de 174,2% do número de casos notificados em comparação ao ano de 2017, e em 2019 representa um aumento de 56,6% quando comparado a 2018.⁷ Em relação aos casos de notificação de doenças neuroinvasivas na população pediátrica, a faixa etária de 10 a 19 anos foi a mais atingida, sendo 15 (16,9%) pacientes em 2017, 46 casos (18,9%) em 2018 e 55 casos (14,4%) em 2019.⁷

Atualmente, no Brasil, os arbovírus de maior circulação são DENV, ZIKV, CHIKV e o vírus da Febre Amarela.⁸ Desde 2015, ocorre a circulação desses arbovírus, e mais da metade dos casos notificados entre 2008 e 2019 ocorreram nos últimos 5 anos. Diante deste panorama, o número de casos, óbitos e letalidade causados por essas arboviroses, foram relatados aproximadamente 11,6 milhões de casos de DENV, CHIKV e ZIKV, sendo que, neste mesmo período, foram confirmados 7.043 óbitos por doenças causadas por estes vírus. Em relação ao vírus dengue, 91% dos casos (10,6 milhões de casos) e 91,2% dos óbitos (6.429 óbitos) foi devido a esta virose, em 2015 ocorreu o maior número de óbitos, com 986 mortes confirmadas, concentrando o maior número de casos, demonstrando a importância dessas arboviroses frente às demais. Em relação aos números de casos dessas arboviroses, os anos que apresentaram aumento foram 2015, 2016 e 2019, respectivamente. Em relação às taxas de letalidade causada pela doença do vírus dengue, as maiores taxas foram nos anos de 2008, 2009, 2014, 2016, 2017 e 2018, anos com menores registros de

casos. As maiores taxas de letalidade de CHIKV ocorreram em 2016 e 2017 e ZIKV em 2018 e 2019.⁹

1.1 FAMÍLIA *FLAVIVIRIDAE*

A família *FLAVIVIRIDAE*, do gênero *Flavivirus*, possui um grupo importante de espécies de arbovírus que causam epidemias e diversas doenças humanas que se manifestam em quadros distintos de febre aguda, síndromes hemorrágicas e neurológicas. Neste grupo destacam-se os vírus da Dengue (sorotipos 1, 2 3 e 4), o vírus da Encefalite de Saint Louis (*SLEV*), vírus Rocio (*ROCV*), vírus Oeste do Nilo (*WNV*), vírus Ilhéus (*ILHV*), vírus da Febre Amarela (*YFV*) e vírus Zika (*ZIKV*), associados a altas taxas de mortalidade e morbidade.^{1,10}

A partícula viral dos *Flavivirus* mede aproximadamente 50nm de diâmetro, tem um capsídeo icosaédrico proteico (C), envolvido por um envelope lipídico onde estão as proteínas de membrana (M) e as espículas de natureza glicoproteica (E). O genoma é formado por RNA de fita simples de polaridade positiva (+ssRNA), contendo aproximadamente 11 kilobases (kb) de comprimento, codifica uma única sequência de leitura aberta (ORF, open reading frame) com 10.233 nucleotídeos que codificam as proteínas virais, flanqueada por regiões não codificantes (UTR, untranslated region) nas terminações 5' e 3' sendo importantes para a regulação e expressão do vírus. A tradução do genoma pela célula hospedeira codifica apenas uma poliproteína que então codifica três proteínas estruturais: proteína C do capsídeo, proteína do envelope prM (precursora de M) e a proteína E, que formam a partícula viral. Além destas, o genoma codifica sete proteínas não estruturais (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5) responsáveis pela replicação, virulência e patogenicidade do vírus (Figura 1).^{10,11,12}

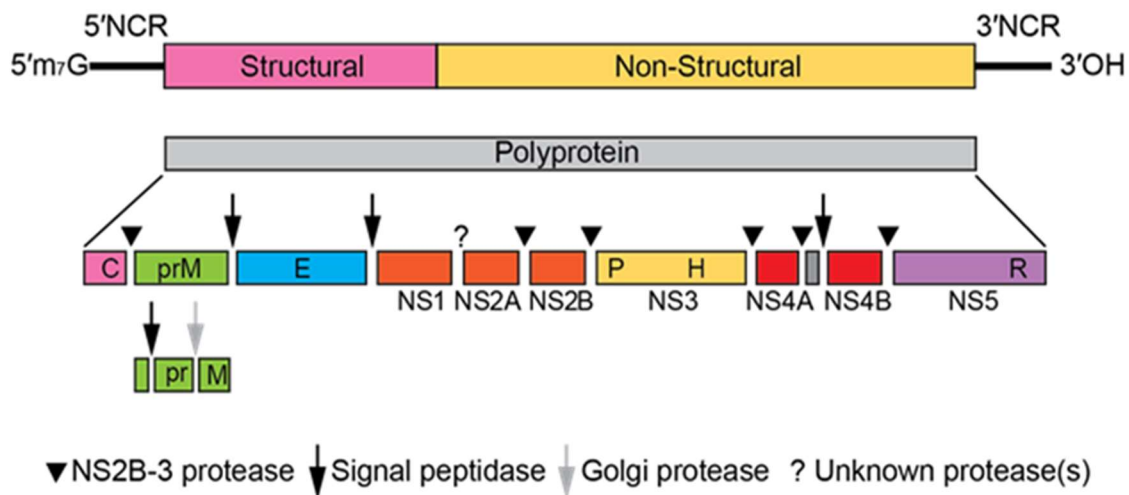


Figura 1: Apresentação esquemática do genoma dos *Flavivirus*.

Fonte: International committee on taxonomy of viruses – ICTV ⁵⁵

1.1.1 Vírus Dengue (DENV)

O vírus Dengue é uma arbovírus de maior relevância no contexto epidemiológico, que mais se espalha pelo mundo e é considerado um grande problema em saúde pública no continente americano. Estima-se que aproximadamente 2,5 bilhões de pessoas no mundo vivam em áreas com risco de transmissão do vírus, e que ocorra cerca de 100 milhões de infecções e 20 mil mortes anualmente. A infecção pode ser assintomática e, quando sintomática, causa um quadro febril agudo e sintomas leves, porém, pequena porcentagem dos infectados evolui para doença e morte. O vírus Dengue possui quatro sorotipos em circulação no Brasil (1, 2, 3 e 4), induzindo imunidade específica a cada um deles, portanto, uma segunda infecção causada por outro sorotipo do vírus pode se tornar de alto risco para o desenvolvimento das formas mais graves da doença.^{11,13}

A manifestação inicial causada da infecção causada pelo vírus Dengue é a febre alta (39°C a 40°C), com início repentino, que pode durar de 2 a 7 dias, associado à cefaleia, mialgias, artralrias, dor retroorbital e exantemas. A ocorrência de náuseas, vômitos e perda de peso são comuns na fase febril inicial da doença, sendo difícil diferenciá-la de outras doenças comuns da infância.

Muitos estudos relatam sintomas neurológicos como forma grave da doença causada pelo vírus Dengue.^{13,14}

O vírus DENV se mantém na natureza através de ciclos silvestres e ciclos urbanos e, além do vetor *Aedes aegypti* (artrópode hematófago), outras espécies como o *Aedes albopictus* são consideradas vetores secundários. Ao picar uma pessoa infectada com algum dos quatro sorotipos do vírus os sintomas evoluem após o tempo de incubação que é de 4 a 10 dias.^{13,14}

A primeira epidemia do DENV no Brasil foi relatada em 1981 no estado de Roraima, sendo isolados DENV-1 e DENV-4. No Rio de Janeiro, em 1985, 1990 e 2000, respectivamente, foram introduzidos os sorotipos de DENV-1, 2 e -3. Finalmente o DENV-4 foi isolado em Manaus, sugerindo sua circulação naquela cidade. Atualmente todos esses sorotipos circulam no país e são responsáveis por grandes surtos, incluindo muitos casos de dengue mais grave.^{15,16}

Em 2017, entre a Semana Epidemiológica (SE) 1 e a SE 52, foram registrados 239.389 casos prováveis de doença causada pelo DENV. Em 2018, até a SE 49 (31/12/2017 a 10/12/2018), foram registrados prováveis 247.393 casos de DENV no país, com uma incidência de 118,7 casos/100 mil habitantes e, destes, 159.718 (64,6%) casos foram confirmados. Dos casos notificados, 176.205 foram descartados.¹⁷

1.1.2 Vírus da Encefalite de Saint Louis (SLEV)

O vírus que causa a encefalite de Saint Louis tem tropismo pelo sistema nervoso e é membro do complexo antigênico da encefalite japonesa (JEV). Foi isolado pela primeira vez em 1933, na cidade de Saint Louis, Missouri, USA. O vírus é amplamente distribuído em todas as Américas, onde tem reemergido desde 2002 causando surtos nos Estados Unidos, Argentina e em alguns casos no Brasil e Peru. No Brasil, este vírus foi isolado em 1960, a partir de mosquitos da espécie *Sabethes belisarioi*, capturados na rodovia Belém-Brasília, porém, não foram notificados surtos, nem encefalite, como ocorrido no surto em 1933 nos EUA.^{1,18}

A maioria das infecções por SLEV são silenciosas, mas as manifestações clínicas incluem cefaleia, síndrome febril não especificada, até

manifestações graves como meningite e encefalite com casos fatais, variando de 3 a 30% principalmente entre a população idosa.^{18,19}

Apesar de raros os casos de isolamento, o SLEV tem sido responsável pelo aumento do número de casos no Brasil. Em 2004, na cidade de São Pedro, interior de São Paulo, onde foi isolado de um paciente diagnosticado com o vírus da DENV¹⁹. Em 2006, oito pacientes com doença febril aguda da cidade de Ribeirão Preto/SP, testaram soropositivos para SLEV após a realização de testes imunoenzimáticos (IgG-ELISA). No ano seguinte, seis pacientes foram testes positivos para SLEV em São José do Rio Preto/SP, durante uma epidemia de DENV-3¹⁹.

Deteções do SLEV em pacientes apresentando sintomas de febre aguda, inicialmente diagnosticada como dengue, indicam que diferentes arbovírus circulam durante surtos, causando doença em humanos. Apesar de raros os isolamentos desse vírus no Brasil, muitas pesquisas são necessárias para uma melhor compreensão dessa doença e seus aspectos epidemiológicos.^{18,19,20}

1.1.3 Vírus Rocio (ROCV)

O vírus Rocio (ROCV), também neurotrópico, faz parte do grupo *Ntaya*, que é diferente do JEV. Após seu período de incubação de 7 a 14 dias, pode causar desde infecção assintomática a casos graves de encefalite aguda. Os sintomas iniciam com febre, cefaleias, anorexia, náuseas, vômitos, mialgia e mal-estar, podendo progredir para sintomas indicativos de encefalite, como confusão mental, distúrbios do reflexo, irritação meníngea, síndromes cerebelares e convulsões. Outros sintomas são distensão abdominal e retenção urinária. A doença pode produzir sequelas que variam de alterações sensitivas, falta de coordenação motora, dificuldade de equilíbrio e de deglutição, incontinência urinária e problemas de memória.^{1,21}

O ROCV foi isolado pela primeira vez em 1975, a partir de um caso de óbito ocorrido durante um surto de encefalite em uma área restrita da Mata Atlântica, no Vale do Ribeira, estado de São Paulo. O surto iniciou em 1973 e terminou em 1980, causando aproximadamente 1.000 casos de encefalite em

mais de 20 municípios, e entre os sobreviventes, 200 pessoas sofreram sequelas de equilíbrio ou morbidade.^{21,22}

Embora seja desconhecido como o ROCV tenha se disseminado por esta região e após 7 anos tenha desaparecido, anticorpos foram detectados em moradores rurais do Sudeste e Nordeste do Brasil. Baseado nos dados de isolamento viral e sorológico, acredita-se que o ROCV seja mantido em um ciclo de transmissão envolvendo algumas espécies de aves migratórias e os mosquitos *Aedes* e *Psorophora* os vetores.^{21,22}

Em 2004, na região Sul, foram realizados exames sorológicos em dois pássaros, que apresentaram anticorpos para ROCV. Há evidências recentes de infecção generalizada entre cavalos, esses animais de grande porte, que vivem fora de proteção de edifícios, são vítimas de picadas de mosquito comum, e podem ser uma fonte adequada de estudos soroepidemiológicos sobre a transmissão desse vírus por mosquitos. Esses achados indicam que esse vírus esteja em circulação em várias regiões do Brasil e que é uma ameaça permanente de novos surtos.^{20,21,22}

1.1.4 Vírus Oeste do Nilo (WNV)

O vírus do Oeste do Nilo (West Nile Virus) é um vírus neurotrópico causador de encefalite grave, e circula na natureza através de ciclos de transmissão entre pássaros e mosquitos hematófagos, principalmente do gênero *Culex SP*. Humanos e cavalos são altamente suscetíveis à infecção pelo WNV, o período de incubação do vírus varia entre 2 a 14 dias, e apresenta sintomas inespecíficos como febre, dor de cabeça, fadiga, exantema, nódulos linfáticos palpáveis e dor ocular, sendo que nos casos mais graves da doença pode ocorrer encefalite e meningite. Este arbovírus foi isolado pela primeira vez de uma mulher com quadro febril, moradora da província de West Nile, Uganda, no ano de 1937.^{23,24}

O caso mais reportado da doença do Oeste do Nilo ocorreu em 1999 em Nova Iorque, EUA, causando a morte de muitos pássaros, 67 pessoas foram infectadas pela doença e 21 mortes ocorreram. O vírus disseminou-se por muitos estados norte-americanos, provocando surtos de infecção em pássaros e mamíferos silvestres e domésticos, especialmente em equinos, e também em

seres humanos. Desde seu ressurgimento na América do Norte, em 1999, foram relatados nos Estados Unidos mais de 27.500 casos de infecção em humanos pelo WNV, sendo mais de 1.000 casos fatais.^{23,24}

