



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS

SUZANA FERREIRA ZIMMERMAN

**Diagnóstico por Biologia Molecular de infecções congênicas e neonatais
no líquido cefalorraquidiano de recém nascidos atendidos no CAISM/ Unicamp**

CAMPINAS

2024

SUZANA FERREIRA ZIMMERMAN

Diagnóstico por Biologia Molecular de infecções congênitas e neonatais

no líquido cefalorraquidiano de recém nascidos atendidos no

CAISM/ Unicamp

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

ORIENTADOR: PROF. DR. SÉRGIO TADEU MARTINS MARBA

COORIENTADORA: PROFA. DRA. SANDRA HELENA ALVES BONON

ESTE TRABALHO CORRESPONDE À VERSÃO

FINAL DA TESE DEFENDIDA PELA ALUNA SUZANA FERREIRA ZIMMERMAN,

E ORIENTADO PELO PROF. DR. SÉRGIO TADEU MARTINS MARBA

CAMPINAS

2024

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Ciências Médicas
Ana Paula de Moraes e Oliveira - CRB 8/8985

Zimmerman, Suzana Ferreira, 1977-
Z655d Diagnóstico por biologia molecular de infecções congênitas e neonatais no líquido cefalorraquidiano de recém nascidos atendidos no CAISM/Unicamp / Suzana Ferreira Zimmerman. – Campinas, SP : [s.n.], 2024.

Orientador: Sérgio Tadeu Martins Marba.
Coorientador: Sandra Helena Alves Bonon.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Recém-nascido. 2. Infecção por Zika vírus. 3. Parvovírus B19 humano. 4. Infecção pelo vírus da Varicela-Zoster. 5. Reação em cadeia de polimerase. I. Marba, Sérgio Tadeu Martins, 1958-. II. Bonon, Sandra Helena Alves. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

Informações Complementares

Título em outro idioma: Diagnosis by molecular biology of congenital and neonatal infections in cerebrospinal fluid of Unicamp's CAISM newborns

Palavras-chave em inglês:

Infant, Newborn

Zika virus infections

Parvovirus B19, Human

Varicella zoster virus infection

Polymerase chain reaction

Área de concentração: Saúde da Criança e do Adolescente

Titulação: Doutora em Ciências

Banca examinadora:

Sérgio Tadeu Martins Marba [Orientador]

Jamil Pedro de Siqueira Caldas

Ricardo Mendes Pereira

José Espin Neto

Maria Regina Bentlin

Data de defesa: 25-01-2024

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

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

- ORCID do autor: <https://orcid.org/0000-0003-4846-2071>

- Currículo Lattes do autor: <http://lattes.cnpq.br/02674473403574615>

COMISSÃO EXAMINADORA DA DEFESA DE DOUTORADO

SUZANA FERREIRA ZIMMERMAN

ORIENTADOR: PROF. DR. SÉRGIO TADEU MARTINS MARBA

COORIENTADORA: PROFA. DRA. SANDRA HELENA ALVES BONON

MEMBROS:

1. PROF. DR. : SÉRGIO TADEU MARTINS MARBA

2. PROF. DR. RICARDO MENDES PEREIRA

3. PROFA. DRA. MARIA REGINA BENTLIN

4. PROF. DR. JOSÉ ESPIN NETO

5. PROF. DR. JAMIL PEDRO DE SIQUEIRA CALDAS

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: 25/01/2024

PÁGINA DE DEDICATÓRIA

Dedico aos meus filhos, Gustavo e Eduardo, minha inspiração constante para o cuidado e atenção, desde a sua concepção, para sempre. Que todo amor com que vocês me presenteiam, se converta em estímulo para que eu possa estar sempre procurando compreender todas as fases e potencialidades de desenvolvimento de um ser humano em formação.

Dedico ao meu companheiro em todos os momentos importantes da minha vida, Fabrício. Sem dúvida, toda caminhada tem sido mais leve e feliz ao seu lado. Toda minha gratidão pelo companheirismo, amor, apoio e parceria.

Dedico à minha família: meus pais Rosa Maria e José Roberto; minhas irmãs Ana Clara, Isabel e Natália; meus irmãos Leonardo e João. Todo estímulo e incentivo de vocês me fortalecem e refazem meus objetivos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço, em primeiro lugar, à minha família, que é a minha base, a partir da qual nasceram meus sonhos, projetos, minha esperança de construir novas possibilidades.

