



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS

RAISSA NERY BINDILATTI

INVESTIGAÇÃO MOLECULAR DE ENTEROVÍRUS E HERPESVÍRUS EM LÍQUIDO
CEFALORRAQUIDIANO DE CRIANÇAS COM MANIFESTAÇÕES
NEUROLÓGICAS

CAMPINAS

2022

RAISSA NERY BINDILATTI

**INVESTIGAÇÃO MOLECULAR DE ENTEROVÍRUS E HERPESVÍRUS EM LÍQUIDO
CEFALORRAQUIDIANO DE CRIANÇAS COM MANIFESTAÇÕES
NEUROLÓGICAS**

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.

ORIENTADOR: PROFA. DRA. SANDRA HELENA ALVES BONON

**ESTE TRABALHO CORRESPONDE À VERSÃO
FINAL DA DISSERTAÇÃO DEFENDIDA PELA
ALUNA RAISSA NERY BINDILATTI, 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

B511i Bindilatti, Raissa Nery, 1992-
Investigação molecular de enterovírus e herpesvírus em líquido cefalorraquidiano de crianças com manifestações neurológicas / Raissa Nery Bindilatti. – Campinas, SP : [s.n.], 2022.

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

1. Enterovirus. 2. Reação em cadeia da polimerase. 3. Crianças. I. Bonon, Sandra Helena Alves. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Informações Complementares

Título em outro idioma: Molecular investigation of enterovirus and herpesvirus in cerebrospinal fluid of children with neurological manifestations

Palavras-chave em inglês:

Enterovirus

Polimerase chain reaction

Children

Área de concentração: Saúde da Criança e do Adolescente

Titulação: Mestra em Ciências

Banca examinadora:

Sandra Helena Alves Bonon [Orientador]

Maria Rita Donalisio Cordeiro

Glaucia Elisete Barbosa Marcon

Data de defesa: 30-11-2022

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

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

- ORCID do autor: <https://orcid.org/0000-0002-5521-1978>

- Currículo Lattes do autor: https://www.cnpq.br/cvlattesweb/PKG_MENU.men

COMISSÃO EXAMINADORA DA DEFESA DE MESTRADO

RAISSA NERY BINDILATTI

ORIENTADORA: PROFA. DRA. SANDRA HELENA ALVES BONON

MEMBROS:

1. PROFA. DRA. SANDRA HELENA ALVES BONON - PRESIDENTE

2. PROFA. DRA. MARIA RITA DONALISIO CORDEIRO

3. PROFA. DRA. GLAUCIA 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: 30/11/2022

DEDICATÓRIA

Primeiramente a Deus, que é a base de tudo na minha vida;

À minha Família, que sempre me apoiou em todos os passos da minha vida;

À Prof^a. Dra. Sandra Helena Alves Bonon, que dedicou seu tempo para me ensinar e orientar, transmitindo seu conhecimento para que esse trabalho fosse realizado;

À Unicamp e ao Laboratório de Virologia da FCM, lugar onde eu aprendi muito, tive a oportunidade de fazer cursos e conhecer grandes pessoas;

Ao Laboratório de Líquidos Biológicos do HC/UNICAMP por ceder as amostras biológicas usadas nesse trabalho;

Aos meus colegas do Laboratório de Virologia da FCM;

À todas as pessoas que de alguma forma passaram pela minha vida e contribuíram direta ou indiretamente para que esse trabalho tomasse forma.

Obrigada!

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

Infecções neurológicas pediátricas podem ser causadas por vírus, dentre eles os da família Herpesvírus e Enterovírus. A análise do líquido cefalorraquidiano (LCR) pode fornecer informações que pode indicar doenças que acometem o sistema nervoso central (SNC), incluindo infecções. A análise molecular do genoma viral é um exame complementar que auxilia na identificação do agente infeccioso, causador da doença neurológica. Diante desse exposto, o objetivo do trabalho foi: Identificar a presença dos genomas de Herpesvírus e Enterovírus através de técnicas moleculares em amostras de 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 com resultados dos exames no LCR. Neste estudo, utilizamos a técnica da Reação em Cadeia da Polimerase tipo nested (N-PCR) e a Transcriptase reversa seguida pela Reação em Cadeia da Polimerase PCR (RT-PCR) na identificação dos Herpesvírus e do Enterovírus não pólio em amostras de LCR. O estudo incluiu amostras de LCR de pacientes menores de 18 anos, com suspeita clínica de infecção viral no sistema nervoso. Do total de 186 crianças, a prevalência de positividade viral foi de 11,8% (20/169). Destes, 60% foi identificado o genoma de Enterovírus (12/20). Positividade na identificação de vírus da família *Herpesviridae* ocorreu em 8/20 pacientes (40%), sendo que 4/8 pacientes (50%) foram positivos para o Herpesvírus tipo 6, 2/8 (25%) para o Herpesvírus simples tipo 2 e 1/8 (12,5%) para o varicela zoster ou Herpesvírus tipo 3. Coinfecção entre espécies de Herpesvírus ocorreu em 2/8 casos (25%), Meningite foi a doença neurológica encontrada em maior frequência em 6 casos (30%). Pleocitose foi encontrada em 11 pacientes (55%). Sendo assim podemos concluir que o genoma do Enterovírus foi o mais prevalente seguido dos Herpesvírus 6 e Herpesvírus simples tipo 2. A presença de meningite, hipertensão intracraniana, febre, linfocitose e neutrófilos no LCR foram significativos em comparação com os pacientes negativos. A análise molecular de vírus no LCR é importante nas crianças com suspeitas de infecção viral no SNC que não são identificadas pelas técnicas bioquímicas e citológicas do LCR.

Palavras-Chave: Enterovírus; Herpesvírus; Sistema Nervoso Central; Reação em Cadeia da Polimerase; Crianças.

ABSTRACT

Pediatric neurological infections can be caused by viruses, including those of the Herpesvirus and Enterovirus family. Analysis of cerebrospinal fluid (CSF) can provide information that may indicate diseases that affect the central nervous system (CNS), including infections. Molecular analysis of the viral genome is a complementary test that helps identify the infectious agent that causes the neurological disease. In view of the above, the objective of the study was: To identify the presence of Herpesvirus and Enterovirus genomes through molecular techniques in CSF samples from children with suspected infection in the nervous system and to associate the results with the signs and symptoms of neurological dysfunction and/or or systemic, and with CSF test results. In this study, we used the technique of Nested Polymerase Chain Reaction (N-PCR) and reverse transcriptase PCR (RT-PCR) to identify Herpesviruses and non-polio Enteroviruses in CSF samples. The study included CSF samples from patients younger than 18 years old with clinical suspicion of viral infection in the nervous system. Of the total of 186 children, the prevalence of viral positivity was 11.8% (20/169). Of these, 60% the Enterovirus genome was identified (12/20). Positivity in the identification of viruses of the Herpesviridae family occurred in 8/20 patients (40%), of which 4/8 patients (50%) were positive for Herpesvirus type 6, 2/8 (25%) for Herpes simplex virus type 2 and 1/8 (12.5%) for varicella zoster or Herpesvirus type 3. Co-infection between Herpesviruses occurred in 2/8 cases (25%), Meningitis was the most frequent neurological disease in 6 cases (30%). Pleocytosis was found in 11 patients (55%). Therefore, we can conclude that the Enterovirus genome was the most prevalent, followed by Herpesvirus 6 and Herpes simplex virus type 2. The presence of meningitis, intracranial hypertension, fever, lymphocytosis and neutrophils in the CSF were significant in comparison with negative patients. Molecular analysis of CSF viruses is important in children with suspected CNS viral infections that are not identified by CSF biochemical and cytological techniques.

Keywords: Enterovirus; Herpesvirus; Central Nervous System; Polymerase Chain Reaction; Children.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

	pág.
Figura 1: Estrutura do Enterovírus	15
Figura 2: Genoma dos Picornavírus	16
Figura 3: Estrutura do Herpesvírus Simples	18
Figura 4: Estrutura do Epstein-Barr	19
Figura 5: Estrutura do Citomegalovírus	20

LISTA DE TABELAS

		pág.
Tabela 1	Sequência dos primers utilizados nos protocolos das reações para Enterovírus.	26
Tabela 2	Primers usados na detecção dos Herpesvírus nas reações de Nested-PCR.	27

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

SN – Sistema Nervoso

SNC – Sistema Nervoso Central

DNA – Ácido Desoxirribonucleico

cDNA – DNA complementar

RNA – Ácido Ribonucleico

LCR – Líquido Cefalorraquidiano

PCR – Reação em Cadeia da Polimerase

RT-PCR – Transcriptase Reversa seguida pela Reação em Cadeia da Proteinase

MA – Meningite Asséptica

SMA – Síndrome da Meningite Asséptica

EVNP – Enterovírus Não Pólio

EV - Enterovírus

HHV – Herpesvírus

HSV – Herpesvírus Simples

HHV-3 – Herpesvírus 3

HHV-4 – Herpesvírus 4

HHV-5 – Herpesvírus 5

HHV-6 – Herpesvírus 5

EBV – Epstein Barr Vírus

VZV – Varicela Zoster Vírus

CMV – Citomegalovírus

HDI – Hipótese Diagnostica Inicial

TCLE – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

DNPM- Desenvolvimento Neuropsicomotor

Sumário

1	Introdução	13
1.1	Líquido Cefalorraquidiano (LCR)	14
1.2	Família <i>Picornaviridae</i>	15
1.3	Família <i>Herpesviridae</i>	16
1.3.1	Herpesvírus simplex tipo 1 e 2 (HSV-1 e HSV-2)	17
1.3.2	Varicela Zoster (VZV)	18
1.3.3	Vírus Epstein-Barr (EBV)	18
1.3.4	Citomegalovírus (CMV)	19
1.3.5	Herpesvírus tipo 6 (HHV-6)	19
1.4	Diagnóstico Laboratorial	20
2	Objetivos	22
3	Metodologia	23
3.1	CrITÉrios de Inclusão	23
3.2	CrITÉrios de Exclusão	24
3.3	Extração de RNA/DNA	24
3.4	Transcriptase Reversa seguida pela PCR para Enterovírus	24
3.5	Avaliação dos produtos de RT-PCR da Região 5'NC por eletroforese em gel de agarose	25
3.6	Metodologias para identificação do genoma dos Herpesvírus Humano (HHV)	26
3.7	Variáveis e Análise estatística	28
4	Resultados	29
5	Conclusão	60
6	Referências	61
7	Anexos	68

1 Introdução

Infecções virais do sistema nervoso (SN) são de grande importância para a saúde humana, principalmente das crianças e recém-nascidos, podendo se tornar doenças complexas pela variedade de agentes infecciosos e pela faixa etária¹.

A meningite é uma doença caracterizada pela inflamação das meninges, que são membranas que envolvem e protegem o sistema nervoso central (SNC) e a medula espinhal, situadas no espaço subaracnóideo. Ela ocorre quando há inflamação meníngea de etiologia não bacteriana, ou seja, quando o líquido cefalorraquidiano (LCR) se encontra límpido e os exames microbiológicos para bactérias e fungos negativos, sendo eles: coloração de Gram, tinta da China e cultura².

A inflamação das meninges pode se dar por agentes químicos, biológicos e farmacológicos^{1,2}.

As meningites virais são de notificação compulsória, tem distribuição universal e os casos se elevam no final do verão e começo do outono³ com maior frequência na região Sul e Sudeste⁴. Entre 2017 e 2018 foram notificados 9.189/100.000 casos de meningite viral no estado de São Paulo⁵.

Existem dois tipos de meningites, a bacteriana e a asséptica. Na meningite bacteriana, geralmente o LCR apresenta-se purulento, turvo, com grande aumento de leucócitos (pleocitose evidente, que pode ultrapassar 500 células/mm³), predominantemente polimorfonucleares, valor de proteína aumentado e de glicose diminuído. Já na meningite asséptica (MA), o LCR apresenta-se geralmente opalescente, levemente xantocrômico ou límpido, com aumento moderado de leucócitos (pleocitose moderada, menos de 500 células/mm³) predominantemente linfomononucleares, e valores de proteína e glicose normais. Estes e outros fatores importantes como período de coleta do LCR, administração prévia de antibióticos, sintomatologia, entre outros, dificultam o diagnóstico imediato da etiologia da meningite no primeiro contato médico-paciente^{6,1}.

Dentre os vírus causadores da Síndrome da Meningite Asséptica (SMA) podemos citar os Enterovírus, o Sarampo, os Herpesvírus, a Influenza, dentre outros. A infecção por Enterovírus é a causa mais comum de MA em adultos e em crianças, podendo ocorrer em 90% desses casos⁷.

O tratamento da MA é apenas sintomático, a terapia antiviral é usada nos casos mais graves, principalmente nas infecções por Herpesvírus Simples 1 e 2 (HSV-1 e 2) ou nos imunocomprometidos⁸.

A encefalite é uma inflamação no parênquima cerebral que pode ser de origem infecciosa ou não, os sintomas variam desde febre, alterações no nível de consciência, dores de cabeça. O agente causador mais comum das encefalites são os Herpesvírus, seguido dos Enterovírus. É estimado que 3% dos pacientes infectados pelo Enterovírus que tem meningite asséptica desenvolvem encefalite durante a infecção⁹.

A incidência da encefalite é de 3,5 a 7,4/100.000 casos, aumentando para 16/100.000 casos em crianças,¹⁰ mundialmente, ela ocorre normalmente no fim do verão e começo do outono.

Cerca de 30% dos casos de encefalopatia herpética estão relacionados à infecção primária do HSV, e 70% dos casos estão relacionados a reativação do HSV⁸.

Os principais sintomas nas crianças são febre leve seguida de dores de cabeça, náuseas, vômito e alterações de consciência, podem ocorrer também convulsões. A anamnese em crianças é muito importante, para investigar de onde pode originar esse histórico da infecção (viagens, vacinas, contatos etc.)¹⁰.

O prognóstico das encefalites virais está relacionado diretamente com a idade dos pacientes e o grau de acometimento neurológico no início do tratamento. Pacientes que apresentam um grau de acometimento neurológico grave no início do quadro evoluem para óbito ou sequelas graves no futuro, já os pacientes mais novos (< 30 anos) com grau de acometimento neurológico leve, evoluem para sobrevivência e sequelas leves no futuro¹⁰.