Além da sua difusão nos Estados Unidos, foram detectadas infecções no Canadá, Ilhas Cayman, El Salvador, Guatemala, Colômbia, Venezuela e Argentina. Em 2014, no Brasil, houve o primeiro relato humano da doença neurológica pelo WNV. Um homem de 52 anos, residente de uma área rural do de Aroeiras do Itaim, Piauí, foi internado apresentando encefalite e paralisia flácida. O paciente relatou fraqueza muscular e febre alta duas semanas antes da hospitalização.²⁵

Estudos recentes relataram evidências sorológicas na detecção do WNV e outros flavivírus em equinos na região do Pantanal, centro-oeste do Brasil, esses resultados sugerem uma ampla circulação desses arbovírus na região.^{25,26}

1.1.5 Vírus Ilhéus (ILHV)

O vírus Ilhéus está inserido no grupo *Ntaya* vírus. Foi descrito pela primeiramente em 1944 e isolado a partir de um “pool” de mosquitos *Aedes* e *Psorophora spp* da cidade de Ilhéus/BA. Está relacionado com casos de encefalites em seres humanos, sendo o arbovírus que tem maior tendência a causar encefalite do país, particularmente na Amazônia brasileira.^{1,26,27}

Outros isolamentos do vírus foram relatados em países da América do Sul e América Central, além do Brasil, Colômbia, Panamá, Argentina e Trinidad, isolados de diversas espécies de animais silvestres e artrópodes vetores, principalmente de *Psorophora ferox*, e em casos esporádicos, isolados de seres humanos. Pouco se sabe sobre infecção do vírus Ilhéus em animais domésticos, e em pesquisa de anticorpos, foram encontrados anticorpos neutralizantes para ILHV em roedores, pássaros, macacos sentinelas, morcegos e humanos.²⁸

Embora a doença em humanos seja raramente observada, o quadro clínico varia desde infecções assintomáticas até encefalite. A doença febril é responsável pela maioria dos casos, seu período de incubação é curto e tem início súbito de febre moderada a elevada, cefaleia, calafrios, fotofobia, artralgia e mialgia, com recuperação completa e sem sequelas. Poucos estudos relacionados com a patogênese do ILHV estão disponíveis, mas é conhecido

que estudos experimentais com o vírus em animais de pequeno porte (roedores) e primatas não humanos produziram infecção viral.²⁹

Um estudo realizado no Instituto Adolfo Lutz, em São Paulo, relatou que o comportamento migratório de aves silvestres (reservatório provisório) pode disseminar o vírus para outras regiões. Sabendo-se da patogenicidade para o homem e a circulação dessas aves possivelmente infectadas em áreas urbanas, aumenta o risco de ocorrência de infecção na população humana.^{28,29}

1.1.6 Vírus da Febre Amarela (YFV)

A febre amarela é uma doença infecciosa aguda reemergente, de origem zoonótica e endêmica na África e América do Sul, a vacina é a principal forma de prevenção e controle desta doença. O vírus transmitido através de mosquitos vetores do gênero *Haemagogus* e *Sabethes* em ciclos de transmissão silvestre, os primatas não humanos (macacos) são os principais hospedeiros e responsáveis por sua disseminação. No ciclo urbano, o homem é o único hospedeiro com importância epidemiológica, e a transmissão ocorre a partir dos mosquitos vetores *Aedes aegypti*.^{2,30,31}

Após a infecção, o homem começa a apresentar sinais clínicos a partir de 3 a 6 dias, apresentando febre de início súbito, calafrios, cefaleia, dores em todo corpo, náuseas, vômitos, fadiga e fraqueza. Na maioria dos casos, há uma melhora no quadro clínico após os sintomas iniciais, porém, nos casos graves da doença, o indivíduo pode desenvolver febre alta, icterícia, hemorragia e, eventualmente choque e insuficiência de múltiplos órgãos.³⁰

Os primeiros relatos de infecção pelo vírus da febre amarela ocorreram há 500 anos, em San Domingo (1498) e Oeste da África (1585), porém, as primeiras epidemias foram registradas no século XVII, em Barbados, Cuba e México. No século XVII, as epidemias já eram consideradas uma ameaça para a saúde pública no Velho e Novo Mundo, migrações comerciais de escravos desempenharam um papel importante na disseminação do vírus.^{2,30,31}

Em 1937 foi desenvolvida uma vacina (17D) altamente eficaz contra o vírus da febre amarela. Desde o século XIX, surtos ocorreram em muitas cidades do Brasil, em 1942 o ciclo urbano foi erradicado, sendo os últimos casos notificados na cidade de Sena Madureira, no Acre. A última epidemia aconteceu

nos anos de 1928 e 1929 na cidade do Rio de Janeiro, com registro de 738 casos, sendo 478 óbitos. No final da década de 90, a intensa circulação do vírus se estendeu da região Amazônica até os estados de Goiás e Mato Grosso do Sul. Em 2008 a 2009, foi registrado um novo surto do vírus atingindo as regiões Sul e Sudeste do país, essa reemergência preocupou as autoridades de saúde com a expansão de áreas de disseminação viral. Em 2016, o Brasil viveu um dos maiores surtos de febre amarela de transmissão silvestre da sua história, com ocorrência na região Sudeste.^{2,31,32}

De janeiro de 2017 a abril de 2018 foram relatados 1.427 casos suspeitos de Febre Amarela no estado de São Paulo, sendo 531 (37,2%) casos confirmados, com 475 (89,4%) de casos autóctones e 52 (9,8%) casos importados. Dos 475 casos autóctones, 174 evoluíram para óbito, com letalidade de 36,6%. A maioria dos casos eram do sexo masculino (81,9%) e a mediana da idade de 43 anos (2 – 89 anos).³³

A ocorrência dessa epidemia e óbitos em primatas não humanos com confirmação laboratorial da infecção pelo vírus da febre amarela, trouxe novamente a discussão da necessidade da redução de risco de novos surtos urbanos. Tendo em vista o controle dos vetores e a vacinação em áreas com recomendações em todo país, são medidas importantes para mitigação do risco de reurbanização da doença.^{30,31}

1.1.7 Vírus Zika (ZIKV)

O ZIKV outro arbovírus que vêm se expandindo rapidamente em distribuição geográfica, recentemente relatados surtos em áreas nunca mencionado. A doença causada por este vírus é muito semelhante aos outros *Flavivirus* e outras doenças virais e parasitárias, causando uma ampla gama de sintomas clínicos incluindo febre, vômitos, erupção cutânea, dor de cabeça, dor retro orbital, mialgia, artralgia e conjuntivite, porém a ação do vírus no organismo humano normalmente tem manifestação clínica leve, sendo aproximadamente 80% dos casos diagnosticados assintomáticos. O vírus foi isolado pela primeira vez, em 1947, do sangue de um macaco *Rhesus*, na floresta Zika, em Uganda, durante estudos epidemiológicos sobre a febre amarela. Após esses estudos, foram evidenciados que o ZIKV é mantido em áreas florestais em um ciclo

semelhante ao da febre amarela, ou seja, envolvendo vetores artrópodes e primatas não humanos.^{34,35} Além da transmissão através de mosquitos vetores, outras formas importantes de transmissão são as vias vertical e a sexual, sendo até o momento, o único arbovírus considerado transmissível pelo contato sexual. O primeiro grande surto do ZIKV ocorreu em 2007, na ilha Yap, Micronésia. Posteriormente, em 2013, uma epidemia foi relatada na Polinésia Francesa, os sintomas apresentados pelas pessoas infectadas eram muito semelhantes aos da infecção causado pelo DENV e casos graves de complicações neurológicas.^{34,36}

Em 2015, o ZIKV chegou nas Américas e o Brasil relatou o primeiro caso de infecção autóctone, a doença foi identificada em Salvador, na Bahia, durante um surto da doença exantemática associada ao DENV e CHIKV, posteriormente identificado como ZIKV. A rápida disseminação do vírus no país foi motivo de grande preocupação para a população que na época sediava os Jogos Olímpicos de 2016. Apesar de a infecção pelo ZIKV apresentar sintomas leves, no final de 2015 foi relatado o potencial do vírus estar associado a casos de microcefalia em recém-nascidos durante a infecção no período gestacional. A gestante infectada pode transmitir o vírus para o feto durante todo o período gestacional, possibilitando manifestações de diversas anomalias congênitas, principalmente a microcefalia e outras alterações do Sistema Nervoso Central (SNC)³⁷. Sendo assim, foi declarado estado de emergência nacional de saúde pública pelo Ministério da saúde no Brasil (MS). No ano seguinte, em 2016, com o aumento do número de novos casos, a Organização Mundial de Saúde (OMS) também declarou a epidemia do ZIKV uma emergência mundial em saúde pública. Após essa declaração, entidades governamentais e comunidades científicas se mobilizaram para definição de estratégias que investigaram rapidamente os mecanismos de patogênese e metodologias de diagnóstico diferencial. Estudos com camundongos em gestação infectados com o vírus mostraram uma possível associação entre o vírus e microcefalia, devido a evidências de malformações graves e atraso de desenvolvimentos nesses embriões, sugerindo que a infecção pelo ZIKV em mulheres grávidas poderia deixar sequelas gravíssimas.¹⁰

No Brasil, durante os anos de 2016 a 2019, foram confirmados 21 óbitos por ZIKV e apesar da ocorrência dos casos autóctones, nenhum óbito foi confirmado em 2015. Os óbitos ocorreram em pessoas de ambos os sexos, sendo 10 (47,6%) óbitos do sexo masculino e 11 (52,4%) óbitos do sexo feminino, sendo a mediana de idade dos óbitos de 13 anos, porém, a faixa etária mais acometida para os óbitos por ZIKV foram entre 0 a 9 anos de idade com 42,8% (9 óbitos).⁹

Em 2017, da Semana Epidemiológica 1 à SE 52, houve registros de 17.593 casos prováveis de doença aguda pelo vírus Zika no país. Em 2018, até a SE 46, foram registrados 8.024 casos prováveis de doença pelo vírus Zika no país, com taxa de incidência de 3,8 casos/100 mil habitantes; destes, 3.625 (45,2 %) casos foram confirmados.¹⁷

1.2 FAMÍLIA *TOGAVIRIDAE*

Os vírus pertencentes à família *TOGAVIRIDAE* são vírus de RNA, de cadeia simples de aparência esférica e envelopados. O gênero *Alphavirus* é composto por 25 arbovírus amplamente distribuído em todo o mundo. Os Alfavírus que produzem doenças humanas são classificados como aqueles que manifestam sintomas clínicos como erupção cutânea e poliartrite e os que produzem encefalite.¹¹

Esses vírus tem aproximadamente 70 nm de diâmetro, possuem capsídeo icosaédrico, genoma construído de RNA de fita simples linear de polaridade positiva (RNAfs+) de aproximadamente 11kb que codifica oito genes, os quais codificam proteínas estruturais do envoltório (glicoproteínas E1 e E2) do capsídeo, além de pequenos polipeptídeos E3 e 6Ks, e as proteínas não estruturais (nsP1 a nsP4) que estão envolvidas na replicação viral, mostrado na figura 2. São agentes que causam inúmeras doenças em seres humanos e animais ao redor do mundo. Essas doenças evoluem com sintomas clínicos não específicos, sendo muito semelhantes aos sintomas causados por outros arbovírus, exigindo um diagnóstico diferencial precoce da infecção para determinar a adoção de medidas preventivas eficientes. Neste grupo se destacam os arbovírus: vírus Chikungunya (CHIKV), vírus da Encefalite Equina

do Leste (EEEV), vírus da Encefalite Equina do Oeste (WEEV), vírus da Encefalite Equina Venezuelana (VEEV), vírus Mayaro (MAYV) e vírus Aura (AURAV).^{1,38,39}

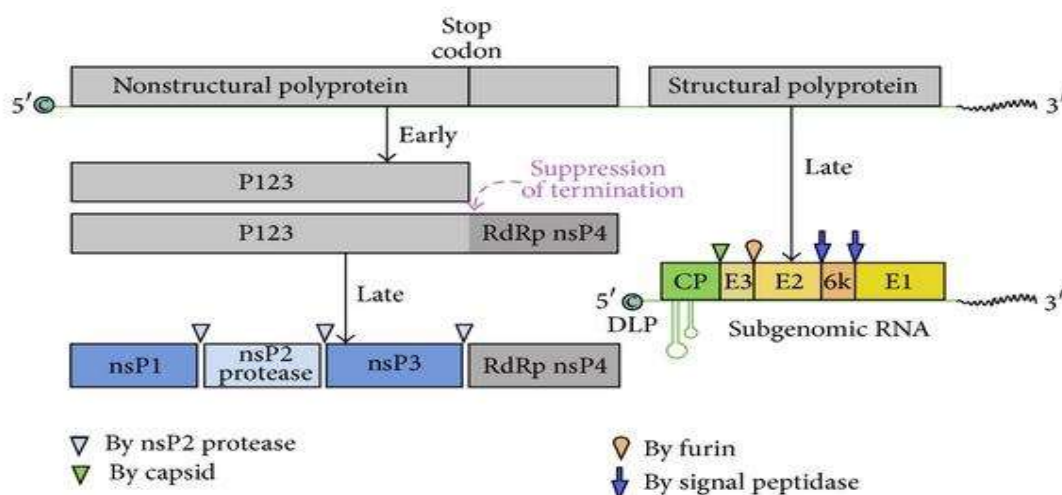


Figura 2: Organização esquemática do genoma dos *Alphavirus*. Na extremidade 5' se destacam as proteínas não estruturais. Na extremidade 3' as proteínas estruturais.