Agradeço ao Prof. Dr. Sérgio Tadeu Martins Marba, meu Orientador, pelo incentivo e exemplo. Considero um privilégio ter podido conhecer sua atuação como aluna da Graduação em Medicina, Residente da Pediatria e Neonatologia, assim como na sua disciplina de Pedagogia e Didática no Mestrado e agora, no Doutorado.

Agradeço à minha Coorientadora Profa Dra Sandra Helena Alves Bonon, a quem devo tanto o aprendizado de técnicas de Biologia Molecular, no Laboratório de Virologia da FCM Unicamp, quanto vários aspectos do projeto, da redação de artigos científicos e da tese. Sempre presente e acessível, transmitiu para mim conhecimento, segurança e apoio.

Agradeço ao Prof. Dr André Moreno Morcillo, por sua sempre valorosa contribuição com a análise estatística e interpretação dos dados.

Agradeço ao Rodrigo Lima, técnico do Laboratório de Virologia, por ter apoiado o projeto de infecções congênitas, a quem devo vários ensinamentos e acessoria prática e ágil na fase experimental do trabalho.

Agradeço aos professores e aos meus colegas de trabalho na Pediatria, parceiros do dia a dia, partilhando anseios, estímulo, apoio. Agradeço também à equipe de saúde responsável pela assistência aos pacientes que fizeram parte deste estudo.

Agradeço aos pacientes e seus pais, por consentirem com a participação neste trabalho, visando um bem maior de geração e propagação de novos conhecimentos.

Agradeço à Pós Graduação em Saúde da Criança e do Adolescente, assim como a Biblioteca da FCM Unicamp, pela oportunidade e por viabilizarem mais uma etapa da minha formação nesta Universidade, em que estou há mais de 20 anos e na qual tenho também satisfação em poder trabalhar.

EPÍGRAFE

“Para que todas as crianças tenham vida em abundância”- Zilda Arns, Museu da Vida- Curitiba (PR).

RESUMO

O risco de transmissão vertical de infecções depende do patógeno e do momento da gestação. Geralmente, as condições mais graves são adquiridas no primeiro trimestre, mas pode haver danos em outros momentos. Algumas dessas infecções são causadas pelos agentes TORCHZ: **T**oxoplasmose, **R**ubéola, **C**itomegalovírus, **H**erpesvírus simples 1 e 2 e **O**utras (Varicela zoster, Parvovírus B-19, vírus Epstein-Barr, Sífilis e vírus Zika). As consequências podem ser: natimortalidade, prematuridade, retardo do crescimento uterino e malformações congênitas. A detecção do DNA/RNA no Líquido Cefalorraquidiano (LCR) por métodos moleculares constitui um marcador do envolvimento da infecção congênita no Sistema Nervoso Central. **Objetivos:** identificar a frequência da presença do genoma dos patógenos TORCHZ em amostras de LCR de recém-nascidos (até 28 dias) atendidos no Centro de Atenção Integral à Saúde da Mulher da Universidade Estadual de Campinas (CAISM/UNICAMP), utilizando a Nested-PCR e para o vírus Zika a PCR em tempo real; correlacionar os resultados com a clínica; verificar o uso e as vantagens dessas metodologias através de Revisão Sistemática. **Métodos:** estudo descritivo prospectivo utilizando 151 amostras de LCR de neonatos, que haviam sido coletadas para diagnóstico citológico e bioquímico, no período de 2017 a 2021. Após liberação dos resultados e consentimento dos pais e responsáveis, o material remanescente foi encaminhado ao Laboratório de Virologia da Faculdade de Ciências Médicas (FCM) / Unicamp e após a extração do material genético, foram realizadas as análises moleculares para identificação dos genomas. Foi feita também revisão dos prontuários destes pacientes com inclusão das seguintes variáveis: sexo, peso e comprimento ao nascer; idade gestacional, idade pós-nascimento, perímetro cefálico, índice de Apgar no 1º. e 5º. minutos, anomalias de qualquer sistema, presença ou não de microcefalia e quaisquer outras intercorrências. A estatística descritiva (medidas de tendência central e de dispersão de dados), testes de significância estatística para as diferenças entre as médias (teste t-student) para variáveis contínuas com nível de significância 0,05, e intervalo de confiança de 95% foram realizados utilizando o software SPSS 16.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) e Stata 12.0 (Stata - Statistical Software: Release 12. College Station, TX: StataCorp LP). Esse trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética da FCM