O tratamento das encefalites envolve monitoramento da pressão intracraniana e o uso de antiviral nas infecções pelo HSV é também usado empiricamente, enquanto não se tem um diagnóstico definido⁸.

Os exames de imagem também são muito importantes no diagnóstico da encefalite, essencial também para diferenciar as encefalites infecciosas das não infecciosas¹⁰.

1.1 Líquido Cefalorraquidiano (LCR)

O LCR é um líquido límpido e incolor, formado nos plexos coróides, sua composição é aproximadamente 99% de água, pequenas concentrações de

magnésio, cloro, glicose, proteínas, aminoácidos, ácido úrico e fosfato, e sua função é de sustentação do SNC, fornecimento de nutrientes e manutenção da homeostase. A análise desse líquido nos fornece informações sobre doenças que acometem o SNC, como infecções, hemorragias, doenças degenerativas e neoplasias.

A análise do LCR consiste em análise visual, citologia, bacterioscopia, e exame bioquímico, além de testes moleculares¹¹.

1.2 Família *Picornaviridae*

Os Enterovírus (EVs) pertencem à família *Picornaviridae*, possuem formato esferoidal com capsídeo icosaedro composto por 60 capsômeros (Figura 1).

Cada capsômero é formado por 4 polipeptídios estruturais VP1, VP2, VP3, VP4. Seu genoma é constituído por RNA de fita simples e possui polaridade positiva, ou seja, ele é infeccioso para seres humanos¹².

Structure of Enterovirus

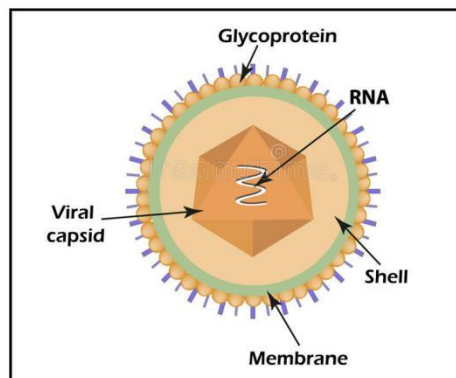


Figura 1: Estrutura do Enterovírus

Fonte: Dreamsteam.com¹³

O genoma é traduzido no citoplasma e gera uma poliproteína que é processada em proteínas maduras incluindo as proteínas do capsídeo VP 1-4 e em outras tantas como RNA dependente, RNA polimerase e protease, proteínas de direção intracelular e proteínas que ajudam a criar o ambiente perfeito de replicação¹⁴.

O RNA dos Picornavírus é ligado covalentemente a uma proteína chamada VPG, (Figura 2) que pode ser uma proteína iniciadora da síntese de RNA. As regiões 5' não codificantes contém regiões responsáveis pela replicação e tradução¹⁵.

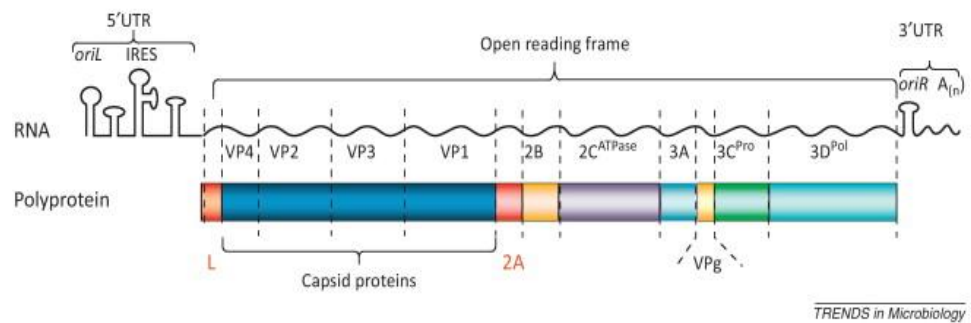


Figura 2: Genoma dos Picornavírus

Fonte: AGOL, 2012¹⁴

Os Enterovírus compreendem mais de 100 sorotipos humanos, dentre eles Poliovírus (3 sorotipos), Coxsackievírus A (Cox A, 24 sorotipos), Coxsackievírus B (Cox B, 6 sorotipos), Echovírus (Echo, 31 sorotipos), e os Enterovírus (EV-68-71), os quatro últimos são classificados como Enterovírus não-pólio (EVNP)^{1,2}. As infecções por Enterovírus são mais frequentes no verão e outono nas áreas tropicais e subtropicais¹⁵.

Além da meningite asséptica, os EVNP podem causar miocardites, doença de mãos, pés e boca, paralisias flácidas, doenças respiratórias e sepse neonatal¹⁶. A idade tem forte associação com os sítios da infecção e as infecções no sistema nervoso são mais comuns em idades que variam de 5-15 anos e miocardites de 20-40 anos, doença de sepse neonatal e doença de pés mãos e boca em crianças menores que 5 anos¹⁷. Podemos citar o EV-B, mais comuns nas meningites assépticas¹⁸, o CoxA-16 e o EV-71 são mais comuns nas doenças de mãos, pés e boca¹⁹ e o EV-D68 nas infecções respiratórias²⁰.

Segundo Oliveira e colaboradores, houve um caso fatal de infecção no SNC ligado ao Enterovírus A no Brasil, a paciente apresentou sinais de meningite, convulsão, mialgia e febre²¹.

1.3 Família *Herpesviridae*

Os Herpesvírus são vírus de DNA de fita dupla, capsídeo icosaedro contendo 162 capsômeros; uma estrutura proteica amorfa chamada tegumento e envelope glicolipoprotéico. São oito vírus desta família que acometem infecções no ser humano, mas vamos analisar apenas os seis tipos mais frequentes em doenças neurológicas. São eles:

Herpesvírus Simples tipo 1 (HSV-1), Herpesvírus simples tipo 2 (HSV-2), Varicela Zoster (VZV), Epstein-Barr (EBV), Citomegalovírus (CMV) e Herpesvírus tipo 6 (HHV-6)¹².

Eles são capazes de estabelecer infecção latente em tecidos específicos e possuem capacidade de reativação. A maioria dos HHVs são neurotrópicos²².

Baseada em propriedades biológicas, os Herpesvírus são divididos em três subfamílias: alfa, beta e gama. Os AlfaHerpesvírus (HSV-1, HSV-2 e VZV), tem um ciclo reprodutivo curto e estabelece latência em neurônios sensoriais. Beta e GamaHerpesvírus têm um alcance mais restrito de tipos celulares e um ciclo replicativo relativamente devagar em cultura celular. Por um lado, os BetaHerpesvírus (CMV, HHV-6) podem estabelecer latência em múltiplos tipos celulares e órgãos, os GamaHerpesvírus (EBV) estão restritos aos linfócitos T e B, que podem atingir o SN através da rota hematogênica através dos linfócitos²³.

1.3.1 Herpesvírus simplex tipo 1 e 2 (HSV-1 e HSV-2)

Foram os primeiros Herpesvírus a serem descritos. São AlfaHerpesvírus, as infecções pelo HSV-2 são as mais prevalentes em todo o mundo, ocorrem lesões na pele e principalmente nas genitais. Nas infecções por HSV-1 é raro a infecção genital, são os vírus mais comuns na encefalite²⁴.

Possuem a capacidade de estabelecer infecção latente por toda a vida do indivíduo infectado. Geralmente as lesões cutâneas podem preceder os casos de meningites dentro de 2 a 14 dias ou as manifestações podem ocorrer independentemente. Meningites por HSV-2 vêm associada com outros sintomas neurológicos como dor e fraqueza lombo sacrais, mielorradiculite, disestesia dentre outros²⁵.

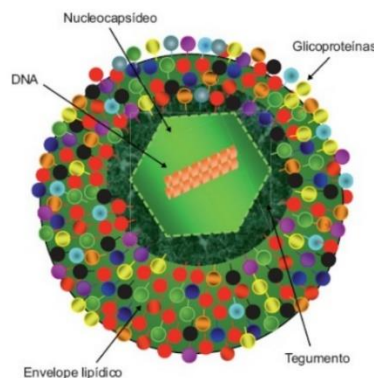


Figura 3: Estrutura do Herpesvírus Simples

Fonte: Norma Suely De Oliveira Santos, 2015²⁶

1.3.2 Varicela Zoster (VZV)

O VZV é um AlfaHerpesvírus que fica latente no nervo cranial e nos gânglios da raiz dorsal e pode reativar décadas depois. Pode causar problemas neurológicos como cerebelites, neuralgia, radiculopatias, meningites, mielites e encefalites²⁷.

A infecção por VZV ocorre em mais de 90% da população antes da adolescência e, aproximadamente, 20-30% irão desenvolver Herpesvírus zoster na vida adulta²⁸. Em crianças, as complicações mais sérias são as que envolvem o sistema nervoso central, que pode ser causado pela reativação do vírus da vacina contra a catapora. A complicação mais frequente é a meningite²⁹.

1.3.3 Vírus Epstein-Barr (EBV)

A transmissão do vírus EBV, um GamaHerpesvírus ocorre através do contato com secreções orofaríngeas, transplantes ou transfusões de sangue. A infecção primária acontece na infância e geralmente é assintomática e sem especificação clínica. É o vírus causador da mononucleose infecciosa, conhecida como a “doença do beijo”, que normalmente é uma doença que não há um protocolo de tratamento³⁰.

Encefalite e meningite são as complicações neurológicas mais comumente observadas em associação com a mononucleose infecciosa, a síndrome Guillain-Barré também está a ela relacionada. Estima-se que as complicações neurológicas ocorrem em 1-5% de indivíduos com mononucleose infecciosa³¹. Complicações neurológicas pelo EBV em crianças podem levar a meningites, encefalites, cerebelites, mielites transversas³².

Cerca de 25% das crianças com infecção pelo EBV testam positivo para anticorpos no SNC, mas são assintomaticas³³.

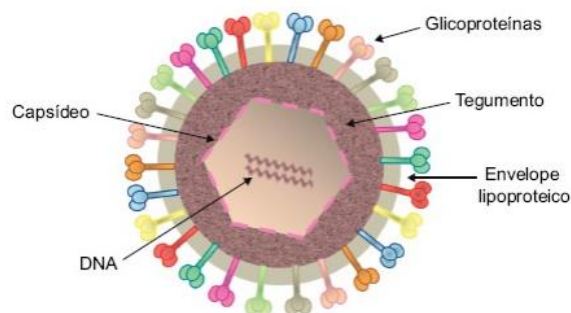


Figura 4: Estrutura do Epstein-Barr

Fonte: Virologia Humana, 2015¹²

1.3.4 Citomegalovírus (CMV)

O CMV é capaz de infectar a maioria das células humanas, invadir o sistema imune e permanecer latente, normalmente causa infecção primária inofensiva. A infecção pode ser assintomática, mas em imunocomprometidos e pacientes pediátricos pode causar doença clínica grave. A grande preocupação sobre esse vírus é a infecção congênita, que pode gerar grandes problemas neurológicos ao feto³⁴.

Essas complicações podem causar sequelas graves e de longo termo ao feto, como perda de audição, dificuldades na fala e no desenvolvimento da criança, cerca de 15 a 20% dos recém-nascidos com CMV congênito sofrem de sequelas a longo termo³⁵.

O CMV causa uma síndrome similar à mononucleose infecciosa e é responsável por várias manifestações clínicas quando presente no SN. As complicações neurológicas incluem encefalite, mielite e polirradiculopatia³⁶.

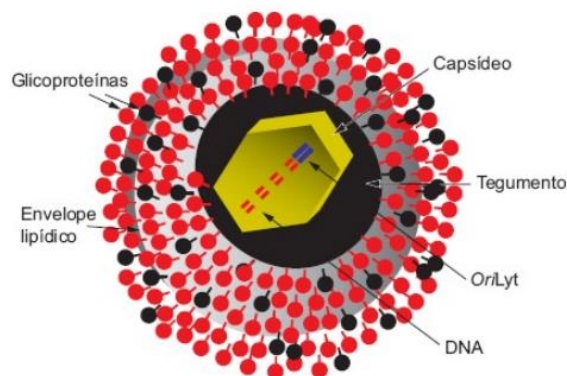


Figura 5: Estrutura do Citomegalovírus

Fonte: Virologia Humana, 2015¹²

1.3.5 Herpesvírus tipo 6 (HHV-6)

O Herpesvírus tipo 6 infecta seletivamente os linfócitos T - CD4+, possuem duas variantes, HHV-6A e HHV-6B, divididas por propriedades biológicas e imunológicas³⁷.

As complicações neurológicas da infecção primária são causadas principalmente pelo HHV-6B na infância, e incluem convulsões, hemiplegia, meningoencefalites e encefalopatia³⁸.

O SN é um alvo comum do HHV-6 e o DNA deste vírus é frequentemente detectado em tecido cerebral de indivíduos saudáveis, indicando que o vírus é capaz

de invadir e persistir de forma assintomática no SN e tem sido associado a complicações neurológicas principalmente em crianças³⁹.

Alguns estudos citam a capacidade do HHV-6 de se integrar no cromossomo, foram encontradas cargas virais altas, por muitos anos, no soro de alguns pacientes imunocompetentes levando a considerar essa integração cromossômica⁴⁰.

No estudo de Daibata, Masanori, e colaboradores, eles encontraram integração cromossômica do HHV-6 em uma paciente com linfoma de Burkitt, também foi encontrado em seu marido e filha no mesmo locus cromossomal⁴¹.

1.4 Diagnóstico Laboratorial

O diagnóstico laboratorial clássico das infecções neurológicas virais é feito através da análise do líquido cefalorraquidiano (LCR), como a citologia, a bacterioscopia e a cultura. Geralmente, na rotina diagnóstica não são realizados exames moleculares para o diagnóstico dos agentes virais específicos causadores de infecção e a maioria das infecções neurológicas são de etiologia viral.