(Fonte: Hernandez, Brown&Paredes, 2014.³⁹)

1.2.1. Vírus Chikungunya (CHIKV)

O vírus CHIKV é uma arbovirose emergente, responsável por causar doença febril e poliartrite grave, e foi isolado pela primeira vez em um paciente infectado durante um surto em 1952, na atual Tanzânia. Em 2004, uma mutação ocorrida na linhagem africana do CHIKV permitiu boa adaptação ao vetor *A. albopictus*, que são espécies de mosquitos abundantes nas ilhas do Oceano Índico e outras regiões da Ásia, contribuindo para a expansão do vírus em áreas urbanas e periurbanas e, conseqüentemente, ao aumento de surtos epidêmicos em outras regiões tropicais, subtropicais e temperadas, como a Europa. O nome “Chikungunya” se origina da língua africana e significa “aquele que se dobra”, descrevendo a postura curvada e do andar rígido do paciente acometido, devido às fortes dores articulares.⁴⁰

No Brasil, em setembro de 2014, foi detectado o primeiro caso de transmissão autóctone da linhagem asiática, no estado do Amapá,

posteriormente disseminando-se para outros estados do país. No mesmo mês, ocorreu em Feira de Santana, Bahia, um surto de linhagem diferente (ECSA), colocando a população em risco de infecção pelo vírus.^{8,41}

A doença aguda causada pelo CHIKV assemelha-se aos sintomas causados pelo dengue, causa febre alta de início abrupto, dor intensas nas articulações, erupção cutânea, mialgia, fotofobia e dor de cabeça. Contudo, esta poliartralgia pode ser recorrente em aproximadamente 40% dos indivíduos infectados, podendo persistir por anos. Manifestações clínicas inespecíficas como adenopatia cervical, astenia, calafrios, náuseas, vômitos e diarreia podem estar presentes. Manifestações graves da doença geralmente envolvem o sistema nervoso central, sistema respiratório e sistema urinário e têm sido observadas em diferentes faixas etárias, não apenas em pacientes idosos.^{40,41}

Em 2017, da Semana Epidemiológica 1 à SE 52, houve registros de 184.694 casos prováveis de febre de CHKV. Em 2018, até a SE 49 (31/12/2017 a 10/12/2018), foram registrados 85.221 casos de febre de chikungunya no país, com incidência de 40,9 casos/100 mil habitantes; destes, 65.480 (76,8%) casos foram confirmados. Dos casos notificados, 24.545 foram descartados.¹⁷

1.2.2 Vírus da Encefalite Equina do Leste (EEEV)

O vírus também conhecido como encefalite equina oriental, é mantido em ciclo enzoótico, entre aves e mosquitos, principalmente *Culiseta melanura* na América do Norte. Porém, os principais vetores na transmissão do EEEV para humanos e cavalos são os gêneros *Aedes*, *Coquillettidia* e *Culex*, ao contrário do *Culiseta melanura*, tendem a se alimentar tanto em aves quanto em mamíferos. Equinos e humanos são hospedeiros acidentais produzindo encefalite com 30% a 40% de mortalidade.^{1,11}

Em 1933, durante um surto o EEEV foi isolado pela primeira vez de cavalos infectados, na Virginia e New Jersey, USA. Apesar de haver suspeita de casos humanos, estes não foram demonstrados até 1938, quando ocorreu novamente um surto no nordeste dos EUA resultando em 30 casos de mortes por encefalite em crianças que viviam nas mesmas áreas frequentadas pelos equinos. A partir desse caso, o vírus foi isolado do sistema nervoso de seres

humanos e aves. A maioria dos casos de EEEV foram relatados na Flórida, Georgia Massachusetts e Nova Jersey. De acordo com o CDC (Center for Disease Control and Prevention), foram confirmados 220 casos humanos de EEEV ocorrido nos Estados Unidos de 1964 a 2004. Entre os anos de 2008 e 2009, ocorreu um surto no Brasil, nos estados de Pernambuco, Ceará e Paraíba. A infecção aconteceu em 93 fazendas e afetou 229 equinos, com uma taxa alta de letalidade de 72,92%.^{1,42}

Após o período de incubação viral, de 4 a 10 dias, os sintomas são de início súbito com febre repentina, dores de cabeça e dores musculares de gravidades crescentes. Casos humanos de encefalite, vômitos, sintomas respiratórios, leucocitose, hematúria, convulsões e coma podem ocorrer.^{11,42}

Não há tratamento específico para o EEEV, porém uma vacina produzida em combinação com o vírus da Encefalite Equina do Oeste (WEEV), está disponível e se faz necessárias duas doses da vacina por ano para manter a proteção, devido a fraca imunogenicidade. O desenvolvimento de anticorpos neutralizantes serve como monitoramento da imunização.^{1,42,43}

1.2.3 Vírus da Encefalite Equina do Oeste (WEEV)

O vírus WEEV, também conhecido como encefalite equina oriental, foi isolado pela primeira vez em 1930, do cérebro de cavalos infectados durante um surto ocorrido no Vale de San Joaquin, Califórnia. Em 1938, foi confirmado o primeiro caso fatal de infecção em humanos. Estudos epidemiológicos mostraram que o WEEV está amplamente distribuído nas Américas, sendo responsável por causar encefalite em humanos e equinos, principalmente na América do Norte, onde há ocorrência de surtos esporádicos.^{42,43}

Embora a maioria dos casos de infecção pelo WEEV sejam assintomáticos, podem ocorrer manifestações clínicas entre 2 a 10 dias após o período de incubação do vírus, incluindo sintomas inespecíficos como febre alta, mal-estar e dor de cabeça, frequentemente associada ao meningismo. A taxa de mortalidade em humanos é cerca de 3% a 4% e em equinos de 20% a 30%, para cavalos o WEEV é menos virulento que o EEEV.^{43,44}

O WEEV é mantido em ciclos enzoótico entre hospedeiros vertebrados e mosquitos vetores do gênero *Culex tarsalis*, abundantes em áreas agrícolas

no oeste dos EUA. A transmissão epizootica para cavalos e humanos é mediada por mosquitos vetores como *Ochlerotatus melanimon* na Califórnia, *Aedes dorsalis* em Utah e Novo México e *Aedes campestris* no Novo México. De acordo com o CDC (Center for Disease Control and Prevention), foram confirmados 639 casos do WEEV em humanos, ocorridos de 1964 a 2005. Um declínio no número de casos anuais foi atribuído a programas bem-sucedidos de controle de mosquitos no oeste do EUA. Cavalos são vacinados com o vírus inativado por formalina, que está disponível como vacina de dupla combinação com EEEV.^{42,43,44}

1.2.4 Vírus da Encefalite Equina Venezuelana (VEEV)

O vírus da VEEV é o patógeno de grande importância com vários surtos relatados nas Américas. O complexo antigênico VEEV é dividido em 6 subtipos antigênicos (I-VI). Em 1936, foi isolado pela primeira vez de cérebros de cavalos infectados durante um surto de encefalite equina, ocorrido na Colômbia e Venezuela. Os subtipos I-AB e I-C foram responsáveis por grandes surtos em cavalos nos últimos 25 anos.^{42,43} No Brasil, o VEEV foi isolado na região Norte, Nordeste e Sudeste, onde causou epizootias equinas, apenas um caso humano de encefalite foi relatado há mais de 50 anos.²¹

Pacientes infectados pelo vírus manifestam sinais clínicos após 1 a 4 dias de incubação, apresentando febre, cefaleia e mialgia. A maioria dos casos clínicos são doenças autolimitadas com recuperação após uma semana, podendo evoluir para casos mais graves da doença com sintomas neurológicos apresentando convulsões, sonolência, desorientação e as vezes seguido por sequelas como, paralisia, epilepsia e tremor.^{2,42,43}

O ciclo de transmissão enzoótico inclui aves e roedores como hospedeiros, e insetos vetores do gênero *Culex*. Em ciclos epizooticos a transmissão ocorre através de mosquitos do gênero *Aedes* e *Psorophora* para equinos e humanos.^{21,44}

1.2.5 Vírus Mayaro (MAYV)

O vírus foi isolado pela primeira vez em 1954 de pacientes infectados em Trinidad. O MAYV tem sido causador de surtos de doença infecciosa febril aguda na Região Amazônica e no Planalto Central do Brasil, e outros países como Peru, Bolívia, Venezuela, Colômbia, Argentina e Trinidad. Em 1999, foram identificados pela primeira vez no estado do Amazonas, casos da doença, e entre 2007 a 2008, novamente foram identificados casos da febre do Mayaro na cidade de Manaus/AM. Também foram observados anticorpos do vírus em duas aves capturadas no Sul do Brasil.^{20,45,46}

Normalmente, o MAYV atinge indivíduos que trabalham ou residem em áreas florestais, no entanto, surtos em grandes cidades já foram relatados. Os mosquitos do gênero *Haemagogus* são os principais vetores e os hospedeiros, geralmente, são primatas não humanos. Seu ciclo de transmissão é semelhante ao da Febre Amarela Silvestre (YFV), portanto, lugares que sofrem surtos de MAYV podem ocorrer simultaneamente com surtos de YFV, como aconteceu na cidade de Santa Cruz de LaSierra, Bolívia, na década de 1980. Os sintomas da infecção causada pelo MAYV se manifestam de 3 a 5 dias após o contágio, apresentando síndrome febril aguda, cefaleia, mialgia, exantema, erupção cutânea, artralgia e, ocasionalmente, artrite.^{20,21,35}

Esses dados indicam um risco da introdução do MAYV em outras regiões do Brasil, podendo se espalhar para outros países da América, através de viajantes infectados e aves migratórias. Além disso, a transmissão do vírus através do mosquito *Aedes aegypti* pode originar ciclos urbanos da doença. A transmissão viral por vias aéreas foi relatada como agente causador de uma infecção acidental, em laboratório, podendo ser considerada uma via de transmissão natural, facilitando a disseminação do vírus ocasionando novos surtos.^{21,45}

1.2.6 Vírus Aura (AURAV)

O vírus Aura está sorologicamente relacionado com o vírus *Sindbis* (presente em todo o velho mundo) e WEEV, foi primeiramente isolado de mosquitos do gênero *Aedes serratus*, no Brasil e Argentina. Embora a

distribuição do vírus seja ampla, não há evidências de doença humana relatada pela infecção do vírus. Existem apenas dois relatos de isolamento do vírus Aura em mosquitos na literatura científica, e a existência de um hospedeiro vertebrado ainda é desconhecida. A descoberta desse novo isolado foi baseada em microscopia eletrônica de transmissão e amplificação de ácido nucleico, por meio de um protocolo de amplificação pela RT-PCR não-específica seguido de sequenciamento.^{47,48}

1.3 FAMÍLIA BUNYAVIRIDAE

Os membros da família *BUNYAVIRIDAE* pertencem ao gênero *Orthobunyavirus*, sendo o maior gênero de vírus de RNA de cadeia simples, com polaridade negativa e aparência esférica, medindo entre 80 a 110 nm de diâmetro e são descritos como segmento grande (L), segmento médio (M) e segmento pequeno (S), de acordo com seus respectivos tamanhos moleculares, como mostrado na figura 3. Esta família possui mais de 170 vírus e 18 diferentes sorotipos. Neste grupo de vírus destaca-se o vírus Oropouche.^{40,41}

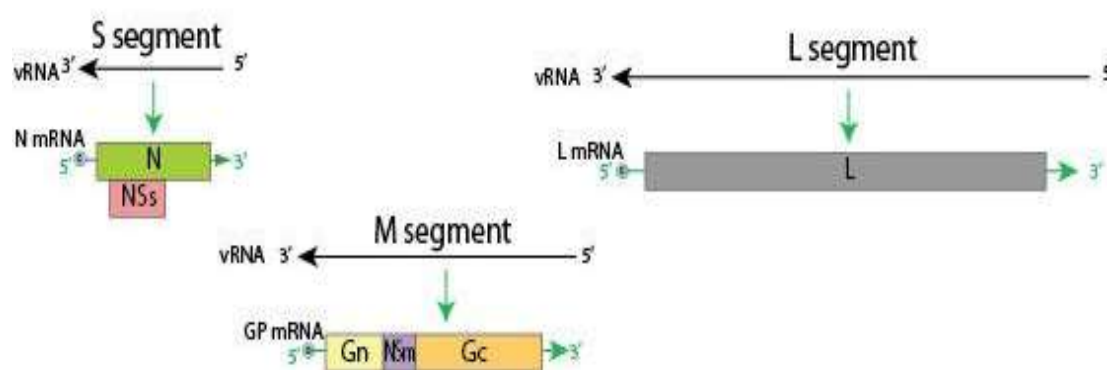


Figura 3: Organização genoma do gênero *Orthobunyavirus*. Os segmentos de RNA descritos como L, M e S codifica uma RNA polimerase dependente de RNA, glicoproteínas da superfície do envelope (Gn e Gc) e proteína do nucleocapsídeo, respectivamente.