Unicamp (CAAE: 86760218.3.0000.5404), via Plataforma Brasil. Foi realizada também Revisão Sistemática, com registro Prospectivo Internacional de Revisões Sistemáticas - PROSPERO – CRD42021274210. **Resultados:** Dentre as 151 amostras de LCR incluídas no estudo, 16 foram positivas (10,6% [IC95%: 6,18% – 16,63%]): Duas amostras positivas para HSV-1 (1,3%), quatro para VZV (2,6%), uma para CMV (0,67%), duas para Toxoplasmose (1,3%), quatro para Parvovírus B-19 (2,6%) e quatro para o Zika (2,6%). A proporção de PCR positivo foi maior no grupo que apresentou malformações congênitas [25,0% vs 8,4%], $p = 0,040$. Foram incluídos 29 artigos na Revisão Sistemática. **Conclusão:** Na nossa casuística, a associação entre identificação molecular dos genomas dos patógenos estudados e os sinais de malformações congênitas apresentados sugere a relevância clínica do diagnóstico etiológico por biologia molecular. Na Revisão Sistemática, os patógenos mais estudados foram HSV-1 e 2, evidenciado a eficácia e rapidez da metodologia molecular para diagnóstico das neuroinfecções congênitas.

Palavras chave: Recém-Nascido; Infecções por Citomegalovírus; Encefalite por Varicela Zoster; Encefalite por Herpes Simples; Parvovirus B19 Humano; Infecções por Vírus Epstein-Barr; Toxoplasmose congênita; Infecção por Zika vírus; Reação em Cadeia da Polimerase; Líquido Cefalorraquidiano.

ABSTRACT

The risk of transmission from mother to fetus depends on the type of infection and time of gestation. Generally, the most severe conditions are acquired in the first trimester of pregnancy. Some of these infections are TORCHZ: Toxoplasmosis, Rubella, Cytomegalovirus, Herpes simplex types 1 and 2 and Other, such as Syphilis, Varicella zoster, Parvovirus B19, Epstein-Barr Virus, Zika vírus. The consequences of which can be: stillbirths, prematurity, uterine growth retardation and congenital malformations. Detection of DNA / RNA from CSF by molecular methods is a marker of the involvement of congenital infection in the nervous system. This study **aimed** to identify the frequency of these pathogens in samples of CSF infants born from 1 to 28 days old with suspected congenital infection, at Centro de Atenção Integral à Saúde da Mulher da Universidade Estadual de Campinas (CAISM/UNICAMP), using molecular methods (Nested-PCR and Real time PCR); and its clinical consequences; verify the use and advantages of this methodology with a Systematic Review. **Methods:** prospective descriptive study with 151 samples of CSF that have been collected for cytological and biochemical diagnosis at the medical criterion, from 2017 to 2021. After release of these results and signature of the consent by the responsables, the leftover material were sent to the Virology Laboratory / Faculdade de Ciências Médicas (FCM)/ Unicamp and submitted to DNA and RNA extraction and to the molecular analyzes. A review of patients' medical records were performed and collected data on the following variables: sex, weight and length at birth; gestational age, post-birth age, head circumference, Apgar score in the 1st and 5th minutes, anomalies of any system, presence or absence of microcephaly and any other complications. Descriptive statistics were performed using measures of central tendency and measures of data dispersion. Statistical significance tests were obtained for the differences between means (t-student test) for continuous variables with significance level of 0.05 and 95% confidence interval, using statistical software package SPSS 16.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) and Stata 12.0 (Stata - Statistical Software: Release 12. College Station, TX: StataCorp LP). This work was approved by the FCM Unicamp Ethics Committee (CAAE: 86760218.3.0000.5404). We performed a Systematic Review, which were registered into the International Prospective Register of Systematic Reviews - PROSPERO – CRD42021274210. **Results:** were obtained 151 CSF samples, 16 of which were positive (10.6% [95% CI%: 6,18% – 16,63%]). Two of these were PCR positive for

HSV-1 (1.3%), four positives for VZV (2.6%), one for CMV (0.67%), two for Toxoplasmosis (1.3%), four for Parvovirus B-19 (2.6%) and four for Zika virus (2.6%). The proportion of positive PCR is higher in the group that presented malformations [25.0% vs 8.4%], $p = 0.040$. In the Systematic Review, 29 articles were included.

Conclusion: In our case series, the association between the molecular identification of pathogen genomes and signs of congenital malformations suggests the clinical relevance of etiological diagnosis by molecular biology. In the Systematic Review, the most studied pathogens were HSV-1 and 2, highlighting the effectiveness and speed of the molecular methodology for diagnosing congenital neuroinfections.