Os métodos moleculares consistem na utilização da transcriptase reversa (RT) para a obtenção do cDNA a partir de RNA viral, a PCR convencional e a Nested - PCR, para a detecção do genoma dos Enterovírus e dos Herpesvírus nas amostras de LCR, e o posterior sequenciamento para a diferenciação dos sorotipos de Enterovírus. Apesar de não ser muito difundida no Brasil, mesmo em serviços privados, por ser um exame com custo elevado. Se avaliarmos o provável benefício em reduzir internações, provavelmente o custo com o exame seria benéfico.

A pesquisa dos EVNP no LCR mostrou-se eficaz em diferenciar a infecção viral, acarretando provável queda da taxa de internação hospitalar, uso de antibióticos desnecessários e custos⁴².

No estudo de Lafolie, Jeremy e colaboradores, (2018) eles concluem que o diagnóstico molecular do Enterovírus no sangue de neonatos, pode ser um guia de prática clínica para diminuição das internações e redução do tempo de exposição aos antibióticos⁴³.

Entretanto, poderiam ocorrer casos de meningite por Enterovírus que necessitem de hospitalização para controlar os sintomas, como vômitos e cefaleia,

porém diminuiria o uso de antibioticoterapia empírica, a qual deve durar no mínimo 48 horas para aguardar os resultados de culturas⁴⁴.

A utilização da técnica de PCR para os Herpesvírus tornou-se uma nova ferramenta de diagnóstico, comparado a outras técnicas convencionais. O diagnóstico precoce das infecções herpéticas é importante para começar tratamento adequado e excluir outras doenças que tenham uma clínica semelhante⁴⁵.

Com a utilização de técnicas moleculares como a Reação em Cadeia da Polimerase, tipo nested e PCR por transcriptase reversa (RT-PCR), podemos identificar através de iniciadores específicos (primers), a presença do genoma do agente viral como provável causador da doença neurológica, com maior especificidade e rapidez, para complementar os métodos tradicionais.

2 Objetivos

- **Principal:**

- Identificar, através de técnicas moleculares, a presença do genoma dos Enterovírus e Herpesvírus em amostras de líquido cefalorraquidiano (LCR) de crianças com manifestações neurológicas de provável etiologia viral.

- **Específicos:**

- Correlacionar os resultados obtidos com as manifestações clínicas e com os resultados bioquímicos e citológicos no LCR e outros exames complementares;
- Avaliar a eficácia da utilização dos exames moleculares de diagnóstico de infecção viral no SN das crianças com manifestações neurológicas estudadas.

3 Metodologia

Este estudo foi do tipo descritivo utilizando amostras de LCR de pacientes menores de 18 anos, de qualquer fenótipo e etnia, com suspeita clínica de infecção viral no sistema nervoso, captados a partir da demanda, dos ambulatórios, enfermarias e PS, provenientes de Campinas e das cidades da região. O período de coletas foi entre fevereiro de 2017 a julho de 2018. Durante este período também foram coletados os dados de identificação dos prontuários dos pacientes e a hipótese diagnóstica inicial.

Quando houve indicação de coleta de LCR, ele foi realizado pelo médico, conforme protocolo de coleta institucional e após, foi enviando ao Laboratório de Líquidos Biológicos, do Serviço de Patologia Clínica do Hospital de Clínicas da Unicamp. Uma alíquota deste material foi encaminhada ao Laboratório de Virologia da FCM e armazenada em freezer -80°C até o momento da utilização.

As amostras de LCR encaminhadas Laboratório de Líquidos Biológicos foram submetidas às análises bioquímicas e citológicas. Não foram utilizadas no estudo as amostras para cultura do LCR positiva para bactérias piogênicas, *Micobacterium tuberculosis* ou fungos e nem de LCR hemorrágico após centrifugação (contagem de hemácias > 500 mm³).

Os exames moleculares somente foram realizados após a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE). O trabalho foi aprovado no Comitê de Ética com o número do CAEE: 59361816.3.0000.5404, número do parecer: 3.010.312.

3.1 Critérios de Inclusão

Amostras de LCR de pacientes pediátricos com suspeita de infecção de etiologia viral no SN, descritas no prontuário dos pacientes, 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, “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.

3.2 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.

3.3 Extração de RNA/DNA

O RNA foi extraído das amostras de LCR utilizando o kit **QIAamp Viral RNA (QIAGEN, Valencia, CA, USA)**⁴⁶. O procedimento foi realizado de acordo com as orientações do fabricante, com um volume final de eluição de 80 µL.

O DNA da amostra foi extraído a partir de 200ul de líquido cefalorraquidiano, utilizando o kit **BIOPUR**⁴⁷, seguindo-se as instruções do fabricante. O volume final obtido foi de 100ul.

Para monitorar a presença de inibidores e confirmar a presença de material genético, primers do gene da Beta2-microglobulina (F: 5'-GGTGTCTTGAGGCTCAGGGAG-3'; R: 5'-CAACTTCAATGTCAATGTGCGATG GATG-3') foram incluídos em cada amostra teste como controle interno da reação.

3.4 Transcriptase Reversa seguida pela PCR para Enterovírus

A PCR constitui um método de alta sensibilidade para a detecção de ácidos nucleicos virais. No caso de vírus em que o RNA constitui o material genômico, é necessária uma etapa de transcrição reversa. A reação de PCR é baseada na amplificação do molde do cDNA, por ciclos repetidos que compreendem três etapas diferentes.

As reações de RT-PCR serão acompanhadas por um controle positivo e um controle negativo. Para isso, serão utilizados os mesmos reagentes e enzimas para as amostras e para os controles.

Amostras conhecidas (pertencente ao gênero Enterovírus) serão usadas como controles positivos das reações (o volume utilizado será igual ao da amostra: 1 µL) e água estéril será usada como controle negativo das reações.

Os controles servirão para verificar a eficiência da reação, dos reagentes e para verificar se houve contaminação durante a manipulação das amostras ou dos reagentes.

A manipulação das amostras e o preparo das misturas de enzimas e reagentes utilizados nas reações de RT-PCR foram feitos em ambientes distintos, a fim de evitar contaminação. O RNA viral foi transcrito para obter o cDNA utilizando o kit **Access Quick RT-PCR System (Promega, USA)**⁴⁸, conforme as orientações do fabricante.

Para a detecção do genoma dos Enterovírus, foi utilizada a técnica de RT-nested PCR, que permite a execução de duas fases de amplificação, sendo na primeira fase utilizando os primers HK2F, HK3R e na segunda fase os primers HK10R e HK2F. Estes primers flanqueiam a região terminal 5' NC (não codificante) do RNA, região conservada e comum ao genoma de todos os Enterovírus humanos conhecidos. O fragmento final será de **398pb**⁴⁹. Os primers utilizados na reação estão representados na **Tabela 1**.

3.5 Avaliação dos produtos de RT-PCR da Região 5'NC por eletroforese em gel de agarose.

Para visualização dos produtos da PCR, as amostras no volume de 50 µL, foram aplicadas em gel de agarose a 1 %, em tampão Tris-Acetato-EDTA (TAE) 1X, contendo solução de Unisafe Dye (a concentração de 2,0 µg/ mL), utilizando como marcador de peso molecular de escada de 100 pb (Invitrogen) como referência. A corrida da eletroforética foi realizada a 110 V em tampão Tris-Acetato-EDTA (TAE) 1X por 60 minutos. Os produtos amplificados foram visualizados em um transiluminador (luz UV).

Tabela 1 – Sequência dos primers utilizados nos protocolos das reações para Enterovírus.

Primers	Sequência (5' – 3')	Amplicon
HK2-F	CAA GCA CTT CTG TTT CCC CGC	
HK3-R	ATT GTC ACC ATA AGC AGC CA	437 pb
HK2-F	CAA GCA CTT CTG TTT CCC CGC	
HK10-R	ACG GAC ACC CAA AGT AGT CG	398 pb

Legenda: pb-pares de bases

3.6 Metodologias para identificação do genoma dos Herpesvírus Humano (HHV)

Na detecção do DNA dos HHVs, foi utilizada a técnica de RT- Nested PCR, baseada nos primers já descritos, com algumas modificações. O tamanho do produto das amplificações foram **129, 163, 208, 209, 167, 195 e 423** ^{50,51,52,53,54,55} pares de bases (**Tabela 2**).

Tabela 2. Primers usados na detecção dos Herpesvírus nas reações de RT-Nested-PCR

Vírus	Primers	Sequência	Pares de Bases (pb)
HSV-1 e HSV-2	T01	GGCCAGCAGATCCGCGTCTT	327 HSV-1
	T02	GCTGGGGTACAGGCTGGCAA	339 HSV-2
	Tia	CTGCCGGACACCCAGGGGCG	Comum para os dois
	Tib1	CCCGCCCTCCTCGCGTTTCGT	129
	Tib2	CGACCTCCTCGCGCTCGTCC	163
VZV	Externo	ACGGGTCTTGCCGGAGCTGGT	272
	Externo	AATGCCGTGACCACCAAGTATAAT	
	Interno	ACCTTAAAACTCACTACCAGT	208
	Interno	CTAATCCAAGGCGGGTG CAT	
EBV	Externo	AAGGAGGGTGGTTTGGAAAG	297
	Externo	AGACAATGGACTCCCTTAGC	
	Interno	ATCGTGGTCAAGGAGGTTCC	209
	Interno	ACTCAATGGTGTAAAGACGAC	
CMV	Externo	ATGGGAGTCCTCTGCCAAGAG	310
	Externo	CAATACACTTCATCTCCTCG	
	Interno	GTGACCAAGGCCACGACGTT	167
	Interno	TCTGCCAGCACATCTTTCTC	
HHV-6	Externo	CAAGCCCTAACTGTGTATGT	A-325
	Externo	TCTGCAATGTAATCAGTTTC	B-553
	Interno	CTGGGCGGCCCTAATAACTT	A-195
	Interno	ATCGCTTTCACTCTCATAAG	B-423

Legenda: pb: pares de bases

3.7 Variáveis e Análise estatística

As informações clínicas dos pacientes com amostra de LCR positivas e negativas para investigação viral foram descritas segundo informações em pedido de exames e de banco de dados informatizado (Excel), conforme citado anteriormente, mediante as variáveis de interesse demográficas (sexo, data de nascimento e data de coleta e a idade na coleta), hipótese diagnóstica inicial (HDI) e resultados de LCR citológicos e bioquímicos dos testes de rotina, com registro dos resultados de proteína, glicose, hemácias e leucócitos nas amostras de LCR. Essas informações foram descritas por meio de valores absolutos (n), prevalências e percentuais como também resultados estatísticos descritivos, por exemplo, mediana e média. Dados sobre sinais e sintomas, hospitalização, óbito, uso de medicamentos foram obtidos por meio da leitura dos prontuários dos pacientes com amostras positivas para genomas virais. O teste exato de Fisher e teste de Mann-Whitney foram usados nas tabelas 2x2 e um valor de $p \leq 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

4 Resultados

Brazilian Journal of Infectious Diseases
HERPESVIRUS AND ENTEROVIRUS IN CHILDREN WITH ACUTE NEUROLOGICAL
MANIFESTATIONS
 --Manuscript Draft--

Manuscript Number:	BJID-D-22-00396
Article Type:	Original Article
Keywords:	Enteroviruses; Central Nervous System; Polymerase Chain Reaction; Children
Corresponding Author:	Raissa Nery State University of Campinas campinas, sao paulo BRAZIL
First Author:	Raissa Nery
Order of Authors:	Raissa Nery Sandra Helena Alves Bonon Lucas Lopes Leon Lidia Cristian Oliveira Boffi Rodrigo Gonçalves de Lima Celia Regina Garlipp Sandra Cecilia Botelho Costa
Abstract:	Objectives To identify the prevalence of Herpesvirus (HHV) and Enterovirus (EV) genomes in cerebrospinal fluid (CSF) samples from children with suspected viral neurological infection, using molecular methods, to characterize the acute neurological manifestations caused by these virus, and biochemical and cytological analyzing of the CSF. Methods A cross-sectional study evaluated 169 children, between February 2017 and July 2018, aged to 1 day to 18 years old, with negative CSF microbiology tests, with neurological manifestations, and suspected viral infection of the nervous system (NS). Positive viral genome of analyzed cerebrospinal fluid (CSF) was confirmed by reverse transcriptase (RT-PCR) and Nested-PCR (nPCR). Results The prevalence of viral positivity in the patients studied was 11.8% (20/169). Out of these, 60% were identified as an EV genome (12/20). Positivity in the identification of HHV family occurred in 8/20 patients (40%), with 4/8 patients (50%) being positive for HHV-6, 2/8 (25%) for HHV-2 and 1/8 (12.5%) for varicella zoster (VZV). Confection occurred in 2/8 cases (25%). Meningitis was the most frequent neurological complication (30%). CSF-Pleocytosis was found in 55%. Conclusion EV genome was the most prevalent, followed by HHV-6 and HHV-2 in CSF samples. The presence of neurological manifestations and the molecular analysis of virus etiology are important in children with suspected viral infection in the NS that are not identified by CSF biochemical and cytological techniques, leading to less use of unnecessary antibiotics, and reducing hospitalization.
Suggested Reviewers:	Saulo Duarte Passos sauloduarte@uol.com.br Jose Luiz Proença Modena

Submetido
HERPESVÍRUS E ENTEROVÍRUS EM CRIANÇAS COM
MANIFESTAÇÕES NEUROLÓGICAS

HERPESVÍRUS AND ENTEROVÍRUS IN CHILDREN WITH ACUTE NEUROLOGICAL
MANIFESTATIONS

Raissa Nery Bindilatti¹ ID 0000-0002-5521-1978; Lídia Cristian Oliveira Boffi¹ ID 0000-0002-2107-5920; Lucas Lopes Leon¹ ID 0000-0002-5649-9766; Rodrigo Gonçalves de Lima¹ ID 0000-0002-9345-9931; Sandra Cecília Botelho Costa¹ ID 0000-0002-2328-8903; Célia Regina Garlipp² ID 0000-0001-8614-3421, Sandra Helena Alves Bonon¹ ID 0000-0002-0630-5062

¹Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Faculdade de Ciências Médicas, Laboratório de Virologia, Campinas, SP, Brasil.

²Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Faculdade de Ciências Médicas, Departamento de Patologia Clínica, Campinas, SP, Brasil.