(Fonte: Moreli et al. 2002.^{52,56})

1.3.1 Vírus Oropouche (OROV)

O vírus OROV pertence ao gênero *Orthobunyavirus*, considerado um arbovírus potencialmente emergente, sua transmissão ocorre entre preguiças, marsupiais, primatas e aves pelo mosquito *Aedes serratus* e *Culex quinquefasciatus*. Esse vírus adaptou-se a um ciclo urbano, envolvendo o homem e mosquitos *Culicoides paraenses*, como o principal vetor. O OROV é o segundo arbovírus mais frequente causadores de doença febril no Brasil, atrás apenas do DENV.⁴⁹

O primeiro caso da doença do OROV foi descrito em Trinidad e Tobago em 1955, o vírus foi isolado do sangue de um trabalhador rural morador de uma aldeia chamada Vega de Oropouche. Em 1960, teve seu primeiro registro no Brasil, foi isolado a partir do sangue de uma preguiça capturada em uma área florestal durante a construção da rodovia Belém-Brasília e também de mosquitos *Ochlerotatus serratus* juntamente capturados. Em 1961, o vírus foi novamente detectado na cidade de Belém, no Pará, causando um surto afetando aproximadamente 11.000 pessoas. Muitos outros surtos de OROV foram descritos posteriormente em áreas urbanas no Acre, Amapá, Maranhão, Pará, Rondônia e Tocantins, como também em outros países da América do Sul entre 1992 e 1994. Em 2009, o último surto foi relatado nos municípios de Altamira e Santa Bárbara, no estado do Pará, e em Mazagão, no estado do Amapá, os pacientes febris apresentavam cefaleia, artralgia, petéquias, epistaxe e sangramento gengival.^{49,50}

A patogênese da infecção causada pelo OROV não é muito conhecida, testes experimentais em hamster dourado demonstrou que aproximadamente a metade dos animais estudados desenvolveram a doença infecciosa caracterizada por letargia, calafrios, tremores, paralisia, e aproximadamente um terço foram a óbito, sendo presente no sangue altos títulos virais, inclusive no fígado e cérebro. Os sintomas são facilmente confundidos com outras arboviroses em circulação no Brasil.⁵¹

1.4 Arboviroses e manifestações neurológicas

A complicação neurológica viral como a meningoencefalite asséptica é importante causa de mortalidade e morbidade na população pediátrica, sendo que os vírus associados às infecções no SNC podem variar, dependendo da região geográfica. Enterovírus e Herpesvírus estão entre os vírus mais comumente associados a infecções no SNC de crianças que vivem na América do Norte, enquanto que na Ásia os vírus da encefalite japonesa são encontrados com maior frequência. No Brasil, os *Flavivirus* e os *Alphavirus* ganham destaque por estarem em constante circulação. No entanto, há poucos relatos desses arbovírus como agentes etiológicos de infecção no SNC em crianças, sendo desconhecida sua incidência.⁵

Estudos recentes têm demonstrado que casos graves de infecção por arbovírus têm se deslocado para a faixa etária mais jovem portanto, crianças constituem um grupo especial por apresentarem maior risco para o desenvolvimento de manifestação grave da doença.⁶²

A DENV é a arbovirose de maior impacto e incidência no mundo, consequentemente considerada um grave problema de saúde pública, principalmente nas áreas infestadas por mosquitos vetores, contribuindo assim, para a circulação de outros arbovírus mencionados anteriormente.⁶³ Poucos estudos focam em arboviroses em sistema nervoso de crianças e isso pode estar sendo negligenciado, pois a doença pode estar se manifestando de outras formas que antes não foram identificadas e esse trabalho pode ser um alerta para os casos de doenças neurológicas com suspeita de infecção de origem viral. Esse grupo de doença ainda é desafiador em relação ao diagnóstico diferencial e abordagem terapêutica, especialmente durante a infância, devido à cocirculação de diferentes arbovírus, a falta de tratamento antiviral específico, difícil controle dos vetores e a falta de imunização eficaz, com exceção da febre amarela.^{62,64}

A análise bioquímica, citológica e microbiológica do LCR e a combinação da identificação molecular melhoram a sensibilidade, especificidade e rapidez no diagnóstico da infecção e, com isso, pode haver otimização no tratamento, evitando o uso desnecessário de antibióticos e longos períodos de hospitalização.⁶⁴

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral:

- Identificar, através de técnicas moleculares, o genoma dos arbovírus que podem causar infecção no sistema nervoso, em amostras de líquido cefalorraquidiano (LCR) de crianças atendidas no Hospital de Clínicas da UNICAMP e Centro de Atenção Integral à Saúde da Mulher (CAISM) com indícios de infecção neurológica de etiologia viral.

2.2 Objetivo específico:

- Utilizar o material genético extraído do LCR no diagnóstico molecular das infecções causadas por flavivírus no sistema nervoso de crianças com síndromes neurológicas de provável etiologia viral e,
- Associar os resultados com os achados clínicos e laboratoriais.

3. METODOLOGIA

3.1 Pacientes e Métodos

Desenho do estudo e definições de caso: Estudo transversal, que incluiu pacientes pediátricos, com idades entre o dia do nascimento (dia 1) até 18 anos de idade. Estes pacientes foram atendidos nas unidades de pronto atendimento ou nas enfermarias do hospital e maternidade universitários, durante o período de fevereiro de 2017 a julho de 2018 e que apresentavam sinais e sintomas de infecção de provável etiologia viral no sistema nervoso. Este estudo foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos (CEP), número CAAE 59361816.3.0000.5404 e, considerado aprovado (Parecer número 3.010.312) e os Termos de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLEs) foram assinados pelos pacientes maiores de idades ou familiar/responsável.

Durante o atendimento destes pacientes, foi realizado o procedimento de punção lombar para obtenção do LCR para a realização de dosagem bioquímica padrão (determinação de proteína e glicose), teste microbiológico para detecção de bactéria e fungo (coloração de *Gram*/tinta da China e cultura) e contagem global e diferencial de células por citosedimentação. Após os resultados dos testes liberados, alíquotas destas amostras de LCR foram encaminhadas ao Laboratório de Virologia para a realização dos testes moleculares de identificação dos genomas das arboviroses estudadas.

3.2 Critérios de Inclusão

Amostras de LCR dos pacientes pediátricos com suspeita de infecção de etiologia viral no SN que apresentaram um ou mais dos seguintes sinais ou sintomas (manifestações sistêmicas e neurológicas): cefaleia, febre, diminuição do nível de consciência, convulsões, déficit focal, papiledema, alterações do comportamento, linfadenopatia, *rash* cutâneo, exantemas, artralgia, mialgia, perda da força muscular, sintomas respiratórios ou gastrointestinais ou história de exposição aos vetores e, somente aqueles que apresentaram os resultados das análises do LCR com aspecto incolor/límpido/xantocrômico após

centrifugação e exame direto negativo para *Gram* e tinta da China foram incluídas no estudo.

3.3 Critérios de Exclusão

Amostras de LCR recebidas no laboratório em quantidades insuficientes para a extração do RNA (volume <140µL) e exclusão *a posteriori* de amostras com culturas do LCR positiva para bactérias piogênicas, *Micobacterium tuberculosis* ou fungos. Amostras obtidas em repetição, ou de casos sem suspeita clínica de infecção (trauma ou lesão mecânica) também foram excluídas do estudo.

3.4 Métodos Laboratoriais

As alíquotas de LCR que foram previamente congeladas a uma temperatura de -80°C graus foram descongeladas em temperatura ambiente e submetidas à extração do material genético (RNA) a partir do *Kit QIAamp Viral RNA* (QIAGEN, Valencia, CA), seguindo todas as instruções do fabricante. O *Kit AccessQuick™ RT-PCR System* (Promega USA) foi usado para a reação da transcrição reversa (RT) nas amostras com RNA extraído para a síntese do cDNA. Em seguida, realizou-se a reação em cadeia da polimerase (RT-PCR) para a identificação dos diferentes grupos de genomas de arbovírus (*Alphavirus*, *Flavivirus* e *Bunyavirus*). Para a determinação dos sorotipos do vírus Dengue, utilizou-se um protocolo de semi-nested RT-PCR Multiplex, descrito por *Lanciotti et. al; 1992*, com algumas modificações⁵⁷.

As amostras de cDNA também foram testadas para identificação do genoma viral de DENV e ZIKV pela técnica da PCR em Tempo Real (RT-qPCR). Para a detecção simultânea dos diferentes sorotipos de vírus Dengue (1-4) utilizou-se o reagente *TaqMan*, iniciadores e sondas específicas, seguindo o protocolo descrito por *Huhtamoet. al 2010*⁵⁸.

Na detecção do ZIKV e CHIKV foi usado o protocolo descrito por *Lanciottiet. al; 2008*⁵⁹ e *Lanciotti et. al; 2007*⁶⁰, respectivamente. Foram realizadas reações de Nested RT-PCR para a identificação de genoma de outros

vírus do gênero *Flavivirus*: vírus da Encefalite de Sant Louis (SLEV), vírus Oeste do Nilo (WNV), vírus Ilhéus (ILHV), vírus da Febre Amarela (YFV) e vírus Rocio (ROCV)³; vírus do gênero *Alphavirus*: vírus da Encefalite Equina do Leste (EEEV), vírus da Encefalite Equina do Oeste (WEEV), vírus da Encefalite Equina Venezuelana (VEEV), vírus Mayaro (MAYV), vírus Aura (AURA)⁵⁴, vírus Chikungunya (CHIK)⁶¹ e gênero *Bunyavirus*: vírus Oropouche (OROV)⁵² para verificação de provável reação cruzada.

Na **Tabela 1** estão listadas as sequências dos iniciadores utilizados e dos amplicons obtidos em cada reação de amplificação dos gêneros pertencentes à família *Flaviviridae*.

Tabela 1: Sequência dos iniciadores utilizados na identificação do gênero e espécie dos arbovírus estudados utilizando as técnicas de RT-Nested-PCR e RT-qPCR.

INICIADORES	SEQUÊNCIA (5' - 3')	AMPLICON (pb)
<i>Alphavirus</i>		
(F) M2W	YAGAGCDTTTTCGCAYSTRGCHW	434
(R) cM3W	CATRAANKGNGTNGTRTCRAANCCDAYCC	
nVEE	ACGGAGGTAGACCCATCCGA	400
nEEE	CCACGGTACCGTTGCC	124
nWEE	GGCGGCAGACCTGCTGGAA	208
nMAY	GGAAGTTGGCCAAGGC	270
nAURA	TCAATGCACCTTCGACCA	86
(F) Chik-1	TAATGCTGAACTCGGGGACC	427
(R) cChik-4	ACCTGCCACACCCACCATCGAC	
Chik-2	GATCAGGTAAACCGTGCCGACT	172
cChik-3	CACTGACACAACCTACCACAGTCA	
<i>RT-qPCR CHIKV</i>		
Forward primer	TCACTCCCTGTTGGACTTGATAGA	
Reverse primer	TTGACGAACAGAGTTAGGAACATACC	

Sonda	FAM-AGGTACGCGCTTCAAGTTCGGCG	
Flavivirus		
(F) FG1	TCAAGGAACTCCACACATGAGATGTACT	958
(R) FG2	GTGTCCCATCCTGCTGTGTCATCAGCATACA	
nSLE	ATTCTTCTCTCAATCTCCGT	232
nILH	TCCACCGCTGATCTGAGCCCGTGA	474
nROC	TCACTCTTCAGCCTTTTCG	230
nYF	TCAGAAGACCAAGAGGTCATGT	253
WNV	TGGTGTCTGAGTTGAGCAGGG	717
(F) D1	TCAATATGCTGAAACGCGCGAGAAACCG	511
(R) D2	TTGCACCAACAGTCAATGTCTTCAGGTTC	
TS1	CGTCTCAGTGATCCGGGGG	482
TS2	CGCCACAAGGGCCATGAACAG	119
TS3	TAACATCATCATGAGACAGAGC	290
TS4	CTCTGTTGTCTTAAACAAGAGA	392
RT-qPCR DENV 1-4		
Forward primer	GGACTAGAGGTTAGAGGAGACCCC	
Reverse primer	GAGACAGCAGGATCTCTGGTC	
Sonda	FAM- AGCATATTGACGCTGGGA	
RT-qPCR ZIKV		
Forward primer	CCGCTGCCCAACACAAG	
Reverse primer	CCACTAACGTTCTTTTGCAGACAT	
Sonda	FAM-AGCCTACCTTGACAAGCAGTCAGACACTCAA	
Bunyavirus		
(F) BUN-S	AGTAGTGTGCTCCAC	
(R) BUN-C	AGTAGTATACTCCAC	300
BS-S	GTGGGGTCCAATTTGC	

BS-C

TGAACCCTATGCATCT

Legenda: *Alphavirus*: Bronzoni et al. 2004⁵⁴, Pfeffer et al. 2002⁶¹, Lanciotti et al. 2007⁶⁰; *Flavivirus*: Bronzoni et al. 2005³, Lanciotti et al. 1992⁵⁷, Huhtamo et al. 2010⁵⁸, Lanciotti et al. 2008⁵⁹; *Bunyavirus*: Moreli et al. 2002⁵².

3.5 Análise estatística

As informações clínicas dos pacientes com amostras de LCR positivas e negativas para investigação dos genomas virais foram descritas segundo informações em pedido de exames e banco de dados, conforme citado anteriormente, mediante as variáveis de interesse demográficas (sexo, data de nascimento, data de coleta e a idade na coleta), hipótese diagnóstica inicial (HDI) e resultados dos testes de rotina no LCR, para observação de valores de proteína, glicose, hemácias e leucócitos. Essas informações foram descritas por meio de valores absolutos (n), prevalências e percentuais, como também resultados estatísticos descritivos, por exemplo, mediana e média. Foi utilizado o teste de Fisher e o valor de $p \leq 0.05$, foi considerado estatisticamente significativo. Dados sobre sintomas, hospitalização, óbito e uso de medicamentos foram obtidos por meio da leitura de prontuários clínicos referente aos pacientes positivos para investigação de genomas virais. Foram calculadas prevalências desses achados e descritas suas porcentagens.

4. RESULTADOS

ARTIGO 1. SUBMETIDO

Jornal de Pediatria

Arbovirus associated with neurological syndromes in pediatric patients of a university hospital, 2017-2018 Arboviruses in Children with Neurological Syndrome
--Manuscript Draft--

Manuscript Number:	JPEDIATRIA-D-21-00378
Article Type:	Original article
Keywords:	arbovirus infection; central nervous system, cerebrospinal fluid, zika, dengue, children
Corresponding Author:	SANDRA HELENA ALVES BONON, Ph.D. Universidade Estadual de Campinas Campinas, SP BRAZIL
First Author:	Lidia Cristian de Oliveira Boffi, Master
Order of Authors:	Lidia Cristian de Oliveira Boffi, Master
	Raissa Nery Bindilatti, Master Degree
	Lucas Lopes Leon, Doctorate
	Rodrigo Gonçalves de Lima, Graduation on Chemistry
	Sandra Cecília Botelho Costa, Professor
	Célia Regina Garlipp, Professor
	SANDRA HELENA ALVES BONON, Ph.D.

ARTIGO 1.