Conflito de Interesse: Nada a declarar

Autor para correspondência: Sandra Helena Alves Bonon, PhD, 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

Fonte financiadora: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Fapesp) e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES)

Resumo

Introdução. Infecções causadas por vírus da família *Herpesviridae* (HHV) e Enterovírus (EV) em crianças podem ocasionar doenças neurológicas como encefalites e meningites e o diagnóstico através da pesquisa molecular do genoma viral do líquido cefalorraquidiano (LCR) é uma ótima ferramenta para identificação do agente etiológico.

Objetivos. Verificar a prevalência de genoma de Herpesvírus e Enterovírus em amostras de líquido cefalorraquidiano (LCR) de crianças com suspeita de infecção neurológica viral utilizando métodos moleculares e, comparar os resultados com as análises bioquímicas e citológicas do LCR.

Métodos. Foram investigadas 169 crianças com idade inferior a 18 anos, com suspeita de provável infecção de etiologia viral no sistema nervoso central (SNC). Amostras de LCR foram analisadas pelas técnicas de Nested-PCR para a detecção de genomas de HHVs e transcriptase reversa seguida pela Nested-PCR (RT-Nested-PCR) para a identificação do genoma dos EV.

Resultados. A prevalência para positividade viral nos pacientes estudados foi de 11,8% (20/169). Destes, 60% o genoma de Enterovírus (12/20) foi identificado. Positividade na identificação de vírus da família *Herpesviridae* ocorreu em 8/20 pacientes (40%), sendo que 4/8 (50%) foram positivos para o Herpesvírus tipo 6, 2/8 (25%) para o Herpesvírus simples tipo 2 e 1/8 (12,5%) para o vírus varicela zoster ou Herpesvírus tipo 3. Coinfecção entre Herpesvírus ocorreu em 2/8 casos (25%). Meningite foi a doença neurológica encontrada em maior frequência em 6/20 casos (30%). Pleocitose foi encontrada em 11/20 pacientes (55%).

Conclusão. O genoma do Enterovírus foi o mais prevalente seguido dos Herpesvírus 6 e Herpesvírus simples tipo 2. A presença de meningite, hipertensão intracraniana, febre, linfocitose e neutrófilos no LCR foram significativos em comparação com os pacientes negativos e a análise molecular de identificação de vírus foi considerada importante nas amostras de LCR das crianças com suspeitas de infecção no sistema nervoso central que não são identificadas pelas técnicas bioquímicas e citológicas convencionais do LCR.

Palavras-chave: Enterovírus; Herpesvírus; Sistema Nervoso Central; Reação em Cadeia da Polimerase; Crianças

Abstract

Introduction. Infections caused by viruses of the *Herpesviridae* family (HHV) and Enteroviruses (EV) in children can cause neurological diseases such as encephalitis and meningitis, and the diagnosis occurs through analysis of the cerebrospinal fluid (CSF) and molecular research of the viral genome to identify the etiological agent.

Objectives. To verify the prevalence of Herpesvirus and Enterovirus genomes in cerebrospinal fluid (CSF) samples from children with suspected viral neurological infection, using molecular methods and compare the results with CSF biochemical and cytological analyses.

Methods. In this study, 169 children under 18 years of age and suspected of a probable viral etiology in the central nervous system (CNS) were investigated. CSF samples were collected, and Nested-PCR techniques were used to detect HHVs) and Nested-PCR by reverse transcriptase (RT-PCR) to identify EVs.

Results. The prevalence of viral positivity in the patients studied was 11.8% (20/169). Of these, 60% was identified as an Enterovirus genome (12/20). Positivity in the identification of viruses of the *Herpesviridae* family occurred in 8/20 patients (40%), with 4/8 patients (50%) being positive for Herpesvirus type 6, 2/8 (25%) for Herpes simplex virus type 2 and 1/8 (12.5%) for Varicella zoster or Herpesvirus type 3. Coinfection between Herpesviruses occurred in 2/8 cases (25%), Meningitis was the most frequent neurological disease found in 6 cases (30%). Pleocytosis was found in 11 patients (55%).

Conclusion. The Enterovirus genome was the most prevalent, followed by Herpesvirus 6 and Herpes simplex type 2. The presence of meningitis, intracranial hypertension, fever, lymphocytosis and neutrophils in the CSF were significant compared to negative patients and the molecular analysis of virus is important in children with suspected viral infection in the central nervous system that are not identified by CSF biochemical and cytological techniques.

Keywords: Enterovirus; Herpesvirus; Central Nervous System; Polymerase Chain Reaction; Kids

Introdução

Infecções virais podem atingir o sistema nervoso central (SNC) e causar doenças, tais como meningites, encefalites, meningoencefalites, que podem causar sequelas¹.

As encefalites são caracterizadas por inflamação no parênquima cerebral, causando edema cerebral, levando a criança a apresentar mudanças no sistema nervoso, como rebaixamento do nível de consciência (RNC) e convulsões².

Apesar de atingir todas as idades, a encefalite tem maior incidência em crianças³. A etiologia das encefalites normalmente é viral⁴ a determinação dos agentes etiológicos varia de acordo com a localização geográfica, estação do ano, estado imunológico do paciente e mutações genéticas virais ao longo do tempo⁵.

Os vírus mais comuns causadores das encefalites são o Herpesvírus Simplex 1 e 2 (HSV-1, HSV-2), seguido pelo Enterovírus⁶.

A meningite asséptica (MA) é uma inflamação nas meninges, é caracterizada por sinais meníngeos, pleocitose linfocítica e cultura bacteriana negativa, e pode ser causada por diversos fatores como: fármacos, doenças reumatológicas, neoplasias, vírus etc⁷. O LCR em meningites virais pode apresentar-se com aspecto normal ou turvo, aumento discreto ou moderado na celularidade, principalmente linfócitos, glicose normal e proteínas com aumento discreto⁸.

As meningites virais são de notificação compulsória, tem distribuição universal, os casos se elevam no final do verão e começo do outono⁹, e tem maior frequência na região Sul e Sudeste¹⁰. A média anual de casos no período de 2003 a 2018 foi de 9.722 casos/ano¹¹.

Em estudo realizado por Santos e colaboradores, em 2021, do período de 2009 a 2019, foram registradas 204,5 mil notificações de casos de meningites no Brasil, feitas pelo SINAN (Sistema de Informação de Agravos de Notificação), do Ministério da Saúde (MS). A MA corresponde a 45,1% de todas as etiologias, seguida pela meningite não especificada (16,1%) e meningite bacteriana (15,6%)¹².

A MA é a mais comum em crianças, apesar de estar presente em todas as idades, e uma grande variedade de vírus podem ser a causa, destacam-se entre os vírus com RNA: Enterovírus, Arbovírus, vírus do sarampo, vírus da caxumba (*Paramyxovírus*), vírus da Coriomeningite Linfocitária (*Arenavirus*) e HIV-1; entre os DNA vírus que podem causar a meningite viral estão os Adenovírus e, sobretudo os vírus da família *Herpesviridae* (Herpes simples vírus tipo 1 e 2 (HSV-1 e

HSV-2), Varicela Zoster (VZV), Epstein-Barr (EBV), Citomegalovírus (CMV) e Herpesvírus humano tipo 6 (HHV6)⁹.

Os Enterovírus não-Pólio (EVs), da família *Picornaviridae*, são vírus de RNA de cadeia simples com polaridade positiva¹³ e compreendem mais de 100 sorotipos humanos, dentre eles o *Poliovirus*, *Coxsackivirus* A e B, *Echovirus* e *Enterovírus* 68-71¹⁴. São encontrados em todas as partes do mundo durante o ano inteiro, com maior frequência durante o verão e outono¹⁵.

Os Herpesvírus humanos (HHV) pertencem à família *Herpesviridae*, são vírus de DNA de fita dupla. Os vírus mais frequentes causadores de doenças neurológicas são os vírus HSV-1, HSV-2, VZV, EBV, CMV e HHV-6⁹.

Estes vírus são capazes de estabelecer infecções latentes em tecidos específicos e são divididos em três subfamílias: *AlfaHerpesvírus* (HSV-1,2 e VZV), *BetaHerpesvírus* (CMV, HHV-6 e HHV-7) e *GamaHerpesvírus* (EBV, HHV-8)¹⁶.

O líquido cefalorraquidiano (LCR) é um fluido biológico que está em íntima relação com o SNC e seus envoltórios (meninges), por isso, sua análise laboratorial é de grande importância para o diagnóstico e acompanhamento das doenças neurológicas¹⁷.

Em amostras de LCR coletadas de crianças com suspeita de doenças neurológicas, com a utilização de técnicas moleculares como a Reação em Cadeia da Polimerase, depois realizada a Reação em Cadeia da Polimerase tipo nested (RT-NESTED-PCR) e transcriptase reversa seguida pela PCR (RT-PCR), podemos identificar através de iniciadores específicos, a presença do genoma do agente viral, com maior especificidade e rapidez, para complementar os métodos tradicionais.

Diante do exposto, o objetivo principal do nosso trabalho foi o de verificar a prevalência de genoma de vírus da família *Herpesviridae* e de Enterovírus em amostras de LCR de crianças com suspeita de infecção neurológica viral e analisar os casos positivos pelas características dos pacientes, como sexo, faixa etária, hipótese diagnóstica inicial, resultados bioquímicos e citológicos do LCR e manifestações clínicas.

Pacientes e Métodos

Este foi um estudo transversal, descritivo, tipo série de casos, utilizando amostras de LCR de pacientes pediátricos com idade desde o dia do nascimento até

18 anos, que estavam sendo acompanhados no Hospital de Clínicas da UNICAMP e no Hospital da Mulher Prof. Dr. José Aristodemo Pinotti.

Esses pacientes tinham suspeita clínica de infecção neurológica de provável etiologia viral e foram captados a partir de demanda, dos ambulatórios, enfermarias e PS, no período de fevereiro de 2017 a julho de 2018. Durante este período, também foram coletados os dados de identificação dos pacientes, a hipótese diagnóstica inicial (HDI) e demais informações laboratoriais utilizando o sistema CICS/HC e no prontuário dos pacientes positivos foram analisadas as informações complementares sobre os sintomas, tempo de hospitalização e medicação utilizada.

Foi realizada punção lombar para obtenção do LCR para realização dos exames bioquímicos, citológicos e microbiológicos e, após a liberação dos laudos desses exames, alíquotas deste LCR foram enviadas ao Laboratório de Virologia para realização dos testes moleculares.

Os exames moleculares somente foram realizados após a assinatura dos Termos de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE). O trabalho foi aprovado no Comitê de Ética da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, com o número do CAEE: 59361816.3.0000.5404 (parecer: 3.010.312).

Critérios de Inclusão e exclusão

Neste estudo, as mostras de LCR foram selecionadas de pacientes pediátricos com suspeita de infecção neurológica de provável etiologia viral 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, *rash* cutâneo, exantemas, artralgia, mialgia, perda da força muscular, sintomas respiratórios ou gastrointestinais ou, somente aqueles que apresentaram os resultados das análises do LCR com aspecto incolor ou límpido ou xantocrômico após centrifugação e exame direto negativo para *Gram* e tinta da China foram incluídas no estudo.

Amostras de LCR recebidas no laboratório em quantidades insuficientes para a extração do material genético (DNA) e (RNA)(volume <400µL) e exclusão *a posteriori* de amostras com culturas do LCR positiva para bactérias piogênicas, *Micobacterium tuberculosis* ou fungos e amostras obtidas em repetição, ou de casos sem suspeita clínica de infecção (trauma ou lesão mecânica) também foram excluídas do estudo.

Métodos

O ácido nucleico viral (RNA) das amostras de LCR foi extraído utilizando o kit QIAamp Viral RNA (QIAGEN, Valencia, CA, USA)¹⁸. O procedimento foi realizado de acordo com as orientações do fabricante, com um volume final de eluição de 80 µL. O kit AccessQuick™ RT-PCR System (Promega USA)¹⁹ foi utilizado para a reação de transcrição reversa (RT) em amostras com RNA extraído para síntese de cDNA. Em seguida, uma reação em cadeia da polimerase (RT-PCR) foi realizada para identificar diferentes grupos de genomas dos Enterovírus²⁰.

O DNA das amostras foi extraído a partir de 200 µL de líquido cefalorraquidiano, utilizando o kit BIOPUR²¹, seguindo as instruções do fabricante e o volume final obtido foi de 100 µL. Na detecção do DNA dos HHVs foi utilizada a técnica de RT-Nested PCR, baseada em primers já descritos, com algumas modificações^{22 23 24 25 26 27}.

Variáveis e Análise estatística

As informações clínicas dos pacientes com amostra de LCR positivas e negativas para investigação viral foram descritas segundo informações em pedido de exames e de banco de dados informatizado, conforme citado anteriormente, mediante as variáveis de interesse demográficas (sexo, data de nascimento e data de coleta e a idade na coleta), hipótese diagnóstica inicial (HDI) e resultados de LCR citológicos e bioquímicos dos testes de rotina, com registro dos resultados de proteína, glicose, hemácias e leucócitos nas amostras de LCR. Essas informações foram descritas por meio de valores absolutos (n), prevalências e percentuais como também resultados estatísticos descritivos, por exemplo, mediana e média. Dados sobre sinais e sintomas, hospitalização, óbito, uso de medicamentos foram obtidos através da leitura dos prontuários dos pacientes com amostras positivas para genomas virais. O teste exato de Fisher e teste de Mann-Whitney foram usados nas tabelas 2x2 e um valor de $p \leq 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

Resultados

Características dos Pacientes

Foram incluídos no estudo 169 amostras de LCR de pacientes pediátricos com suspeita de infecção neurológica viral, sendo 96 pacientes do sexo masculino (56,8%) e 73 pacientes do sexo feminino (43,2%), apresentando idades que variaram desde o dia do nascimento (dia 1) até 18 anos de idade. A idade mediana foi de 3,3 anos e a idade média foi de 6,3 anos.

A **Tabela 1** apresenta as características e as hipóteses diagnósticas iniciais (HDI) dos pacientes que tiveram indicação para coleta de LCR e que tinham suspeita de infecção neurológica de etiologia viral.

As HDIs mais prevalentes foram: sepse/triagem infecciosa (24,3%), febre (10,6%), meningite (14,2%), hidrocefalia (13,6%) e convulsão (10%).

Tabela 1 - Características dos pacientes incluídos no estudo.

Característica	n (%)
Total de Amostras	169 (100)
Idade Mediana (anos) (variação)	3,3 (1dia-18a)
Idade Média (anos)	6,3
Sexo – F/M (%)	73/96 (43/57)
HDI, sinais e sintomas:	
Sepse/Triagem infecciosa	41 (24,3)
Febre	18 (10,6)
Meningite	24 (14,2)
Hidrocefalia	23 (13,6)
Convulsão	17 (10)
Epilepsia	7 (4)
Cefaleia	6 (3,5)
HIC	5 (3)
Encefalite	4 (2,4)
Esclerose Múltipla	3 (1,8)
RNC	2 (1,2)
Tetraparesia	2 (1,2)
Meningoencefalite	2 (1,2)
Involução do DNPM	2 (1,2)
Encefalomielite	1 (0,6)
Outros	12 (7)

Legenda: n=número, F: feminino; M:masculino; HDI: hipótese diagnóstica inicial; HIC: hipertensão intracraniana; DNPM: desenvolvimento neuropsicomotor; RNC: rebaixamento de nível de consciência; Outros: hiporresponsividade, neurite, multirradiculopatia,

esquizencefalia, paralisia facial, derivação, coma, ataxia, irritabilidade, Zika, Síndrome de Guillan-Barré.

Com resultados após as análises moleculares, verificamos a presença dos genomas de EV e HHVs em 20 amostras de LCR (11,8%) do total de amostras dos pacientes avaliados.

A **Tabela 2** mostra o número de pacientes positivos para EV e HHVs e a hipótese diagnóstica inicial (HDI).

Tabela 2. Resultados das análises moleculares realizadas nas amostras de LCR dos pacientes pediátricos estudados, hipóteses diagnósticas iniciais (HDIs) e resultado do teste exato de Fisher.

Características	n (%)	PCR+ (%)	PCR- (%)	Valor p*
Total de Amostras	169 (100)	20 (11,8)	149 (88,2)	SI
HDI, sinais e sintomas:				
Sepse/Triagem infecciosa	41 (24,3)	4 (9,7)	37 (90,3)	0,785
Febre	18 (10,6)	1 (5,5)	17 (94,5)	SI
Meningite	24 (14,2)	6 (25)	18 (75)	0,0426
Hidrocefalia	23 (13,6)	2 (8,7)	21 (91,3)	1,000
Cefaleia	6 (3,5)	1 (16,7)	5 (83,3)	0,5360
HIC	5 (3)	3 (60)	2 (40)	0,0123
Encefalite	4 (2,4)	1 (25)	3 (75)	0,3987
Meningoencefalite	2 (1,2)	1 (50)	1 (50)	0,2233
Encefalomielite	1 (0,6)	1 (100)	0	0,2221

Legenda: n=número, HDI: hipótese diagnóstica inicial; HIC: hipertensão intracraniana. *Teste Exato de Fisher; SI= sem informação.

Meningite foi a doença neurológica encontrada com maior frequência, em 6/24 pacientes (25%) sendo considerado estatisticamente significativa a diferença do número de pacientes positivos para infecção viral em relação aos pacientes negativos

($p=0,0426$), seguido de **HIC**, 3/5 ($p=0,0123$), apesar do número baixo de pacientes com este HDI.

Os outros pacientes com positividade viral não mostraram diferença estatisticamente significativa em relação aos pacientes negativos quando utilizado o teste de Fisher. Os pacientes que apresentaram HDI de convulsão, epilepsia, esclerose múltipla, RNC, tetraparesia, involução do DNPN e outros, não apresentaram positividade para os vírus analisados.

A **Figura 1** representa a porcentagem dos genomas virais identificados nas amostras de LCR dos 20 pacientes pediátricos positivos.

Na análise em relação ao gênero, observamos que a positividade para estes vírus ocorreu com maior frequência em indivíduos do sexo masculino (12 pacientes do sexo masculino e 8 do sexo feminino), porém, não houve diferença estatisticamente significativa entre os gêneros.

A circulação dos vírus identificados no sistema nervoso das crianças deste trabalho ocorreu na sua maioria no **outono**, nos meses de **abril a junho**.

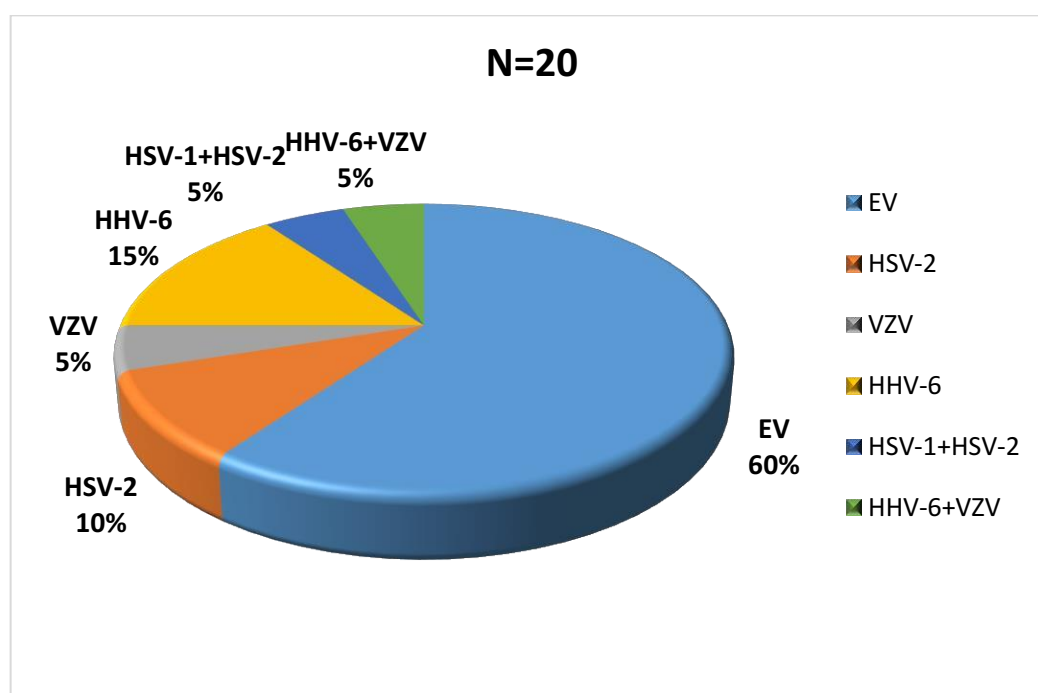


Figura 1- Porcentagem de amostras com identificação positiva para genomas virais nas amostras estudadas de crianças com suspeita de infecção neurológica de provável etiologia viral.

O genoma do **EV** foi o mais prevalente (7,1%), entre o total das amostras analisadas, utilizando a técnica da RT-Nested-PCR para a identificação da presença do RNA viral, sendo detectado em **12/20** pacientes positivos (60%). Destes, três pacientes tiveram meningite (25%), dois tiveram hipertensão intracraniana (HIC) (16,7%), três tiveram sepse (25%), cinco tiveram sintoma de febre (41,7%%), um teve suspeita de encefalomielite (8,3%), um paciente teve hidrocefalia (8,3%)_e o outro apresentou cefaleia (8,3%).

Após a análise das 169 amostras de LCR através da técnica da Nested-PCR para a detecção do DNA dos vírus HSV-1, HSV-2, VZV, EBV, CMV e HHV-6, oito amostras (4,7%) foram positivas para os HHVs estudados (**8/20**, 40%).

Os 2 pacientes positivos para a detecção do genoma de **HHV-2** apresentaram meningite, HIC e febre. O paciente positivo para **VZV** apresentou febre e meningoencefalite. Os 3 pacientes com **HHV-6** tiveram meningite, sepse, febre, hidrocefalia, cefaleia e encefalite.

Codetecção HHVs. O paciente com coinfecção entre os vírus **VZV e HHV-6** teve meningite e febre e o paciente com coinfecção entre **HHV-1 e HHV-2** apresentou sepse e febre.

Observamos que 7/8 (87,5%) pacientes com genoma de HHV positivo tiveram **febre**. Os genomas dos vírus EBV e CMV, pertencentes à família *Herpesviridae*, não foram identificados nas amostras analisadas.

A **Tabela 3** mostra as HDIs apresentadas pelos pacientes em relação ao genoma dos vírus identificados.

Tabela 3. Sinais e sintomas e síndrome neurológica apresentada pelos pacientes em relação aos genomas dos vírus identificados pela Nested-PCR.

PCR+/Sinais e Sintomas (n=20)	<i>Meningite</i>	<i>HIC</i>	<i>Sepse</i>	<i>Febre</i>	<i>Encefalomielite</i>	<i>Hidrocefalia</i>	<i>Cefaleia</i>	<i>Meningoencefalite</i>	<i>Encefalite</i>
EV (n=12)	3	2	3	5	1	1	1	0	0
HSV-2 (n=2)	x	x	0	x	0	0	0	0	0
VZV (n=1)	0	0	0	x	0	0	0	x	0
HHV-6 (n=3)	x	0	x	x	0	x	x	0	x
VZV+HHV-6 (n=1)	x	0	0	x	0	0	0	0	0
HSV-1+HSV-2 (n=1)	0	0	x	x	0	0	0	0	0

Legenda: EV: Enterovírus, HSV-1 e 2: Herpes Vírus Simples 1 e 2, VZV: Varicela Zoster, HHV-6: Herpesvírus 6; HIC: hipertensão intracraniana; 0=ausência do sinal e sintoma, x= presença do sinal e sintoma.

Análise da positividade para os vírus analisados nas amostras dos pacientes em relação à faixa etária.

- **Na faixa etária de 1 dia a 30 dias** (n=34), somente 1/20 paciente apresentou positividade para o EV (5%). Este paciente tinha 22 dias de vida, sexo feminino, proveniente de Jaguariúna, com febre, crise convulsiva, cianose, síndrome hipertônica apendicular, hipotonia axial, hemissíndrome crural esquerda; glicose 106 mg/dl.
- **de 31 dias a 10 meses** (n=29), 5 pacientes foram positivos, sendo 3 para EV e 2 para HHV;
- **de 1 a 5 anos** (n=34), 5 pacientes tiveram PCR positiva, sendo 3 para EV e 2 para HHV;
- **6 a 18 anos** (n=72), 9 pacientes foram positivos, sendo 5 para EV e 4 para HHV.

A **Figura 2** mostra a positividade em relação a faixa etária dos pacientes:

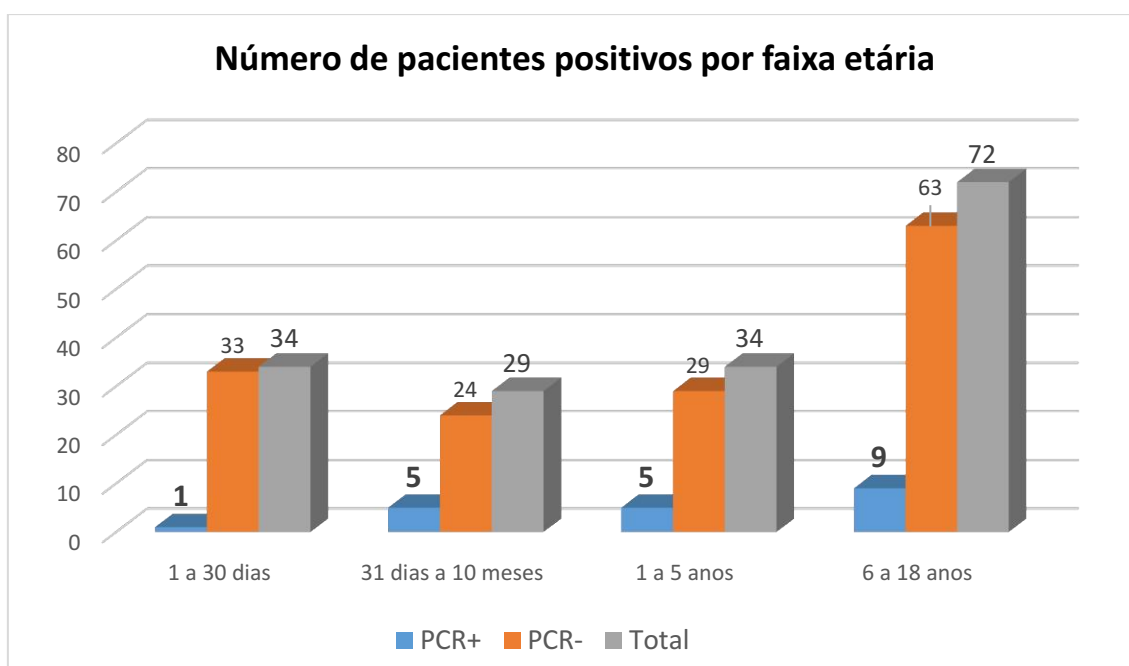


Figura 2 - Faixa Etária dos Pacientes com identificação viral positiva

Observamos que não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos de pacientes positivos por faixa etária em relação à positividade e que os pacientes de faixa etária entre 6 a 18 anos mostraram maior frequência de positividade.

Análise dos resultados bioquímicos e citológicos do LCR dos pacientes positivos para infecção viral

Outras análises realizadas durante o estudo foram obtidas dos resultados dos exames laboratoriais no LCR, tais como bioquímica e citologia. As culturas no LCR positivas para fungos e bactérias foram excluídas previamente, conforme mencionado anteriormente.

Em relação aos pacientes positivos para o EV, a ocorrência de pleocitose (leucócitos >3 células por mm^3) foi de 50% dos casos (6/12), sendo que dois pacientes tinham células mononucleares e dois pacientes tinham células polimorfonucleares.

Hipoproteínoorraquia ($>42\text{mg/dl}$) foi encontrada em 25% (3/12) dos pacientes positivos para EV e todos os pacientes positivos não tiveram elevação na quantidade de hemácias. Não observamos resultados estatisticamente significativos na comparação entre os grupos positivos e negativos.