Arbovirus associated with neurological syndromes in pediatric patients of a university hospital, 2017-2018

Arboviruses in Children with Neurological Syndrome

Lidia Cristian Oliveira Boffi^a ID 0000-0002-2107-5920; Raissa Nery Bindilatti^a ID 0000-0002-5521-1978; Lucas Lopes Leon^a ID0000-0002-5649-9766; Rodrigo Gonçalves de Lima^a ID 0000-0002-9345-9931; Sandra Cecília Botelho Costa^a ID 0000-0002-2328-8903; Célia Regina Garlipp^b ID0000-0001-8614-3421; Maria Rita Donalisio^c Sandra Helena Alves Bonon^a ID 0000-0002-0630-5062

^aState University of Campinas (UNICAMP), Faculty of Medical Sciences, Laboratory of Virology, Campinas, SP, Brazil.

^bState University of Campinas (UNICAMP), Faculty of Medical Sciences, Department of Clinical Pathology, Campinas, SP, Brazil.

^c State University of Campinas (UNICAMP), Faculty of Medical Sciences, Department of Public Health, Campinas, SP, Brazil.

Corresponding author: Sandra Helena Alves Bonon, Ph.D., Laboratory of Virology, Faculty of Medical Sciences, State University of Campinas - UNICAMP, 13083-887, Campinas, São Paulo, Brazil. Tel.: (+55) 19-35217734 - E-mail: sbonon@unicamp.br

ABSTRACT

Objectives. To investigate the presence of arbovirus genomes in cerebrospinal fluid (CSF) samples from children with suspect of viral neurological infection, associating the results with clinical manifestations, and biochemical and cytological analyzing of the CSF.

Patients and Methods. Cross-sectional study included CSF samples from 184 children aged 1 day to 18 years old, with negative CSF microbiology tests. Molecular tests were carried out to detect arboviruses in the CSF, and the results were analyzed according to the clinical features.

Results. Among 184 children, 57% were male. Genome of dengue and zika viruses were found in 23.9% (CI 95% 17.7%-30.1%) of the CSF analyzed samples. Among those samples, 59% were positive for dengue virus, 38.6% for zika virus, and in 2.3% coinfection of dengue+zika was observed. In 67 patients with suspected infection/sepsis, 23.9% CSF sample were positive; among 26 meningitis, 11.5% had positive results; in 22 hydrocephaly, 22.7% were positive; in 20 with convulsion 25% had CSF positive, in 4 with encephalitis 25% were positive; in 5 intracranial hypertension, 60% were positive; 1 in 3 cases, 33.3% each, presented with neuritis and meningoencephalitis were positive; the 2 Guillain-Barré syndrome were positive. Pleocytosis occurred in 25% of positive cases, and antibiotics were used in 56.8% of patients.

Conclusions. We found a high prevalence of neurological infection by zika and dengue virus in children with different clinical manifestation in the nervous system in a period after the zika and dengue outbreak. Most positive samples did not show marked biochemical changes in the CSF. Molecular tests in CSF of children with neurological conditions contribute to identification of the viral etiology leading to less use of unnecessary antibiotics, and reducing hospital stays.

Introduction

Brazil is an endemic country for many arboviruses and the most clinically relevant are the *Flaviviridae* family (DENV and ZIKV virus), and *Togaviridae* (chikungunya virus). The limitation of vaccine use, the low efficacy of antiviral treatments, and the difficult control of mosquito infestation make children a susceptible group with serious consequences¹.

These infections can be associated with many neurological disorders from mild nonspecific to severe syndromes². Evidence supports the idea that the virus (DENV and ZIKV) act directly on the CNS^{2,3}. However, non-invasive tests such as neuroimaging and cerebrospinal fluid (CSF) analysis are used for diagnostic confirmation. In Brazil, few studies assessed the prevalence of neurological manifestations related to these viruses⁴, which have an RNA genome, that allows rapid adaptation to the host and environmental conditions^{5,6}.

Dengue is a serious public health problem, and neurological manifestations such as encephalopathies, encephalitis, and meningitis have been reported associated with this viruses⁶.

In the last 20 years, many epidemics associated with different dengue serotypes have occurred in Brazil: DENV-1 (1998), DENV-3 (2002), DENV-2 (2008), and DENV-4 (2010)⁷. Between 2015 and 2016, an annual average of 1,586,155 probable cases of dengue occurred⁸, however, dengue incidence in 2017 and 2018 dropped to 252,054 cases, in addition to a reduction in the number of severe dengue and deaths⁸.

Recent studies have shown that severe cases of the neurological disease caused by dengue have also moved to the younger age group, with a consequent increase in hospitalizations and deaths in this population^{2,10}. However, more studies are needed as they are a group that is increasingly susceptible to viral neuroinvasion.

In Brazil, in 2015, the epidemic of ZIKV infection was associated with an increase in cases of microcephaly in newborns and Guillain-Barré syndrome (GBS) in other patients, in addition to cases of severe neurological impairment.^{1,11}

In 2017, the number of ZIKV cases also decreased in Brazil compared to previous years, by around 92%⁹. Some authors suggest that the decrease in ZIKV cases was due to herd immunity^{12,13}. However, current data on herd immunity cross-reactions between DENV and ZIKV viruses, vector control measures, environmental factors, and mosquito ecology are not sufficient to explain the dengue scenario in 2017⁹.

In 2014, Brazil registered the first case of autochthonous transmission of chikungunya virus, CHIKV, spreading to other Brazilian states¹. Other arbovirus circulate in Brazil, with similar symptoms and with neurological manifestations¹⁴.

The aim of this study was to investigate cases of neurological infections caused by the arboviruses *Alphavirus*, *Flavivirus*, and *Bunyavirus* in the pediatric population during the period of 2017 and 2018, using techniques to identify viral genomes, and then to associate the results with clinical signs, symptoms and biochemical and cytological examinations in the CSF.

The biochemical and cytological analysis of the CSF associated with molecular identification can improve the sensitivity and specificity of the diagnosis of the infection and thus, optimize treatment, reducing the unnecessary use of antibiotics and long hospitalization periods.

Patients and Methods

This cross-sectional study included patients aged from the day of birth to 18 years old, treated in the emergency care units or wards of the university hospital or maternity hospital, from February 2017 to July 2018.

This study was submitted and approved by Ethics Committee for Research in Human Beings (CEP), number CAAE 59361816.3.0000.5404, and process number: 3.010.312. A Free and Informed Consent Form were signed by patients of legal age or by the family/guardian.

A lumbar puncture was performed to obtain the CSF for biochemical, cytological, and microbiological exams and, after releasing the reports of these exams, CSF aliquots were sent to the Virology Laboratory for molecular tests.

Inclusion and Exclusion Criteria: CSF samples were selected from patients who had one or more of the following symptoms or signs: headache, fever, seizures, focal deficit, papilledema, behavioral changes, lymphadenopathy, decreased level of consciousness, rash, arthralgia, myalgia, loss of muscle strength, respiratory or gastrointestinal symptoms or a history of exposure to the vectors, and with negative CSF results for fungi and bacteria. CSF samples with insufficient quantities for RNA extraction (<140µL), and samples obtained in repetition, trauma, or mechanical injury were excluded from the study.

Methods: Aliquots of CSF were subjected to genetic material (RNA) extraction using the QIAamp Viral RNA Kit (QIAGEN, Valencia, CA), following the manufacturer's instructions. The Access Quick TM RT-PCR System Kit (Promega USA) was used for the reverse transcription (RT) reaction in samples with extracted RNA for cDNA synthesis. Then, a polymerase chain reaction (RT-PCR) was performed to identify arbovirus genomes. To determine the Dengue virus serotypes, a semi-nested RT-PCR Multiplex protocol described by Lanciotti et. al; 1992, was used with some modifications¹⁵.

The cDNA samples were also tested for detection of the viral genome of DENV and ZIKV by the technique of Real-Time PCR (RT-qPCR). For simultaneous detection

of different Dengue virus serotypes (1-4) using the TaqMan reagent, the protocol described by Huhtamo et. al 2010 was followed¹⁶.

For detecting ZIKV and CHIKV, the protocol described by Lanciotti et. al; 2008¹⁷ and Lanciotti et. al; 2007¹⁸, were considered, respectively.

Nested RT-PCR reactions were performed to identify the genome of other viruses of the *Flavivirus* genus: Saint Louis Encephalitis virus (SLEV), West Nile virus (WNV), Ilhéus virus (ILHV), Yellow Fever virus (YFV), Rocio virus (ROCV)¹⁹; genus Alphavirus virus: Eastern Equine Encephalitis virus (EEEV), Western Equine Encephalitis virus (WEEV), Venezuelan Equine Encephalitis virus (VEEV), Mayaro virus (MAYV), Aura virus (AURA)²⁰, Chikungunya virus (CHIK)²¹ and Bunyavirus genus: Oropouche virus (OROV)²², for verification of probable cross-reaction.

Statistical analysis

The patient's clinical information with positive and negative CSF samples for viral genomes was described according to information in test orders and database, demographic variables of interest (gender, date of birth, date of collection, and age at collection), initial diagnostic hypothesis (IDH), and results of routine tests in the CSF. This information was described using absolute values (n), prevalence, as well as descriptive statistical results of continuous variables (median, mean). Data on symptoms, hospitalization, and use of medications were obtained by reading clinical records of patients who were positive for investigation of viral genomes. The prevalence of these findings and the respective confidence interval of 95% were calculated and Fisher's test was applied, considering the value of $p \leq 0.05$ as statistically significant.

Results

Characteristics of patients included in the study

From February 2017 to July 2018, CSF samples from 184 pediatric patients living in the city of Campinas/SP and surrounding region were included, with an average age of 2.2 years old (range 1 day to 18 years old), from the services provided at the Hospital of Clinics/State University of Campinas - HC/UNICAMP and CAISM/UNICAMP. Most of the identified cases with positive viral genomes resided in the city of Campinas (18/44, 41%).

Prevalence of DENV was 14.1% (CI 9.1%-19.1%) in CSF samples, ZIKV in 9.2% (CI 95% 5.03%-13.3%), and DENV plus ZIKV in 1 sample (2%). *Alphavirus* and *Bunyavirus* genus genome were not detected, therefore, there was no evidence of the infection of these arboviruses nor the presence of cross-reaction in the study group.

The characteristics of the pediatric patients included in the study, the initial diagnostic hypotheses (IDH), and the frequency of identification of arbovirus genomes correlated with IDH are presented in Table 1.

Table 2 presents the positive results of the molecular tests for DENV and ZIKV genomes (44) associated with the IDH. Among the total positives samples, the diagnoses of infection/sepsis 16/44 (36.4%), hydrocephalus and seizure 5/44 (11.4% each), meningitis and ICH 3/44 (6.8% each) stands out (Table 2).

DENV virus was the most detected etiologic agent in CSF, representing 59% (26/44) of positive samples. Of these, 12/26 (46.1%) had infection/sepsis and 5/26 (19.2%) patients had severe neurological manifestations, including 2 cases of meningitis, 1 of encephalitis, and 1 case of meningoencephalitis. Intracranial hypertension (ICH) was frequent in 2/26 cases (7.7%) there were also 1 case of acute disseminated encephalomyelitis (ADEM) and 1 of neuritis. (Table 2)

ZIKV was detected in the CSF of 17/44 (39%) of positive samples. Among them, 4/17 (23.5%) had infection/sepsis IDH, 2 cases of meningitis 1 of encephalitis, 2 GBS.

Meningitis occurred in one ZIKV positive case in a 10-month-old child born with microcephaly.

DENV and ZIKV coinfection was detected in a female, 17 years old, with no comorbidity, and arbovirus IDH. The main reported signs and symptoms were: fever, rash, pruritus, edema, arthralgia, vomiting, prostration, photophobia, and irritability. In the biochemical and cytological analysis of the CSF, there was no significant change, and the patient remained hospitalized for 16 days, receiving treatment with antibiotics and corticosteroids.

Table 3 shows the comparison between positive and negative patients for DENV and ZIKV viruses and IDH.

A total of 40/44 (91%) of patients with positive viral genome identification in the CSF had one or more signs and symptoms suggestive of systemic/neurological dysfunction. Regarding treatment, among the cases with identification for arboviruses, 33/44 (75%) were hospitalized, 25/44 (56.8%) received antibiotic treatment (even with negative microbiological culture tests in the CSF), and 14/44 (32%) received immunosuppressive/corticosteroid therapy (Table 4).

Discussion

Arboviruses are a major public health challenge, due to the lack of effective antiviral treatment and difficult vector control; as a consequence, they overload health services. Children with suspected neurological diseases may present symptoms of infections in the NS, however, viral agents are not always investigated as the cause of these infections, and antibiotic treatment is carried out, even with normal CSF biochemical and cytological results.

This study highlights the great challenge of differential diagnosis of neurological manifestations in children in an endemic region for numerous types of circulating arboviruses.

It can be observed that most patients admitted to health services with some report of neurological manifestation, rarely received a diagnostic hypothesis of viral infection. Molecular methods for detecting the RNA of these viruses are not included in the laboratory routine, making the differential diagnosis of infections in children's nervous system (NS) difficult^{23,24}.

It was verified that DENV and ZIKV viruses were present in 23.9% of the CSF surveyed samples, in which 14.1% were positive for DENV and 9.7% for ZIKV; 75% of positive cases were hospitalized, 56.8% received antibiotic treatment, and 31.8% steroids. Several initial diagnostic hypotheses for these patients included neurological diseases. These findings, even with at a lower prevalence, were also described in other studies carried out in Brazil^{6,24}.

We found DENV and ZIKV genomes in an interepidemic period (2017 and 2018), after intense circulation of dengue serotypes 1 and 2 in the city and region of Campinas in 2015 and 2016²⁵. Several studies draw attention to the neurological complications of dengue, especially during epidemics with circulating serotypes 2 and 3^{2,3}. In India, 2.6% of 5821 admitted patients with dengue shown neurological complication²⁶.

In the study period, there was also a drop in the incidence of ZIKV in the city, as in the Southeast region of Brazil⁸. Our results emphasize the importance of clinical suspicion and etiologic investigation of arbovirus infection even in periods of low incidence.

The ZIKV epidemic in 2015-2016 in the Americas was associated with numerous reports of neurological diseases, in addition to microcephaly in newborns. There was a

predominance of GBS in the regions affected by the epidemic, but cases of encephalopathy, encephalitis, meningitis, myelitis, and seizures have also been reported²⁴.

In 2009, the World Health Organization considered neurological manifestations as a sign of severe dengue, and there were several cases reported. A study carried out in Rio de Janeiro, between 2006-2008, showed that infection caused by the DENV virus was responsible for approximately 50% of hospitalizations for meningoencephalitis²⁷.

Cases of acute disseminated encephalomyelitis (ADEM) and neuritis are reported in the literature as possible autoimmune neurological manifestations, which occur due to immunological imbalance after infection by the DENV²⁸.

ICH was present among the positive cases of DENV and ZIKV in our study, as recorded in Southeast Brazil in 2017, when evidences of ICH in children with meningitis were associated with DENV²⁹.

The biochemical parameters found in the CSF of our samples showed hyperproteinorrhachia, hypoglycorrachia, and a slight increase in the number of leukocytes. In positive cases for ZIKV, hyperproteinorrhachia was present in 41% of cases. These findings were also reported in the study by Bastos et al., indicating that CSF laboratory results may show slight alterations in neurological disorders associated with viral infections²⁴.

ZIKV infection can be asymptomatic or cause mild illness; however, Guillain-Barré syndrome and other neurological complications can occur after virus infection³⁰. In this study, two patients with GBS were included and both were positive for ZIKV, confirming the previously reported findings of this association³⁰.

The clinical manifestations of the acute arbovirus infection in children seem to be very similar to those presented in adults, the most common signs and symptoms found may include acute fever, headache, myalgia, skin rash, arthralgia, and conjunctivitis^{27,30}.

According to Lima et al., most GBS cases were associated with ZIKV infection in Brazil³¹. In another study carried out in Colombia with pediatric patients, GBS was present in 41.6% of cases of neurological deficit associated with ZIKV, followed by viral encephalitis (17.7%)³². These data show important evidence about the connection between infection by this virus and neurological diseases.

Among the cases detected by any of the viruses studied, 29.5% were less than 1 year old; these findings reinforce the potential that Congenital Zika Virus syndrome (SCZ) can present in asymptomatic newborns after delivery, highlighting the need to implement an investigation of prenatal and neonatal screening using molecular methods for ZIKV detection in endemic regions as a standardized protocol.

Oliveira et al. recorded a high frequency of viral detection (62.9%) in the diagnosis of infection in the NS of children from Southeast Brazil, demonstrating the high efficiency of molecular methods such as RT-PCR for the diagnosis of these diseases²⁹.

The results of this study may contribute to increase the knowledge about the epidemiology of viral agents in pediatric NS infections. The detection of DENV in 14.1% and ZIKV in 9.1% of the analyzed CSF samples increases the relevance of this etiologic agent in NS infections. The association between the clinical features presented by the patient, and cytochemical parameters of the CSF do not seem to be sufficient for a more assertive diagnosis of infection caused by arboviruses. Therefore, molecular diagnosis is essential for the management of patients with SN infections, especially in endemic area for DENV, ZIKV and others arbovirus^{29,34}.

The viruses that most commonly produce acute encephalitis are herpesvirus (Herpes Simplex Virus type 1), varicella-zoster (VZV), and Epstein-Barr (EBV), arenavirus, and adenovirus³³, which were not investigated in this study. The negative cases for arboviruses presented in this work could be positive for these other viruses.

Pediatric patients are part of the vulnerable group for these diseases, as they have characteristics that facilitate the development of the most severe form, and permanent sequelae. The identification of cases may suggest a change in the severity profile; and genomic surveillance could contribute by monitoring the possible entry of new strains of these arboviruses.

Health professionals should be aware of, and consider neurological disorders as suspected cases of arboviruses and report them to the local health department to mitigate the risk of transmission. An assertive diagnosis of CSF neuroinfections by molecular biology is extremely important and this technique could be implemented in the laboratory routine, as many cases could receive adequate treatment, thus avoiding the unnecessary use of antibiotics and long hospitalization period.

Table 1: Patient's characteristics, genome prevalence of DENV and ZIKV arboviruses in CSF samples in relation with IDH

Features	n (total) 184	%	Arboviruses+ (%)
Average age (years) (range)	2.2 (1d-18a)	-	
Gender (Female/Male)	79/105	43/57	
IDH	n	%	DENV/ZIKV (%)
Infection/sepsis	67	36.4	16/67 (23.9)
Meningitis	26	14.1	3/26 (11.5)
Hydrocephaly	22	12.0	5/22 (22.7)
Convulsion	20	11.0	5/20 (25)
Epilepsy	7	4.0	0
ICH	5	3.0	3/5 (60)
Encephalitis	4	2.2	1/4 (25)
Headache	4	2.2	0
Neuritis	3	1.6	1/3 (33.3)
meningoencephalitis	3	1.6	1/3 (33.3)
Multiple sclerosis	3	1.6	0
RNC	2	1.0	2/2 (100)
GBS	2	1.0	2/2 (100)
Arbovirus/Zika	2	1.0	2/2 (100)
Derivation	2	1.0	0
Coma	2	1.0	0
NPMD	2	1.0	1/2 (50)
Others	8	4.3	3/8 (37.5)
TOTAL	184	100.0	44 (23.9)

Abbreviation: IDH: Initial diagnostic hypothesis; ICH: intracranial hypertension; LLC: lowered level of consciousness; GBS: Guillain-Barré Syndrome; NPMD: neuropsychomotor delay. Others: acute disseminated encephalomyelitis, hyporesponsiveness, facial paralysis, tetraparesis, ataxia, polyradiculopathy, radiculopathy, irritability. More than 1 symptom was presented per patient.

Table 2: Positive results of the molecular tests for DENV and ZIKV genomes in CSF samples of pediatric patients with neurological manifestations and association with IDH

Characteristics	Total+ (%)	DENV+ (%)	ZIKV+ (%)	DENV+ZIKV (%)
Total Samples	44 (23.9)	26 (59.0)	17 (39.0)	1 (2.0)
Average Age (years) (variation)	1.9 (2d-18y)	1.8 (15d-17y)	2.4 (2d-18y)	- (17th)
Gender - F/M (%)	21/23 (48/52)	11/15 (42/58)	10/7 (59/41)	1/- (100/-)
HDI:	N=44	N=26	N=17	N=1
Infection/sepsis	16 (36.4)	12 (46.1)	4 (23.5)	0
Hydrocephalus	5 (11.4)	2 (7.7)	3 (17.6)	0
Convulsion	5 (11.4)	3 (11.5)	2 (11.7)	0
Meningitis	3 (6.8)	2 (7.7)	1 (5.9)	0
ICH	3 (6.8)	2 (7.7)	1 (5.9)	0
LLC	2 (4.5)	0	2 (11.7)	0
Arboviruses	2 (4.5)	0	1 (5.9)	1 (100)
SGB	2 (4.5)	0	2 (11.7)	0
Encephalitis	1 (2.3)	1 (3.8)	0	0
Neuritis	1 (2.3)	1 (3.8)	0	0
Meningoencephalitis	1 (2.3)	1 (3.8)	0	0
ADEM	1 (2.3)	1 (3.8)	0	0
DNPM	1 (2.3)	0	1 (5.9)	0
Facial paralysis	1 (2.3)	1 (3.8)	0	0

Abbreviation: ICH: intracranial hypertension; LLC: lowered level of consciousness; GBS: Guillain-Barré

Syndrome; ADEM: acute disseminated encephalomyelitis; ADNP: delay

in neuropsychomotor development

Table 3 – Comparison between positive and negative CSF for DENV and ZIKV viruses of patients in relation to the Initial Diagnostic Hypothesis (IDH)

<i>Total</i>		DENV			ZIKV		
IDH	n	Pos.	Neg.	<i>p-value</i>	Pos.	Neg.	<i>p-value</i>
Infection/sepsis	67	12	55	0.288	4	63	0.0001
Meningitis	26	2	24	0.045	1	25	0.0064
Hydrocephalus	22	2	20	0.734	3	19	0.2938
Convulsion	20	3	17	0.575	2	18	0.1670
ICH	5	2	3	0.595	1	4	1,000
Encephalitis	4	1	3		0	4	-
Neuritis	3	1	2		0	3	-
meningoencephalitis	3	1	2		0	3	-
LLC	2	0	0		2	0	
GBS	2	0	0		2	0	
NPMD	2	0	0		1	1	
Others	8	2	6	0.6730	1	7	0.6730
TOTAL	184	26	158		17	147	

Abbreviation: Pos.: positive; Neg.: negative; ICH: intracranial hypertension; LLC: lowered level of consciousness; GBS: Guillain-Barré Syndrome; NPMD: neuropsychomotor delay. Others: acute disseminated encephalomyelitis, hyporesponsiveness, facial paralysis, tetraparesis, ataxia, polyradiculopathy, radiculopathy, irritability. More than 1 IDH was presented in any patient.

Table 4: Patients with DENV and ZIKV positive genomes and association with the main signs and symptoms, biochemical and cytological parameters in CSF, and treatment.

Variables	TOTAL(+) (%)	DENV(+) (%)	ZIKV(+)(%)	DENV+ZIKV(+) (%)
	44 (100)	26 (59.0)	17 (38.6)	1 (2,3)
Signs/Symptoms:	N=44	N=26	N=17	N=1
Fever	25 (56.8)	15 (57.7)	9 (53.0)	1 (100)
Vomiting/Nausea	16 (36.4)	8 (31.0)	7 (41.0)	1 (100)
Rash	6 (13.6)	4 (15.0)	1 (6.0)	1 (100)
Irritability	14 (31.8)	6 (23.0)	7 (41.0)	1 (100)
Headache	10 (22.7)	6 (23.0)	4 (24.0)	0
Convulsion	10 (22.7)	5 (19.0)	5 (30.0)	0
ICH	3 (6.8)	2 (8.0)	1 (6.0)	0
neuromotor alteration	11 (25.0)	5 (19.0)	6 (35.0)	0
CSF Analysis:				0
Hypoproteinorrhachia (≤ 42 mg/dl)	31 (70.0)	20 (77.0)	10 (59.0)	1 (100)
Hyperproteinorrhachia (> 42 mg/dl)	13 (29.5)	6 (23.0)	7 (41.0)	0
Hypoglycorrachia	20 (45.4)	13 (50.0)	7 (41.0)	0
Leukocyte (≤ 3 cells/mm ³)	33 (75.0)	22 (85.0)	11 (65.0)	0
Leukocyte (> 3 cells/mm ³)	11 (25.0)	4 (15.0)	6 (35.0)	1 (100)
Treatment:				
Hospitalization	33 (75.0)	19 (73.0)	13 (76.0)	1 (100)
ATB	25 (56.8)	14 (54.0)	10 (59.0)	1 (100)
Corticosteroids	14 (31.8)	9 (35.0)	4 (24.0)	1 (100)

Abreviattion: ICH: intracranial hypertension; CSF: cerebrospinal fluid; ATB: antibiotic.

References

- [1] Donalisio MR, Freitas AR, Zuben AP. Emerging arboviruses in Brazil: clinical challenges and implications for public health. *Rev. Public Health*. 2017; 51:30.
- [2] Verma, R., Sahu, R., & Holla, V. (2014). Neurological manifestations of dengue infection: a review. *Journal of the neurological sciences*, 346(1-2), 26-34.
- [3] Li, G. H., Ning, Z. J., Liu, Y. M., & Li, X. H. (2017). Neurological manifestations of dengue infection. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 7, 449.
- [4] Wasay M, Khatri IA, Abd-Allah F. Arbovirus infections of the nervous system: current trends and future threats. *Neurology*. 2015; 84: 421-423.
- [5] Ferreira JE, Ferreira SC, Almeida-Neto C, Nishiya AS, Alencar CS, Gouveia GR, et al. Molecular characterization of viruses associated with encephalitis in São Paulo, Brazil. *Plos One*. 2019 Jan 14;14.
- [6] Marinho PE, Bretas de Oliveira D, Candiani TM, Crispim AP, Alvarenga PP, Castro FC, et al. Meningitis associated with simultaneous multiple dengue virus serotypes infection in children, Brazil. *Emerging Infectious Diseases*. 2017; 115-118.
- [7] Brazil. Ministry of Health. Health Surveillance Secretariat. Epidemiological Bulletin. Monitoring of cases of urban arboviruses transmitted by Aedes (dengue, chikungunya and Zika), Epidemiological Weeks 01 to 52 of 2019 [Internet]. Brasília: Ministry of Health; 2020 [cited on Mar. 17, 2020]. Available in: <http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2020/janeiro/20/Boletim-epidemiologico-SVS-02-1-.pdf>
- [8] Brazil. Ministry of Health. Health Surveillance Secretariat. Monitoring of dengue, chikungunya fever and Zika virus fever cases until Epidemiological Week 52, 2017. *Bol Epidemiol*. 2018; 49:1-13. [cited 2018 Jul 14]. Available from: <http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2018/janeiro/23/Boletim-2018-001-Dengue.pdf>
- [9] Faria NR, Azevedo RD, Kraemer MU, Souza R, Cunha MS, Hill SC, et al. Zika virus in the Americas: early epidemiological and genetic findings. *Science*. 2016; 352:345-9.
- [10] Jain A, Chaturvedi UC. Dengue in infants: an overview. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2010; 59: 119-30.
- [11] Lima-Camara TN. Emerging arboviruses and public health challenges in Brazil. *Rev Public Health*. 2016;50-36.