Para os pacientes com resultados de PCR positiva no LCR para HHVs, a ocorrência de pleocitose foi de 5/8 (62,5%), sendo três pacientes com células mononucleares e dois pacientes com células polimorfonucleares.

Hiperproteínoorraquia esteve presente em apenas um paciente e quantidade de hemácias maiores que 100 células por mm³ no LCR esteve presente em dois pacientes.

A **Tabela 4** mostra as médias, desvio padrão e medianas dos valores bioquímicos e citológicos no LCR em relação aos resultados de PCR positivos e negativos. As variáveis leucócitos e linfocitose apresentaram valores de *p* significativos, ou seja, houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos com PCR+ e PCR-.

Tabela 4 – Resultados das análises bioquímicas e biológicas no LCR, valores de média, desvio padrão e mediana em comparação aos resultados positivos e negativos das amostras estudadas.

Análises do LCR	Total n=169	PCR+ n=20	PCR- n=149	Valor p
Glicose (mg/dl)	Média 62,34 (DP 21,94) Mediana 60	Média 57,11 (DP 11,03) Mediana 56	Média 64,43 (DP 21,89) Mediana 60	0,1440*
Proteína (mg/dl)	Média 62,10 (DP 76,34) Mediana 32	Média 75,77 (DP 138,40) Mediana 19	Média 62,10 (DP 76,34) Mediana 32	0,5039*
Leucócitos (mm³)	Média 72,92 (DP 589,04) Mediana 2	Média 9,88 (DP 42,27) Mediana 3	Média 69,48 (DP 69,48) Mediana 2	0,0083*
Hemácias (mm³)	Média 72,31 (DP 136,26) Mediana 11	Média 36,55 (DP 71,71) Mediana 2	Média 72,15 (DP 136,26) Mediana 11	0,2538*
Linfocitose	36	9	27	0,045**
Neutrófilos (+)	27	5	22	0,1729**

Legenda: valor de p=teste de Mann Whitney (*) valor de p = teste exato de Fisher (**).

LCR para diferentes causas de encefalite viral: • Pleocitose: 50 a 500 células/mm³ – Predomínio linfocitário • Glicorraquia normal • Proteína elevada; **LCR em diferentes causas de meningite viral:** Leucócitos (50-1000 céls/mm³), tipo celular predominante: mononuclear; Glicose (>45 mg/dL); Proteína (200mg/dL).

Dos 20 pacientes positivos, 14 (70%) ($p=0,1611$) foram internados, destes, 10 pacientes estavam com resultados de PCR positivos para EV e 4 pacientes estavam com resultados positivos para os HHVs, com sintomas variando entre dificuldade visual, cefaleia, tontura, aumento de perímetro cefálico (PC), vômito, febre, cefaleia, tosse e rigidez de nuca. Todos os pacientes internados permaneceram mais de dois dias hospitalizados.

Treze pacientes com identificação viral positiva fizeram uso de antibióticos durante a internação (65%).

O **Apêndice 1** mostra os achados clínicos e laboratoriais dos 20 pacientes com genomas positivos no LCR para Enterovírus e Herpesvírus Humanos estudados.

Apêndice 1. Achados clínicos e laboratoriais dos 20 pacientes com genomas positivos no LCR.

n	Idade/sexo	HDI	RBC/mm ³	WBC/mm ³ (%)	Prot.	Glic.	ATB	Hospitalização	Sintomas	PCR (+)
2	5/F	Meningite	3	38 (88% neutr)	32	58	Sim	Sim (6 dias)	Cefaleia, vômitos, rigidez de nuca	EV
8	15/M	Encefalom.	12	2	31	73	Não	Sim (6 dias)	Tontura, dificuldade de marcha, vômitos.	EV
15	17/M	Cefaleia	34	1	39	69	Não	Não	Esbranquecimento visual	EV
16	3/F	Sepse	1	4 (100% linf)	30	120	Sim	Sim (3 meses)	Lesões em face e região nasal, baixo peso	EV
17	0/M	Hidrocefalia	22	6(100% linf)	411	50	Sim	Sim (3 dias)	Aumento de PC	EV
18	0/M	Sepse	0	1	45	96	Sim	Sim (26 dias)	Desconforto respiratório e febre	EV
19	0/F	Sepse	0	0	45	106	Sim	Sim (1 mês)	Cianose, febre, crise convulsiva	EV
4	4/M	Meningite	11	400 (90% neutr)	32	61	Sim	Sim (8 dias)	Febre, vômitos, cefaleia	EV
9	10/F	Meningite	42	77	19	60	Sim	Sim (19 dias)	IVAS, náusea, vômitos, HIC	EV
10	16/F	HIC	24	1	27	62	Não	Não	Tontura, dificuldade visual, cefaleia	EV

12	0/M	Febre	6	6	38	64	Sim	Sim (11 dias)	Febre, vômitos, secreção em olho	EV
13	10/F	HIC	0	1	30	57	Não	Sim (16 dias)	Cefaleia, visão dupla, fotofobia, vertigem	EV
3	6/F	Meningoence.	139	384 (93% linf)	40	52	Não	Sim (16 dias)	Cefaleia, vômitos, dor e rigidez de nuca	VZV
5	0/M	Meningite	42	2	20	70	Sim	Não	Tosse, febre, rinorreia e diarreia	HHV-6
6	18/M	Meningite	10	2	20	60	Sim	Sim (2 dias)	Náusea, febre, cefaleia, vômitos	HSV-2
7	0/M	Encefalite	36	6 (93% linf)	28	54	Sim	Sim (3 meses)	Tosse, cansaço, dificuldade para mamar, palidez	HHV-6
11	18/F	HIC	1	1	31	51	Sim	Não	Cefaleia, papiledema	HSV-2
20	17/M	Hidrocefalia	2	13 (100% linf)	21	67	Não	Não	Cefaleia	HHV-6
1	3/M	Meningite	14	250 (60% neutr)	82	42	SI	Não	SI	VZV/HHV-6
14	3/M	Sepse	608	4 (56% neutr)	23	76	Sim	Sim (28 dias)	Febre, tosse, dispneia, pneumonia	HSV-1/HSV-2

Legenda: Meningoence=meningoencefalite; encefalom=encefalomielite. **SI**=sem informação.

Discussão

Existem poucas informações acerca da análise dos pacientes pediátricos que apresentam suspeita de infecção neurológica em relação aos vírus do gênero *Enterovírus*, (família *Picornaviridae*) e da família *Herpesviridae* em nossa região.

Os resultados obtidos neste estudo contribuíram para que haja um melhor entendimento sobre os casos de neuroinfecção viral causado pelos agentes virais estudados em pacientes pediátricos.

Neste estudo, analisamos o material genético extraído do LCR (DNA e RNA) de crianças com suspeita de infecção viral no sistema nervoso, utilizando as técnicas de detecção molecular denominadas Nested-PCR e a RT-Nested-PCR, duas técnicas para a identificação qualitativa dos genomas virais, dependendo do ácido nucleico viral.

Dentre os 169 pacientes incluídos no estudo, que deram entrada nos hospitais de referência da UNICAMP, no período de 16 meses, todos apresentaram suspeita de infecção neurológica de etiologia viral, pois aqueles que não apresentaram identificação positiva para cultura no LCR (presença de fungos e bactérias) foram excluídos do estudo. Observamos e constatamos que o genoma viral identificado com maior prevalência foi o do gênero *Enterovírus* não pólio, o que ocorreu em 12/169 casos (7,1%) e em 12/20 (60%) das amostras positivas.

Este resultado está de acordo com a literatura, onde estudos demonstraram que a prevalência deste vírus é maior em crianças e a causa mais provável de meningite viral, constituindo cerca de 85% dos casos em que foi possível identificar o agente etiológico²⁸. Outros estudos confirmam que o *Enterovírus* é o agente infeccioso mais encontrado no sistema nervoso^{29,30}.

O estudo de Oliveira e colaboradores em 2017 relatou que o *Enterovírus* foi o vírus mais frequente detectado em crianças de 6 a 9 anos, representando 70,4% das amostras positivas³¹.

Alguns autores afirmam a importância de estabelecer um diagnóstico para o monitoramento de pacientes e a importância de analisar o surgimento de novas cepas e epidemias causadas por *Enterovírus* e descreveram uma alta frequência de meningite causada por este vírus^{32,33,34}. Neste trabalho, mostramos que o *Enterovírus* é provavelmente um dos principais agentes etiológicos de meningite viral em Campinas e região, o que está de acordo com diferentes relatos para outras regiões.

Em nosso estudo, observamos a presença desse vírus em 25% dos casos de meningite/encefalite pediátricos estudados, seguido por sepse e HIC.

Enterovírus não pólio, nos pacientes do nosso estudo apresentaram HIDs, como: meningite, HIC, sepse, febre, encefalomielite, hidrocefalia e cefaleia. Os sintomas de doença leve podem incluir: febre, coriza, espirros, tosse, erupção cutânea, bolhas na boca, dores no corpo e nos músculos. E ainda podem causar conjuntivite viral, doenças das mãos, pés e boca, meningite, encefalite, miocardite, pericardite, paralisia flácida aguda e doença muscular inflamatória, lenta e progressiva³⁵.

A circulação destes vírus ocorreu principalmente no outono, de acordo com as datas das internações dos pacientes com sintomas agudos, semelhante à descrita para o hemisfério norte. Em climas temperados, os EVs aparecem acentuadamente durante a sazonalidade verão/outono, no entanto, uma alta incidência durante todo o ano ocorre em áreas tropicais e subtropicais. Em estudo realizado em 2001 a 2004 em pacientes pediátricos com meningites bacterianas e assépticas em Tubarão/SC, mostrou que a estação do ano que mais agrupou casos de meningite foi o inverno, e o mês de junho ficou com o maior número de casos ($p=0,05$)³⁶.

No estudo de Santos e colaboradores, realizado em 2006, foram descritos 5 surtos causados por Enterovírus no estado do Paraná, o surto em que foi observado maior frequência dos vírus foi durante o período de dezembro a Janeiro³⁷.

No estudo de Rittichier e colaboradores, foram admitidos 40-50% de pacientes positivos com infecção pelo Enterovirus durante os meses do verão e outono³⁸.

Acredita-se que a disseminação fecal-oral desses agentes seja facilitada, principalmente em crianças, durante períodos de clima quente. Além da transmissão direta de pessoa para pessoa, os EV podem ser recuperados de moscas domésticas, águas residuais e esgotos³⁹.

A encefalite viral pode ser produzida por vários vírus, as infecções podem ser esporádicas, epidêmicas ou transmitidas por animais. Muitas dessas infecções esporádicas causam uma doença leve, com dor de cabeça e sonolência, que é autolimitada, mas em casos mais graves os pacientes apresentam comportamento alterado, convulsões, confusão ou coma. O inchaço cerebral é comum, com o risco

associado de danos cerebrais e pode ocorrer mesmo em pacientes imunocompetentes³¹.

No estudo de Bastos e colaboradores (2014), os sintomas mais citados foram meningite, meningoencefalite e encefalite³⁴, e esses sintomas estavam presentes em 45% dos casos com identificação viral positiva apresentado neste trabalho.

Em nosso estudo, meningite apresentou resultados estatisticamente significativos em comparação aos resultados de PCR positivos em relação aos negativos ($p=0,0426$).

Os pacientes com HIC elevado na ausência de outras causas infecciosas conhecidas são, às vezes, caracterizados como tendo uma síndrome viral inespecífica^{40,41,42}.

Observamos nos nossos pacientes que na maioria dos casos de HDI de HIC foram identificados genomas virais (60%) e foi estatisticamente significativo em relação aos pacientes com HIC com resultados negativos ($p=0,0123$), sendo dois pacientes com identificação positiva para genoma de EV e outro HSV-2. Uma definição de hipertensão intracraniana (HIC), também conhecida como pseudotumor cerebral, foi revisada e atualizada várias vezes, e a apresentação clínica atípica de todas as definições especificaram que, para fazer um diagnóstico de HIC, deve haver um perfil normal de LCR. Portanto, os pacientes com análise do LCR sugestiva de processo infeccioso não podem receber um diagnóstico de HIC idiopática; é mais provável que esses pacientes tenham meningite asséptica ou viral^{41,42,43}.

O HHV-6 foi o segundo vírus detectado com maior frequência nos pacientes com Nested-PCR positivo neste estudo (15%). Na literatura, como vemos no artigo de Silva e colaboradores, o segundo vírus mais frequente nos pacientes com meningites e encefalites são os Herpesvírus 1 e 2⁴⁴. O papel do HHV-6 como agente causador de doença neurológica em crianças imunocompetentes merece mais pesquisas.

Não há na literatura estudos associando coinfecção entre Herpesvírus 6 e VZV. Neste estudo, a dupla identificação destes genomas virais na mesma amostra causou ao paciente a HDI de meningite, porém, não foram anotadas informações no prontuário em relação aos sinais e sintomas.

O exame de citologia do LCR auxilia na diferenciação da meningite bacteriana e viral⁷ e em nosso estudo, a pleocitose esteve presente em 55% dos

pacientes positivos, e a maior quantidade foi de linfócitos, que está de acordo com a literatura encontrada e com as referências de diagnósticos de meningite asséptica^{45,46}. No estudo de Lamarão e colaboradores, a presença de amostras linfomononucleares foram a maior quantidade (81,8%) em relação às células polimorfonucleares (18,2%)¹⁴.

A prescrição de antibióticos foi feita em 13/20 (65%) dos pacientes positivos para um dos vírus estudados, 14/20 (70%) dos pacientes foram internados e permaneceram no hospital por 2 dias ou mais. O diagnóstico molecular nos fornece a detecção correta do agente etiológico e pode reduzir a utilização de antibióticos e o período de hospitalização. A análise de PCR deve incluir critérios rigorosos para garantir um diagnóstico preciso⁴⁷.

A taxa de detecção de uma possível etiologia viral no LCR em nossa coorte de crianças com menos de 18 anos foi baixa, provavelmente porque era uma coorte não selecionada, mas, por outro lado, esse recurso diagnóstico também é valioso para o estudo, que descreve a abordagem diagnóstica na prática clínica.

A utilização de técnicas moleculares neste estudo confirmou a validade do método de Nested-PCR e RT-Nested-PCR para a detecção rápida de Enterovírus e Herpesvírus no LCR em pacientes com suspeita de infecção neurológica viral. Uma análise mais aprofundada de outros agentes e a padronização de metodologias moleculares, como a PCR em tempo real são propostas futuras para melhorar o diagnóstico laboratorial das doenças neurológicas virais no Brasil.

Conclusão

- Verificou-se a prevalência de genoma de Herpesvírus (HHV) e Enterovírus (EV) em amostras de líquido cefalorraquidiano (LCR) de crianças com suspeita de infecção neurológica viral e o genoma mais prevalente foi o do Enterovírus, em 12/169 (7,1%), seguido dos HHVs em 8/169 (4,7%).
- Analisou-se a distribuição dos casos positivos pelas características dos pacientes como sexo, faixa etária, hipótese diagnóstica, resultados bioquímicos e citológicos do LCR e manifestações clínicas dos pacientes, e a presença de meningite, hipertensão intracraniana (HIC), febre, linfocitose e presença de neutrófilos no LCR foram significativos, mostrando que a análise molecular de vírus é importante nas crianças com suspeita de infecção viral no sistema nervoso.

Referências bibliográficas

1. Studahl M, Lindquist L, Eriksson BM, Gunther G, Bengner M, Franzen-Rohl E, *et al.* Acute viral infections of the central nervous system in immunocompetent adults: Diagnosis and Management. *Drugs*. 2013;73(2):131-58.
2. Costa BKD, Sato DK. Viral encephalitis: a practical review on diagnostic approach and treatment. *J. Pediatr (Rio J)*. 2019.
3. Kramer A. Viral encephalitis in the ICU. *Critical care clinics*. 2013; 29:621-49.
4. Glaser CA, Honarmand S, Anderson LJ, Schnurr DP, Forghani B, Cossen CK, *et al.* Beyond viruses: clinical profiles and etiologies associated with encephalitis. *Clin Infect Dis*. 2006; 43:1565-77.
5. Costa, Bruna Klein da, & Sato, Douglas Kazutoshi. (2020). Encefalite viral: uma revisão prática sobre abordagem diagnóstica e tratamento. *Jornal de Pediatria*, 96(Suppl.1), 12-19. Epub April 17, 2020.<https://doi.org/10.1016/j.jped.2019.07.006>.
6. Dalmau J, Graus F. Antibody-Mediated Encephalitis. *N Engl J Med*. 2018;378(9):840-51.
7. Daniel D, Mayara CF, Durval D. Meningite asséptica. *Rev Bras Clin Med*. 2012;10(1):46-50.
8. Ministério da Saúde. Guia de Vigilância Epidemiológica. Brasília: Ministério da Saúde, 2005; Goldman L. Ausiello D. Cecil: Tratado de Medicina Interna. 22. ed. São Paulo: Elsevier Brasil, 2005.
9. Doenças Infecciosas e Parasitárias: Guia de Bolso, 8ª edição, pág. 321 - Ministério da Saúde Brasília/DF - 2010. Meningites Virais CID10: A87. Available from: http://bvsmis.saude.gov.br/bvs/publicacoes/doencas_infecciosas_parasitaria_guiaboiso.pdf.

- 10.** Dos Santos GPL. Meningites e meningoencefalites assépticas: estudos de detecção e variabilidade genética de agentes etiológicos virais. Instituto Nacional De Controle De Qualidade Em Saúde Fundação Oswaldo Cruz. 2012.
- 11.** Sinan/Ddtr/Cve/Ccd/Ses-Sp. Casos, Coeficiente De Incidência (por 100.000 hab), Óbitos E Letalidades De Meningites Segundo Etiologias, Estado De São Paulo, 2014 a 2019. 2020. Avalible in: <https://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2019/setembro/25/boletim-especial-21ago19-web.pdf>
- 12.** Alisson S. Rodrigues Santos, Prevalência de Casos de Meningite No Brasil Durante Os Anos de 2009 a 2019, The Brazilian Journal of Infectious Diseases, Volume 25, Supplement 1, 2021.
- 13.** Santos NSdO, Romanos MTV, Wigg MD. Virologia humana. 3 ed. Rio de Janeiro, RJ: Guanabara Koogan; 2015.
- 14.** Lamarão LM, Gomes MdLC, Ferreira LLA, Fonseca CM, Araújo LCB, Santana MB, et al. Pesquisa de Enterovírus em casos de síndrome de meningite asséptica de Belém, PA. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. 2005;38(5):391-5.
- 15.** Tavares TdM, Cardoso DdDdP, de Brito WMED. Vírus Entéricos Veiculados Por Água: Aspectos Microbiológicos e de controle De Qualidade Da Água. Revista de Patologia Tropical / Journal of Tropical Pathology. 2007;34(2).
- 16.** Ludlow M, Kortekaas J, Herden C, Hoffmann B, Tappe D, Trebst C, et al. Neurotropic virus infections as the cause of immediate and delayed neuropathology. Acta Neuropathol. 2016;131(2):159-84.
- 17.** Canuto, R.; Puccioni-Sohler, M. In: Puccioni-Sohler, M. Fundamentos do exame do líquido cefalorraquidiano. Diagnóstico laboratorial das infecções do sistema nervoso central. Biblioteca Nacional, v. 11, p. 15-010615-V04, 2007.

- 18.** Qiagen. QIAamp Viral RNA Mini Handbook 2020.
- 19.** Corporation P. Sistema AccessQuick [™] RT-PCR 2800 Woods Hollow Road Madison, WI 53711-5399 EUA 2018.
- 20.** Gomes MdLC, Kopecka H, Ferreira Jr AG, Ferreira SMAG, Maneschy LAR, Linhares AC. Detection of Enteroviral sequence in endomyocardial tissues from patients with cardiac diseases in Northern Brazil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 1998;31:487-90.
- 21.** Life M. Kit Biopur Extração Mini Spin Vírus DNA / RNA 2017.
- 22.** Sun Y, Chan RK, Tan SH, Ng PP. Detection, and genotyping of human Herpes Simplex viruses in cutaneous lesions of erythema multiforme by nested PCR. *J Med Virol*. 2003;71(3):423-8.
- 23.** Rodrigues D, de-Paris F, Paiva RM. Minimum detection limit of na in-housenested-PCR assay for Herpes Simplex vírus and Varicella Zoster virus. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 2013;46:625-8.
- 24.** Ehrnst A, Barkholt L, Lewensohn-Fuchs I, Ljungman P, Teodosiu O, Staland A, et al. CMV PCR monitoring in leucocytes of transplant patients. *Clin Diagn Virol*. 1995;3(2):139-53.
- 25.** Cinque P, Brytting M, Vago L, Castagna A, Parravicini C, Zanchetta N, et al. Epstein-Barr virus DNA in cerebrospinal fluid from patients with AIDS-related primary lymphoma of the central nervous system. *Lancet*. 1993;342(8868):398-401.
- 26.** Wang FZ, Dahl H, Linde A, Brytting M, Ehrnst A, Ljungman P. Lymphotropic Herpesvíruses in allogeneic bone marrow transplantation. *Blood*. 1996;88(9):3615-20.

- 27.** Yalcin S, Karpuzoglu T, Suleymanlar G, Mutlu G, Mukai T, Yamamoto T, et al. Human Herpesvírus 6 and Human Herpesvírus 7 infections in renal transplant recipients and healthy adults in Turkey. *Arch Virol.* 1994;136(1-2):183-90.
- 28.** Beal JC. Increased Intracranial Pressure in the Setting of Enterovírus and Other Viral Meningitides. *Neurology Research International.* 2017;2017:2854043.
- 29.** Michael-Titus, A.; Revest, P.; Shortland, P. *The Nervous System 2nd Edition Systems of the Body Series.* 2 ed. 2010.
- 30.** Mendoza LP, BronzoniRVdM, Takayanagui OM, Aquino VH, Moraes Figueiredo LT. Viral infections of the Central Nervous system in Brazil. *Journal of Infection.* 2007;54(6):589-96.
- 31.** de Oliveira DB, Candiani TM, Franco-Luiz APM, Almeida GMF, Abrahão JS, Rios M, et al. Etiological agents of viral meningitis in children from a dengue-endemic area, South east région of Brazil. *J Neurol Sci.* 2017; 375:390-4.
- 32.** Vidal LRR, Almeida SMd, Messias-ReasonIJd, Nogueira MB, DeburMdC, Pessa LFC, et al. Enterovírus and Herpes viridae family as etiologic agentes of lymphomonocytary meningitis, Southern Brazil. *Arquivos de Neuro-Psiquiatria.* 2011; 69:475-81.
- 33.** Casaroto E, Marra AR, Coelho FM, Pinho JR, Sitnik R, Colombari F, et al. Improving the diagnosis of meningitis due to Enterovírus and Herpes Simplex Virus I and II in a tertiary care hospital. *BMC Infect Dis.* 2013;13:487.
- 34.** Bastos MS, Lessa N, Naveca FG, Monte RL, Braga WS, Figueiredo LT, et al. Detection of Herpesvírus, Enterovírus, 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.

- 35.** CDC. Non-Polio Enterovírus, Symptoms, 2020 [Available from: <https://www.cdc.gov/non-polio-Enterovirus/about/symptoms.html>]
- 36.** Carvalho DB, Cancelier ACL. Comparação entre achados clínicos e laboratoriais nas meningites assépticas e bacterianas em crianças internadas em Tubarão no período de 2001 a 2004: implicações diagnósticas e prognósticas. *Arquivos Catarinenses de Medicina*. 2007; 36:6.
- 37.** Dos Santos GP, Skraba I, Oliveira D, Lima AA, de Melo MM, Kmetzsch CI, et al. Enterovírus Meningitis in Brazil, 1998-2003. *J Med Virol*. 2006;78(1):98-104.
- 38.** Rittichier KR, Bryan PA, Bassett KE, Taggart EW, Enriquez FR, Hillyard DR, et al. Diagnosis and Outcomes of Enterovirus Infections in Young Infants. *The Pediatric Infectious Disease Journal*. 2005;24(6).
- 39.** Klowden M, Greenberg B. House fly and *Drosophila* cell cultures as hosts for Human Enteroviruses. *J Med Entomol*. 1974 Aug;11(4):428-32.
- 40.** Ravid S, Shachor-Meyouhas Y, Shahar E, Kra-Oz Z, Kassis I. Viral-Induced Intracranial Hypertension Mimicking Pseudotumor Cerebri. *Pediatric Neurology*. 2013;49(3):191-4.
- 41.** Dandy WE. Intracranial Pressure Without Brain Tumor: Diagnosis And Treatment. *Annals of Surgery*. 1937;106(4):492-513.
- 42.** Ball AK, Clarke CE. Idiopathic intracranial hypertension. *Lancet Neurol*. 2006;5(5):433-42.
- 43.** Friedman DI, Liu GT, Digre KB. Revised Diagnostic Criteria for The Pseudotumor Cerebri Syndrome In Adults And Children. *Neurology*. 2013;81(13):1159-65.
- 44.** Silva MTT. Viral Encephalitis. *Arquivos de Neuro-Psiquiatria*. 2013; 71:703-9.

- 45.** ALVES, F. G. et al. Laboratory Parameters of Cerebrospinal Fluid in Individuals With Enterovirus Meningitis. *Journal of Human Growth and Development*, v. 25, p. 237-242, 2015.
- 46.** Sadeghi F, Talebi-Nesami M, Barari-Savadkouhi R, Bijani A, Ferdosi-Shahandashti E, Yahyapour Y. Human Enteroviruses in cerebrospinal fluid of children with suspected aseptic meningitis: A study in northern Iran. *Caspian J Intern Med*. 2017;8(2):112-5.
- 47.** Pires, F. R. et al. Comparison of Enterovirus Detection in Cerebrospinal Fluid With Bacterial Meningitis Score in Children. *Einstein (São Paulo)*, v. 15, p. 167-172, 2017.

5 Conclusão

- Identificou-se através de técnicas moleculares a presença do genoma dos Enterovírus e Herpesvírus em 20 amostras de LCR de crianças com manifestações neurológicas de provável etiologia viral;
- Correlacionaram-se os resultados obtidos com os testes moleculares, com as manifestações clínicas e com os resultados bioquímicos e citológicos do LCR;
- O diagnóstico assertivo das infecções neurológicas no LCR pela técnica de biologia molecular é de grande importância, pode e deve ser incorporada na rotina laboratorial, evitando assim o uso do antibiótico antecipadamente e desnecessariamente e também as internações desnecessárias por longos períodos;
- Uma análise mais aprofundada de outros agentes e a padronização de metodologias moleculares de biologia, como a PCR em tempo real, são propostas futuras para melhorar o diagnóstico laboratorial de meningite viral no Brasil.

6 Referências

- 1- Alves, F. G. et al. Laboratory Parameters of Cerebrospinal Fluid in Individuals With Enterovirus Meningitis. *Journal of Human Growth and Development*, v. 25, p. 237-242, 2015.

- 2- Lamarão, L. M. et al. Pesquisa de Enterovírus em Casos de Síndrome de Meningite Asséptica de Belém, PA. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 38, n. 5, p. 391-395, 2005-10 2005.

- 3- Doenças Infecciosas e Parasitárias: Guia de Bolso VI, 3ª edição, pág. 69 - Ministério da Saúde Brasília/DF - junho 2004. Meningites Virais CID10: A87 Doenças Infecciosas e Parasitárias Secretaria da Saúde 2004 [Available from: www.saude.pr.gov.br/modules/conteudo/conteudo.php?conteudo=522].

- 4- Dos Santos GPL. Meningites e meningoencefalites assépticas: estudos de detecção e variabilidade genética de agentes etiológicos virais. Instituto Nacional De Controle De Qualidade Em Saúde Fundação Oswaldo Cruz. 2012.