- [12] Guimarães CP, Macedo MS, Barbosa MA, Marques SM, Costa PS, Oliveira EC. Clinical findings in congenital infection by Zika virus: retrospective study in a reference hospital in central west Brazil. *BMC Pediatrics*. 2019;19:389.
- [13] Silva Júnior JV, Lopes TR, Oliveira-Filho EF, Oliveira RA, Gil LH. Perspectives on the Zika outbreak: herd immunity, antibody-dependent enhancement and vaccine. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2017;59:e21.
- [14] Mehta R, Soares CN, Medialdea-Carrera R, Ellul M, da Silva MTT, Rosala-Hallas A, et al. The spectrum of neurological disease associated with Zika and chikungunya viruses in adults in Rio de Janeiro, Brazil: A case series. *PloS Negl Trop Dis*. 2018;12: e0006212.
- [15] Lanciotti RS, Calisher CH, Gubler DJ, Chang GJ, Vorndam AV. Rapid detection and typing of dengue viruses from clinical samples by using reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol*. 1992; 30: 545.
- [16] Huhtamo E, Hasua E, Uzcátegui NY, Erra E, Nikkari S, Kantele A, et al. Early diagnosis of dengue in travelers: Comparison of a novel real-time RT-PCR, NS1 antigen detection and serology. *Journal of Clinical Virology*. 2010; 47:49-53.
- [17] Lanciotti RS, Kosoy OL, Laven JJ, Velez JO, Lambert AJ, Johnson AJ, et al. Genetic and serologic properties of Zika virus associated with an epidemic, Yap state, Micronesia, 2007. *Emerging Infectious Diseases*. 2008; 14:1232-9.
- [18] Lanciotti RS, Kosoy OL, Laven JJ, Panella AJ, Velez JO, Lambert AJ, et al. Chikungunya virus in US travelers returning from India, 2006. *Emerging Infectious Disease*. 2007; 13: 764-7.
- [19] Bronzoni RV, Baleotti FG, Nogueira RM, Nunes M, Figueiredo LT. Duplex reverse transcription-PCR followed by nested PCR assays for detection and identification of Brazilian alphaviruses and flaviviruses. *Journal of Clinical Microbiology*. 2005; 43: 696-702.
- [20] Bronzoni RV, Moreli ML, Cruz AC, Figueiredo LT. Multiplex nested PCR for Brazilian alphavirus diagnosis. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2004; 98: 456-61.
- [21] Pfeiffer M, Linssen B, Parker MD, Kinney RM. Specific detection of chikungunya virus using the RT-PCR/Nested PCR combination. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health*. 2002; 49: 49-54.
- [22] Moreli ML, Aquino VH, Cruz AC, Figueiredo LT. Diagnosis of Oropouche virus infection by RT-Nested-PCR. *Journal of Medical Virology*. 2002; 66: 139-142.

- [23] Marine PE, Kroon EG. Flaviviruses as agents on childhood central nervous system infections in Brazil. *New Microbes New Infect.* 2019; 30: 100539.
- [24] Bastos MS, Martins VC, Silva NL, Jezine S, Pinto S, Aprigio V, et al. Importance of cerebrospinal fluid investigation during dengue infection in Brazilian Amazonia Region. *Mem Inst Oswaldo Cruz* [Internet]. 2019 [cited 2021 Feb 12]. Available from: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S007402762019000100300&lng=en 2019.
- [25] Campinas – Secretaria Municipal de Saúde. Informe Epidemiológico Arboviroses. Jan2020; available at https://saude.campinas.sp.gov.br/vigilancia/boletins_e_informes_tecnicos.htm
- [26] Kulkarni, R., Pujari, S., & Gupta, D. (2021). Neurological manifestations of dengue fever. *Annals of Indian Academy of Neurology*, 24(5), 693.
- [27] Martins MM, Prata-Barbosa A, da Cunha AJ. Arboviral diseases in pediatrics. *J Pediatr (Rio J)*. 2020; 96: 2-11.
- [28] Puccioni-Sohler M, Rosadas C, Cabral-Castro MJ. Neurological complications in dengue infection: a review for clinical practice. *Arch. Neuro-Psychiatr.* 2013; 71: 667-671.
- [29] Oliveira DB, Candiani TM, Franco-Luiz AP, Almeida GM, Abrahão JS, Rios M, et al. Etiological agents of viral meningitis in children from a dengue-endemic area, southeast region of Brazil. *Journal of the Neurological Sciences*. 2017; 375: 390-394.
- [30] Angelo JR, Fuller TL, Leandro BB, Praça HL, Marques RD, Ferreira JM, et al. Neurological complications associated with emerging viruses in Brazil. *Int J Gynecol Obstet.* 2020; 148: 70-75.
- [31] Lima ME, Bachur TP, Aragon GF. Guillain-Barre syndrome and its correlation with dengue, zika and chikungunya viruses infection based on a literature review of reported cases in Brazil. *Trop* 2019;197-105064.
- [32] Salgado DM, Vega R, Rodríguez JA, Niño A, Rodríguez R, Ortiz A, et al. Clinical, laboratory and immune aspects of Zika virus-associated encephalitis in children. *International Journal of Infectious Diseases*, 2020; 90:104-110.
- [33] Gilden DH. Acute viral central nervous system diseases. *ACP. Medicine*. 2008;1-13.
- [34] Bentes AA, de Castro Romanelli RM, Marinho PES, Crispim APC, Loutfi KS, Viegas ECC, Kroon EG. Risk factors for neurological complications in children with Flavivirus infection. *J Neurovirol.* 2021 Aug;27(4):609-615.

5. CONCLUSÃO

- Identificou-se uma alta frequência (23,9%) de genoma dos arbovírus DENV e ZIKV nos casos suspeitos de infecção neurológica nos pacientes pediátricos.
- A maioria das amostras não apresentaram alterações citológicas e bioquímicas no LCR e todos os resultados microbiológicos foram negativos para a identificação de fungos e bactérias.
- É de extrema importância um diagnóstico assertivo das neuroinfecções no LCR por biologia molecular e essa técnica poder ser incorporada na rotina laboratorial, pois muitos casos poderiam receber um melhor tratamento, evitando assim o uso desnecessário de antibióticos e longos períodos de hospitalização.

6. REFERÊNCIAS

1. Lopes N, Nozawa C, Linhares REC. Características gerais e epidemiologia dos arbovírus emergentes no Brasil. *Revista Pan-Amazônica de Saúde*. 2014; 5: 55-64.
2. Weaver SC, Reisen WK. Present and future arboviral threats. *Antiviral Res*. 2010; 85 (2):3 28-45.
3. Bronzoni RV dM, Baleotti FG, Nogueira RMR, Nunes M, Figueiredo LTM. Duplex Reverse Transcription-PCR Followed by Nested PCR Assays for Detection and Identification of Brazilian *Alphaviruses* and *Flaviviruses*. 2005.
4. Lima-Camara TNd. Emerging arboviruses and public health challenges in Brazil. *Rev SaúdePública*. 2016; 50: 36.
5. Marinho PE, Kroon EG. Flaviviruses as agents on childhood central nervous system infections in Brazil. *New Microbes New Infect*. 2019; 30: 100539.
6. Salimi H, Cain MD, Klein RS. Encephalitic Arboviruses: Emergence, Clinical Presentation, and Neuropathogenesis. *Neurotherapeutics*. 2016;13 (3):514-34.
7. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Vigilância sentinela das doenças neuroinvasivas por arbovírus, Brasil, 2017 a 2019. *Boletim Epidemiológico* 44; 2020[citado em 30 de novembro de 2021] disponível em https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/media/pdf/2020/novembro/13/boletim_epidemiologico_svs_44.pdf
8. Donalisio MR, Freitas ARR, Zuben APBV. Arboviroses emergentes no Brasil: desafios para a clínica e implicações para a saúde pública. *Rev Saúde Pública*. 2017; 51:30.

9. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Óbito por arboviroses no Brasil, 2008 a 2019. Boletim Epidemiológico 33; 2020 [citado em 30 de novembro de 2021] disponível em <http://plataforma.saude.gov.br/anomalias-congenitas/boletim-epidemiologico-SVS-33-2020.pdf>
10. Zanotto PMA, Leite LCC. The Challenges Imposed by Dengue, Zika and Chikungunya to Brazil. *Frontier in Immunology*. 2018; 9: 1964.
11. García-Sastre A, Endy TP. Arboviruses. In: Schaechter M, editor. *Encyclopedia of Microbiology (Third Edition)*. Oxford: Academic Press; 2009. p. 313-21.
12. Santos NOS, Romanos MTV, Wigg MD. *Virologia Humana*. 3. ed. Rio de Janeiro: GuanabaraKoogan; 2015. 488-489 p.
13. Ministério da Saúde. Dengue. [acesso em 30 de novembro de 2021] Disponível em <http://portalms.saude.gov.br/saude-de-a-z/dengue>
14. Dengue: diagnóstico e manejo clínico adulto e criança. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. – 5. ed. – Brasília : Ministério da Saúde, 2016. 58 p.
15. Tassara MP, Guilarde AO, Rocha B, Feres VCR, Martelli CMT. Neurological manifestations of dengue in Central Brazil. *RevSocBras Med Trop*. 2017; 50 (3): 379-82.
16. de Figueiredo ML, de CGA, Amarilla AA, de SLA, de SOA, de Araujo RF, et al. Mosquitoes infected with dengue viruses in Brazil. *Virology Journal*. 72010. p. 152.
17. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Monitoramento dos casos de dengue, febre do Chikungunya e doença aguda pelo vírus Zika até a Semana epidemiológica 49 de 2018. Boletim Epidemiológico 59; 2018

[acesso em 30 de novembro de 2021] disponível em <https://antigo.saude.gov.br/images/pdf/2019/janeiro/02/2018-067.pdf>

18. Ortiz-Martinez Y, Vega-Useche L, Villamil-Gomez WE, Rodriguez-Morales AJ. Saint Louis Encephalitis Virus, another re-emerging arbovirus: a literature review of worldwide research. *Infez Med*. 2017;25(1):77-9.
19. Figueiredo LTM, Universidade de São Paulo RP, Universidade de São Paulo RP. Saint Louis encephalitis virus and other arboviruses in the differential diagnosis for dengue. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2014;47(5):541-2.
20. Lorenz C, Azevedo TS, Virginio F, Aguiar BS, Chiaravalloti-Neto F, Suesdek L. Impact of environmental factors on neglected emerging arboviral diseases. *PLoS Negl Trop Dis*. 2017;11(9):e0005959.
21. Figueiredo LTM, Universidade de São Paulo RP, Brazil. Emergent arboviruses in Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2007; 40(2):224-9.
22. Neves AdS, Machado CJ. A reemergência do vírus Rocio no Brasil. *Ver Fac Ciênc Méd Sorocaba*. 2016; 18 (1): 61-2.
23. Flores EF, Universidade Federal de Santa Maria SM, Brasil, Weiblen R, Universidade Federal de Santa Maria SM, Brasil. O vírus do Nilo Ocidental. *Cienc Rural*. 2009; 39 (2): 604-12.
24. Pauvolid-Corrêa A, Instituto Oswaldo Cruz RdJ, Brasil, Varella RB, Universidade Federal do Rio de Janeiro B. Aspectos epidemiológicos da Febre do Oeste do Nilo. *Revista Brasileira de Epidemiologia*. 2008; 11 (3): 463-72.
25. Vieira MACS, Romano APM, Borba AS, Silva EVP, Chiang JO, Eulálio KD, et al. West Nile Virus Encephalitis: The First Human Case Recorded in Brazil. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 2015; 93 (2): 377-9.
26. Pauvolid-Corrêa A, Campos Z, Juliano R, Velez J, Nogueira RMR,

KomarN. Serological Evidence of Widespread Circulation of West Nile Virus and Other Flaviviruses in Equines of the Pantanal, Brazil. PLOS Neglected Tropical Diseases.2014; 8(2): e2703.

27. Pauvolid-Corrêa A, Kenney JL, Couto-Lima D, Campos ZMS, Schatzmayr HG, Nogueira RMR, et al. Ilheus Virus Isolation in the Pantanal, West-Central Brazil. PLoS Negl Trop Dis. 72013.

28. Henriques DF, Instituto Evandro Chagas/SVS/MS A, Brasil, Quaresma JAS, Universidade Federal do Pará B, Brazil, et al. Infecção persistente pelo vírus Ilheus em hamsters dourados (*Mesocricetusauratus*). Rev Pan-Amaz Saude. 2016;7(ESP): 189-98.

29. Azevedo RdSdS, MS A, Brasil, Barros VLRdS, MS A, Brasil, Martins LC, MS A, Brasil, et al. Estudo experimental sobre a patogenicidade do Vírus Ilhéus em hamsters dourados (*Mesocricetusauratus*). ver Pan-Amaz Saude. 2010;1(1):73-80.

30. Fernandes NA, Cunha MS, Guerra JM, Réssio RA, CirqueiraCdos S, Iglezias SD, et al. Outbreak of Yellow Fever among Non human Primates, Espirito Santo, Brazil, 2017. Emerg Infect Dis. 232017. p. 2038-41.

31. Cavalcante KRLJ, Tauil PL. Risco de reintrodução da febre amarela urbana no Brasil. Epidemiol Serv Saude. 2017;26:617-20.

32. Cavalcante KRLJ, Ministério da Saúde B, Brazil, Ministério da Saúde B, Brazil, Tauil PL, Universidade de Brasília B, Brazil, et al. Características epidemiológicas da febre amarela no Brasil, 2000-2012. EpidemiolServ Saúde. 2016;25(1):11-20.