- 5- SINAN/DDTR/CVE/CCD/SES-SP. Casos, Coeficiente De Incidência (por 100.000 hab), Óbitos E Letalidades De Meningites Segundo Etiologias, Estado De São Paulo, 2014 a 2019. 2020.
[Available from: [http://saude.sp.gov.br/resources/cve-centro-de-vigilancia-epidemiologica/areas-de-vigilancia/doencas-de-transmissao-respiratória/meningites/dados/meningites.pdf](http://saude.sp.gov.br/resources/cve-centro-de-vigilancia-epidemiologica/areas-de-vigilancia/doencas-de-transmissao-respiratoria/meningites/dados/meningites.pdf)].

- 6- Daniel D, Mayara CF, Durval D. Meningite Asséptica. *Rev Bras Clin Med*. 2012;10(1):46-50.

- 7- Rasti, M. Et Al. Three Cases of Mumps Virus and Enterovirus Coinfection in Children With Enteroviral Meningitis. *Medicine (Baltimore)*, v. 95, n. 49, p. e5610, Dec 2016.

- 8-** Filho Amrdc, Moreira Ass. Meningites E Encefalites De Etiologia Viral. Revista Da Faculdade De Medicina De Teresópolis. 2019;3:11.

- 9-** Silva, Marcus Tullius T, Viral Encephalitis. 2013, v. 71, n. Available from: <<https://doi.org/10.1590/0004-282X20130155>>. ISSN 1678-4227. <https://doi.org/10.1590/0004-282X20130155>.

- 10-** Thompson C, Kneen R, Riordan A, Kelly D, Pollard AJ. Encephalitis in Children. Arch Dis Child. 2012;97(2):150-6.

- 11-** Errante PR, Leite AA, Honório SR, Torres GR. Análise do Líquido Cefalorraquidiano. Revisão de literatura. 2016. 2016;4(3):24.

- 12-** Santos, N. S. D. O.; Romanos, M. T. V.; WIGG, M. D. Virologia Humana. 3. ed. Rio de Janeiro, RJ: Guanabara Koogan, 2015.

- 13-** Dreamstime, Estrutura dos enterovírus. Disponível em: <www.dreamstime.com/stock-illustration-structure-enterovirus-infographics-vector-illustration-isolated-background-image98127377>.

- 14-** Agol, V. I. Cytopathic Effects: Virus-Modulated Manifestations of Innate Immunity? Trends Microbiol, v. 20, n. 12, p. 570-6, Dec 2012.

- 15-** Irani DN. Aseptic Meningitis and Viral Myelitis. Neurologic clinics. 2008;26(3):635-viii.

- 16-** Oberste, M. S. et al. Species-Specific RT-PCR Amplification of Human Enteroviruses: a Tool For Rapid Species Identification of Uncharacterized Enteroviruses. J Gen Virol, v. 87, n. Pt 1, p. 119-28, Jan 2006.

- 17-** Muehlenbachs, A.; Bhatnagar, J.; Zaki, S. R. Tissue Tropism, Pathology and Pathogenesis of Enterovirus Infection. J Pathol, v. 235, n. 2, p. 217-28, Jan 2015.

- 18-** Gomes MdLC, Ferreira LLA, Gomes RH, Lamarão LM, Silveira Ed, Rodrigues LdS, et al. RT-PCR for Confirmation of Echovirus 30 Isolated in Belém, Brazil. *Brazilian Journal of Infectious Diseases*. 2007;11:403-6.
- 19-** Russo DH, Luchs A, Machado BC, Carmona Rde C, Timenetsky Mdo C. Echovirus 4 Associated to Hand, Foot And Mouth Disease. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2006;48(4):197-9.
- 20-** B'KRONG, N. et al. Enterovírus Serotypes in Patients With Central Nervous System and Respiratory Infections in Viet Nam 1997-2010. *Virol J*, v. 15, n. 1, p. 69, Apr 12 2018.
- 21-** Oliveira, D. B. et al. First Fatal Case of CNS Infection Caused by Enterovirus a in Brazil. *New Microbes New Infect*, v. 7, p. 94-6, Sep 2015.
- 22-** Meyding-Lamade U, Strank C. Herpesvirus Infections of The Central Nervous System in Immunocompromised Patients. *Ther Adv Neurol Disord*. 2012;5(5):279-96.
- 23-** Ludlow, M. et al. Neurotropic Virus Infections as the Cause of Immediate and Delayed Neuropathology. *Acta Neuropathol*, v. 131, n. 2, p. 159-184, Feb 2016.
- 24-** Caldeira, T. D. et al. Prevalence of Herpes Simplex Virus Type 2 and Risk Factors Associated With This Infection In Women in Southern Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*, v. 55, n. 5, p. 315-21, Sep-Oct 2013.
- 25-** Studahl, M. et al. Acute Viral Infections of The Central Nervous System in Immunocompetent Adults: Diagnosis and Management. *Drugs*, v. 73, n. 2, p. 131-58, Feb 2013.
- 26-** Norma Suely De Oliveira Santos, M. T. V. R., Marcia Dultra Wigg. *Virologia Humana*. 2015.

- 27-** Gregoire, S. M. et al. Polymerase Chain Reaction Analysis and Oligoclonal Antibody in the Cerebrospinal Fluid From 34 Patients With Varicella-Zoster Virus Infection of The Nervous System. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, v. 77, n. 8, p. 938-42, Aug 2006.
- 28-** Yawn, B. P. et al. A Population-Based Study of The Incidence and Complication Rates of Herpes Zoster Before Zoster Vaccine Introduction. *Mayo Clin Proc*, v. 82, n. 11, p. 1341-9, Nov 2007.
- 29-** Heusel EH, Grose C. Twelve Children with Varicella Vaccine Meningitis: Neuropathogenesis of Reactivated Live Attenuated Varicella Vaccine Virus. *Viruses*. 2020;12(10).
- 30-** Gequelin, L. C. F. et al. Epstein-Barr Virus: General Factors, Virus-Related Diseases And Measurement of Viral Load After Transplant. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*, v. 33, p. 383-388, 2011.
- 31-** Centers for Disease Control and Prevention. Epstein Virus and Mononucleosis Infectious. <http://www.cdc.gov/Epstein-barr/hcp.html> (2014). Acesso em 15 de maio de 2018.
- 32-** Mazur-Melewska K, Breńska I, Jończyk-Potoczna K, Kemnitz P, Pieczonka-Ruszkowska I, Mania A, et al. Neurologic Complications Caused by Epstein-Barr Virus in Pediatric Patients. *J Child Neurol*. 2016;31(6):700-8.
- 33-** Cheng H, Chen D, Peng X, Wu P, Jiang L, Hu Y. Clinical characteristics of Epstein-Barr virus infection in the pediatric nervous system. *BMC Infect Dis*. 2020;20(1):886.
- 34-** Naddeo, F.; Passos-Castilho, A. M.; Granato, C. Cytomegalovirus Infection in Pregnancy. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*, v. 51, p. 310-314, 2015.

- 35-** Leruez-Ville M, Ren S, Magny JF, Jacquemard F, Couderc S, Garcia P, et al. Accuracy of prenatal ultrasound screening to identify fetuses infected by cytomegalovirus which will develop severe long-term sequelae. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2021;57(1):97-104.
- 36-** Devetag Fc, Boscariolo L. Cytomegalovirus Meningoencephalites With Paroxysmal Course in Immunocompetent Adults: A New Nosographical Entity. *Eur Neurol.* 2000; 44(4):242-7.
- 37-** Pantry, S. N.; Medveczky, P. G. Latency, Integration, and Reactivation of Human Herpesvirus-6. *Viruses*, v. 9, n. 7, Jul 24 2017.
- 38-** Agut, H.; Bonnafeous, P.; Gautheret-Dejean, A. Laboratory and Clinical Aspects of Human Herpesvirus 6 Infections. *Clinical Microbiology Reviews*, 1752 N St., N.W., Washington, DC, v. 28, n. 2, p. 313-335, 03/11 2015.
- 39-** Chan, PK, et al. Prevalence And Distribution of Human Herpesvirus 6 Variants in Adult Human Brain. *J Med Virol.* 2001; 64 (1): 42-6.
- 40-** Ward KN, Leong HN, Nacheva EP, Howard J, Atkinson CE, Davies NW, et al. Human herpesvirus 6 chromosomal integration in immunocompetent patients results in high levels of viral DNA in blood, sera, and hair follicles. *J Clin Microbiol.* 2006;44(4):1571-4.
- 41-** Daibata M, Taguchi T, Nemoto Y, Taguchi H, Miyoshi I. Inheritance of chromosomally integrated human herpesvirus 6 DNA. *Blood.* 1999;94(5):1545-9.
- 42-** Chuang Y-Y, Huang Y-C. Enteroviral Infection in Neonates. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection.* 2019;52(6):851-7.
- 43-** Lafolie J, Labbé A, L'Honneur AS, Madhi F, Pereira B, Decobert M, et al. Assessment of blood enterovirus PCR testing in paediatric populations with fever

without source, sepsis-like disease, or suspected meningitis: a prospective, multicentre, observational cohort study. *Lancet Infect Dis.* 2018;18(12):1385-96.

44- Pires, F. R. et al. Comparison of Enterovirus Detection in Cerebrospinal Fluid With Bacterial Meningitis Score in Children. *Einstein (São Paulo)*, v. 15, p. 167-172, 2017.

45- Markoulatos, P. et al. Laboratory Diagnosis of Common Herpesvirus Infections of the Central Nervous System by a Multiplex PCR Assay. *J Clin Microbiol*, v. 39, n. 12, p. 4426-32, Dec 2001.

46- Qiagen. QIAamp Viral RNA Mini Handbook 2020.

47- Life M. Kit Biopur Extração Mini Spin Vírus Dna / Rna 2017.

48- Corporation P. Sistema AccessQuick [™] RT-PCR 2800 Woods Hollow Road · Madison, WI 53711-5399 EUA 2018.

49- Gomes MdLC, Kopecka H, Ferreira Jr AG, Ferreira SMAG, Maneschky LAR, Linhares AC. Detection of Enteroviral Sequence in Endomyocardial Tissues From Patients With Cardiac Diseases In Northern Brazil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical.* 1998;31:487-90.

50- Sun Y, Chan RK, Tan SH, Ng PP. Detection and genotyping of human herpes simplex viruses in cutaneous lesions of erythema multiforme by nested PCR. *J Med Virol.* 2003;71(3):423-8.

51- Rodrigues D, de-Paris F, Paiva RM. Minimum detection limit of an in-house nested-PCR assay for herpes simplex virus and varicella zoster virus. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical.* 2013;46:625-8.

52- Ehrnst A, Barkholt L, Lewensohn-Fuchs I, Ljungman P, Teodosiu O, Staland A, et al. CMV PCR monitoring in leucocytes of transplant patients. *Clin Diagn Virol.* 1995;3(2):139-53.

- 53-** Cinque P, Brytting M, Vago L, Castagna A, Parravicini C, Zanchetta N, et al. Epstein-Barr virus DNA in cerebrospinal fluid from patients with AIDS-related primary lymphoma of the central nervous system. *Lancet*. 1993;342(8868):398-401.
- 54-** Wang FZ, Dahl H, Linde A, Brytting M, Ehrnst A, Ljungman P. Lymphotropic herpesviruses in allogeneic bone marrow transplantation. *Blood*. 1996;88(9):3615-20.
- 55-** Yalcin S, Karpuzoglu T, Suleymanlar G, Mutlu G, Mukai T, Yamamoto T, et al. Human herpesvirus 6 and human herpesvirus 7 infections in renal transplant recipients and healthy adults in Turkey. *Arch Virol*. 1994;136(1-2):183-90.

7 Anexos

Anexo 1- Aprovação no Comitê de Ética

	UNICAMP - CAMPUS CAMPINAS													
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: Manteve os mesmos do projeto original. Avaliação dos Riscos e Benefícios: Manteve 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, RAISSA NERY BINDILATTI e LIDIA 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: 13.083-887</td> </tr> <tr> <td>Bairro: Barão Geraldo</td> <td colspan="2"></td> </tr> <tr> <td>UF: SP</td> <td>Município: CAMPINAS</td> <td></td> </tr> <tr> <td>Telefone: (19)3521-8936</td> <td>Fax: (19)3521-7187</td> <td>E-mail: cep@fcm.unicamp.br</td> </tr> </table>			Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126		CEP: 13.083-887	Bairro: Barão Geraldo			UF: SP	Município: CAMPINAS		Telefone: (19)3521-8936	Fax: (19)3521-7187	E-mail: cep@fcm.unicamp.br
Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126		CEP: 13.083-887												
Bairro: Barão Geraldo														
UF: SP	Município: CAMPINAS													
Telefone: (19)3521-8936	Fax: (19)3521-7187	E-mail: cep@fcm.unicamp.br												

Página 01 de 01



Continuação do Parecer: 3.010.312

Nery Bindilatti irá fazer a "ANÁLISE DA PRESENÇA DE ENTEROVÍRUS NÃO-PÓLIO EM AMOSTRAS DE LÍQUIDO CEFALORRAQUIDIANO DE PACIENTES PEDIÁTRICOS COM MENINGITE ASSÉPTICA". A aluna Lidia Cristian de Oliveira Boffi estudará "DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE ARBOVIROSES BRASILEIRAS EM LÍQUIDO CEFALORRAQUIDIANO 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 Tessália Vieira de Camargo, 126
Bairro: Barão Geraldo **CEP:** 13.083-887
UF: SP **Município:** CAMPINAS
Telefone: (19)3521-8936 **Fax:** (19)3521-7187 **E-mail:** cep@fcm.unicamp.br



Continuação do Parecer: 3.010.312

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_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_1218548_E2.pdf	01/10/2018 16:45:59		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	termodeconsentimento.pdf	16/11/2016 17:23:57	SANDRA HELENA ALVES BONON	Aceito
Outros	cartaresposta2.pdf	10/10/2016 14:34:21	SANDRA HELENA ALVES BONON	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura	PROJETOSNETICA2016.pdf	10/10/2016 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)3521-8936

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	folhaderostohc.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 2018

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

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126
Bairro: Barão Geraldo **CEP:** 13.083-887
UF: SP **Município:** CAMPINAS
Telefone: (19)3521-8936 **Fax:** (19)3521-7187 **E-mail:** cep@fcm.unicamp.br