33. Secretaria de Vigilância em Saúde. Governo do Estado de São Paulo. Boletim Epidemiológico Febre Amarela 23/04/2018 [acesso em 01 de Dezembro de 2021] Disponível em <http://www.saude.sp.gov.br/resources/cve-centro-de-vigilancia-epidemiologica/areas-de-vigilancia/doencas-de-transmissao-por->

[vetores-e-zoonoses/doc/famarela/fa18_boletim_epid_2304.pdf](#)

34. Mayer SV, Tesh RB, Vasilakis N. The emergence of arthropod-borne viral diseases: A global prospective on dengue, Chikungunya and Zika fevers. *Acta Tropica* 166 (2017) 155–163.
35. Nunes ML, Carlini CR, Marinowicz D, Neto FK, Fiori HH, Scotta MC, et al. Microcephaly and Zika virus: a clinical and epidemiological analysis of the current outbreak in Brazil. *J Pediatr*. 2016;92(3):230–40.
36. Musso D, Ko AI, Baud D. Zika virus infection — After the pandemic. *N Engl J Med*. 2019;381(15):1444–57.
37. Albuquerque MFPM, de Souza WV, Araújo TVB, Braga MC, Miranda-Filho D de B, Ximenes RA de A, et al. The microcephaly epidemic and Zika virus: Building knowledge in epidemiology. *Cad Saude Publica*. 2018;34(10).
38. Griffin DE. Alphaviruses. In: Knipe DM, Howley PM, editors. *Fields virology*. 5th. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2007. p. 1023-67.
39. Hernandez R, Brown DT, Paredes A. Structural differences observed in arbovirus of the alphavirus and flavivirus genera. *Adv Virol*. 2014;2014:259382.
40. Silva LA, Dermody TS. Chikungunya virus: epidemiology, replication, disease mechanisms, and prospective intervention strategies. *J Clin Invest*. 2017;127(3):737–749.
41. Cunha RV, Trinta KS. Chikungunya virus: clinical aspects and treatment- A Review. *Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro*, Vol. 112(8): 523-531, August 2017.
42. Zacks MA, Paessler S. Encephalitis Alphaviruses. *Vet Microbiol*. 2010;140(3-4):281.
43. Rust RS. Human arboviral encephalitis. *Semin Pediatr Neurol*. 2012;19(3):

130-51.

44. Go YY, Balasuriya UBR, Lee C. Zoonotic encephalitides caused by arboviruses: transmission and epidemiology of alphaviruses and flaviviruses. *ClinExpVaccine Res.* 2014; 3(1): 58-77.
45. Figueiredo MLGd, Instituto Evandro Chagas B, Brazil, Universidade de São Paulo RP, Brazil, Figueiredo LTM, et al. Emerging alphaviruses in the Americas: Chikungunya and Mayaro. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2014;47 (6): 677-83.
46. Figueiredo RMPD, Thatcher BD, Lima MLd, et al. Doenças exantemáticas e primeira epidemia de dengue ocorrida em Manaus, Amazonas, no período de 1998-1999. *RevSocBras Med Trop.* 2004; 37(6): 476-9.
47. Rumenapf T, Strauss EG, Strauss JH. Aura virus is a New World representative of Sindbis-like viruses. *Virology.* 1995; 208(2): 621-33.
48. Zhang W, Fisher BR, Olson NH, Strauss JH, Kuhn RJ, Baker TS. Aura Virus Structure Suggests that the T=4 Organization Is a Fundamental Property of Viral Structural Proteins. *JournalofVirology.* 2002: 7239-46.
49. Travassos da Rosa JF, de Souza WM, Pinheiro FP, Figueiredo ML, Cardoso JF, Acrani GO, et al. Oropouche Virus: Clinical, Epidemiological, and Molecular Aspects of a Neglected Orthobunyavirus. *Am J Trop Med Hyg.* 2017; 96 (5): 1019-30.
50. Bastos MS, Figueiredo LTM, Naveca FG, Monte RL, Lessa N, Pinto de Figueiredo RM, et al. Short Report: Identification of Oropouche *Orthobunyavirus* in the Cerebrospinal Fluid of Three Patients in the Amazonas, Brazil. *Am J Trop Med Hyg.* 2012; 86 (4): 732-5.
51. Rodrigues AH, Santos RI, Arisi GM, Bernardes ES, Silva ML, Rossi MA, et al. Oropouche virus experimental infection in the golden hamster

(*Mesocricetus auratus*). Virus Res. 2011; 155 (1): 35-41.

52. Moreli ML, Aquino VH, Cruz AC, Figueiredo LT. Diagnosis of Oropouche virus infection by RT-nested-PCR. J Med Virol. 2002; 66 (1): 139-42.

53. Bastos MS, Lessa N, Naveca FG, Monte RL, Braga WS, Figueiredo LT, et al. Detection of Herpesvirus, Enterovirus, and Arbovirus infection in patients with suspected central nervous system viral infection in the Western Brazilian Amazon. J Med Virol. 2014;86 (9):1522-7.

54. Bronzoni RV, Moreli ML, Cruz AC, Figueiredo LT. Multiplex nested PCR for Brazilian Alphavirus diagnosis. Trans R Soc Trop Med Hyg. 2004;98(8):456-61.

55. International committee on taxonomy of viruses (ICTV). 2014. Virus Taxonomy: 2014 Release. Disponível em: <https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_online_report/positive-sense-rna-viruses/w/flaviviridae/360/genus-flavivirus> Acesso em 10.08.2018.

56. Eifan, S. et al. Non-Structural Proteins of Arthropod-Borne Bunyaviruses: Roles and Functions. Viruses, v.5, p.2447-2468, 2013.

57. Lanciotti RS, Calisher CH, Gubler DJ, Chang GJ, Vorndam AV. Rapid detection and typing of dengue viruses from clinical samples by using reverse transcriptase-polymerase chain reaction. J. Clin. Microbiol. 1992; 30: 545.

58. Huhtamo E, Hasua E, Uzcátegui NY, Erra E, Nikkari S, Kantele A, et al. Early diagnosis of dengue in travelers: Comparison of a novel real-time RT-PCR, NS1 antigen detection and serology. Journal of Clinical Virology. 2010; 47:49-53.

59. Lanciotti RS, Kosoy OL, Laven JJ, Velez JO, Lambert AJ, Johnson AJ, et al. Genetic and serologic properties of Zika virus associated with an epidemic, Yap state, Micronesia, 2007. Emerging Infectious Diseases. 2008; 14:1232-9.

60. Lanciotti RS, Kosoy OL, Laven JJ, Panella AJ, Velez JO, Lambert AJ, et

al. Chikungunya virus in US travelers returning from India, 2006. *Emerging Infectious Disease*. 2007; 13: 764-7.

61. Pfeffer M, Linssen B, Parker MD, Kinney RM. Specific detection of chikungunya virus using the RT-PCR/Nested PCR combination. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health*. 2002; 49: 49-54.

62. Martins MM, Prata-Barbosa A, da Cunha AJ. Arboviral disease in pediatrics. *J Pediatr (Rio J)*. 2020; 148:70-75.

63. Li GH, Ning ZJ, Liu YM, Li XH. Neurological manifestations of Dengue Infection. *Front Cell Infect Microbiol*. 2017;7-449.

64. Leon LL, Lima RG, Boffi LC, Bindilatti RN, Garlipp CR, Costa SCB, Bonon SHA. Arbovirus, herpesvirus, and enterovirus associated with neurological syndromes in adult patients of a university hospital, 2017-2018. *Rev Soc Bras Med Trop*. Vol.:54. (e0127-2021), 2021.

7. ANEXOS

ANEXO 1. APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

 CEP UNICAMP COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA	UNICAMP - CAMPUS CAMPINAS	 Plataforma Brasil												
PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP														
DADOS DA EMENDA														
Título da Pesquisa: Zika Vírus e outros vírus causadores de síndromes neurológicas em pacientes atendidos no Hospital de Clínicas da Universidade Estadual de Campinas. Estudo de coorte prospectivo.														
Pesquisador: SANDRA HELENA ALVES BONON														
Área Temática:														
Versão: 5														
CAAE: 59361816.3.0000.5404														
Instituição Proponente: Hospital de Clínicas da UNICAMP														
Patrocinador Principal: Financiamento Próprio														
DADOS DO PARECER														
Número do Parecer: 3.010.312														
Apresentação do Projeto: A pesquisadora responsável apresentou a emenda ao projeto original solicitando a inclusão de duas alunas de mestrado como equipe de pesquisa no projeto de pesquisa.														
Objetivo da Pesquisa: Mantém os mesmos do projeto original.														
Avaliação dos Riscos e Benefícios: Mantém os mesmos do projeto original.														
Comentários e Considerações sobre a Pesquisa: Trata-se de uma emenda ao projeto original, solicitando a inclusão de duas alunas de Mestrado do curso de Pós-Graduação em Saúde da Criança e do Adolescente, RAÍSSA NERY BINDILATTI e LÍDIA CRISTIAN DE OLIVEIRA BOFFI, como parte da equipe de pesquisa. Os projetos de pesquisa dessas alunas já estão contemplados no projeto original avaliado e aprovado pelo CEP (CAAE 59361816.3.0000.5404). Inclusive os TCLE já contemplam o estudo dos enterovírus, herpesvírus e arbovírus, em Líquido cefalorraquidiano (LCR) de pacientes pediátricos e adultos. A aluna Raissa														
<table border="0" style="width: 100%;"> <tr> <td colspan="2">Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126</td> <td>CEP: 13.093-867</td> </tr> <tr> <td colspan="2">Bairro: Barão Geraldo</td> <td></td> </tr> <tr> <td>UF: SP</td> <td>Município: CAMPINAS</td> <td></td> </tr> <tr> <td>Telefone: (19)3521-6936</td> <td>Fax: (19)3521-7187</td> <td>E-mail: cep@fzsc.unicamp.br</td> </tr> </table>			Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126		CEP: 13.093-867	Bairro: Barão Geraldo			UF: SP	Município: CAMPINAS		Telefone: (19)3521-6936	Fax: (19)3521-7187	E-mail: cep@fzsc.unicamp.br
Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126		CEP: 13.093-867												
Bairro: Barão Geraldo														
UF: SP	Município: CAMPINAS													
Telefone: (19)3521-6936	Fax: (19)3521-7187	E-mail: cep@fzsc.unicamp.br												



Continuação do Parecer: 3.010.312

Nery Bindilatti irá fazer a "ANÁLISE DA PRESENÇA DE ENTEROVÍRUS NÃO-PÓLIO EM AMOSTRAS DE LÍQUIDO CEFALORRAQUIANO DE PACIENTES PEDIÁTRICOS COM MENINGITE ASSÉPTICA". A aluna Lidia Crislian de Oliveira Boff estudará "DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE ARBOVIROSES BRASILEIRAS EM LÍQUIDO CEFALORRAQUIANO DE PACIENTES PEDIÁTRICOS NEGATIVOS PARA DENGUE".

A pesquisadora responsável referiu que o projeto de pesquisa foi aprovado na Fapesp no. 2016/17031-4, sendo sua vigência até 30/12/2019.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Os seguintes documentos foram apresentados: a) Folha de rosto devidamente preenchida, b) Informações básicas da pesquisa, c) Projeto de pesquisa, d) Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Recomendações:

Nenhuma.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Emenda APROVADA.

Considerações Finais a critério do CEP:

- O participante da pesquisa deve receber uma via do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado (quando aplicável).

- O participante da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado (quando aplicável).

- O pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado. Se o pesquisador considerar a descontinuação do estudo, esta deve ser justificada e somente ser realizada após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou. O pesquisador deve aguardar o parecer do CEP quanto à descontinuação, exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao participante ou quando constatar a superioridade de uma estratégia diagnóstica ou terapêutica oferecida a um dos grupos da pesquisa, isto é, somente em caso de necessidade de

Endereço: Rua Tassile Vieira de Camargo, 126
Bairro: Barão Geraldo CEP: 13.083-887
UF: SP Município: CAMPINAS
Telefone: (19)3521-6936 Fax: (19)3521-7187 E-mail: cep@fcm.unicamp.br



Continuação do Parecer: 1.010.112

ação imediata com intuito de proteger os participantes.

- O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo. É papel do pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP e à Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA – junto com seu posicionamento.

- Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas e aguardando a aprovação do CEP para continuidade da pesquisa. Em caso de projetos do Grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o pesquisador ou patrocinador deve enviá-las também à mesma, junto com o parecer aprovatório do CEP, para serem juntadas ao protocolo inicial.

- Relatórios parciais e final devem ser apresentados ao CEP, inicialmente seis meses após a data deste parecer de aprovação e ao término do estudo.

- Lembramos que segundo a Resolução 466/2012, Item XI.2 letra e, "cabe ao pesquisador apresentar dados solicitados pelo CEP ou pela CONEP a qualquer momento".

- O pesquisador deve manter os dados da pesquisa em arquivo, físico ou digital, sob sua guarda e responsabilidade, por um período de 5 anos após o término da pesquisa.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMACOES_BASICAS_121854_8_E2.pdf	01/10/2018 16:45:59		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	termodeconsentimento.pdf	18/11/2018 17:23:57	SANDRA HELENA ALVES BONON	Aceito
Outros	cartaresposta2.pdf	10/10/2018 14:34:21	SANDRA HELENA ALVES BONON	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura	PROJETOSNETICA2016.pdf	10/10/2018 12:10:58	SANDRA HELENA ALVES BONON	Aceito

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126
Bairro: Barão Geraldo CEP: 13.083-887
UF: SP Município: CAMPINAS
Telefone: (19)3521-8036 Fax: (19)3521-7187 E-mail: cep@fcm.unicamp.br



Continuação do Parecer: 3.010.312

Investigador	PROJETOSNETICA2016.pdf	10/10/2016 12:10:58	SANDRA HELENA ALVES BONON	Aceito
Outros	TERMODISPENSA2.pdf	10/10/2016 11:59:46	SANDRA HELENA ALVES BONON	Aceito
Cronograma	CRONOGRAMAATIVIDADESoutubro2016.pdf	10/10/2016 11:57:44	SANDRA HELENA ALVES BONON	Aceito
Folha de Rosto	folhadestohc.pdf	10/08/2016 16:33:32	SANDRA HELENA ALVES BONON	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

CAMPINAS, 09 de Novembro de 2016

Assinado por:
Renata Maria dos Santos Coleghini
(Coordenador(a))

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126
Bairro: São Geraldo CEP: 13.083-887
UF: SP Município: CAMPINAS
Telefone: (19)3521-6936 Fax: (19)3521-7167 E-mail: cep@fcm.unicamp.br