Key Words: newborn; congenital Toxoplasmosis; Herpes Simplex Meningoencephalitis; Varicella Zoster Encephalitis; Epstein-Barr Virus Infections; Cytomegalovirus Infections; Human Parvovirus B19, Zika virus infection; polymerase chain reaction; cerebrospinal fluid.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Fluxograma PRISMA- página 28.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Principais Características dos RN da Unidade Neonatal do CAISM - Unicamp, com amostras de LCR incluídas no estudo, de 2017 a 2021- página 36.

Tabela 2 - Percentual de positividade dos PCRs - patógenos detectados no LCR dos RN e Intervalo de Confiança 95% - página 38.

Tabela 3 - Malformações Congênitas e patógenos detectados no LCR dos RNs de 2017 a 2021- página 40.

Tabela 4 - Avaliação das reações de PCR conforme o diagnóstico – página 42.

Tabela 5 - Avaliação Global do PCR e diagnósticos de acordo com a proteína e celularidade do LCR– página 44.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A: Adenina

B-19: Parvovírus B-19

C: Citosina

CAAE: Certificado de Apresentação de Apreciação Ética

CAISM- Centro de Atenção Integral à Saúde da Mulher (CAISM), Hospital da Mulher
Professor Doutor José Aristodemo Pinotti

CDC: Centers for Disease Control and Prevention

CEP: Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos

CMV: Citomegalovírus

CT: Tomografia Computadorizada

DeCS: Descritores em Ciências da Saúde

DNA: Ácido desoxirribonucleico

DNPM : desenvolvimento neuropsicomotor

DP: Desvio Padrão

EBV: Vírus Epstein-Barr

ESPIN: Emergência em Saúde Pública de Importância Nacional

F: Feminino

FCM: Faculdade de Ciências Médicas

G: Guanina

H₂O: Fórmula química da água

HC: Hospital de Clínicas

HDi: Hipótese diagnóstica inicial

HHV: Herpesvírus humano

HHV-3: Herpesvírus humano 3

HHV-4: Herpesvírus humano 4

HHV-5: Herpesvírus humano 5

HSV-1 Herpes Simples Vírus tipo 1

HSV-2: Herpes Simples Vírus tipo 2

Kg: kilogramas

LCR: Líquido cefalorraquidiano

M: Masculino

MeSH: Medical Subject Headings

NEG: Negativo

N-PCR: Reação em Cadeia da Polimerase tipo Nested

OMS: Organização Mundial de Saúde

PB: Pares de bases

PC: Perímetro Cefálico

PCR: Reação em cadeia da polimerase

POS: Positivo

PRISMA: Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyzes

PROSPERO: Registro Prospectivo Internacional de Revisões Sistemáticas

RCIU: Retardo do crescimento intrauterino

RCTs: ensaios clínicos randomizados

Real-time PCR: Reação em cadeia da polimerase em Tempo Real

RN: recém-nascido

RNA: Ácido ribonucleico

RPM: Rotações por minuto

RT-PCR: Transcrição reversa seguida de reação em cadeia da polimerase

RT-qPCR: PCR em Tempo Real

SNC: Sistema Nervoso Central

SZC: Síndrome da Zika Congênita

T: Timina

Taq: *Thermus aquaticus*

TCLE: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TORCHZ: patógenos causadores de infecções congênitas –T (Toxoplasmose), R (Rubéola), C (Citomegalovírus), H (Herpes Simples tipos 1 e 2), Z (vírus Zika) e outros

Unicamp: Universidade Estadual de Campinas

USTF: Ultrassom transfontanela

VZV: Varicela Zoster Vírus

ZIKV: vírus Zika

LISTA DE SÍMBOLOS

°C: Grau Celsius

%: Símbolo de porcentagem

<: Menor que

>: Maior que

+: Positivo

1º: Primeiro

2º: Segundo

3º: Terceiro

5' 3': Sentido de transcrição

µL: Microlitro

DI: Decilitro

MI: Mililitro

mm³: Milímetro cúbico

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	página 20
2. OBJETIVOS.....	página 25
3. METODOLOGIA.....	página 26
4. RESULTADOS.....	página 35
Artigo 1 (Revisão Sistemática)	página 46
Artigo 2	página 91
5. DISCUSSÃO GERAL	página 116
6. CONCLUSÃO	página 129
7. REFERÊNCIAS.....	página 131
8. APÊNDICES: Descrição dos quadros clínico- laboratoriais dos pacientes com infecção congênita detectada pela realização de testes moleculares no LCR dos recém-nascidos incluídos no estudo.....	página 145
9. ANEXOS	página 148
- Anexo 1: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.....	página 148
- Anexo 2: Laudo	página 153
- Anexo 3: Sequência de oligonucleotídeos usados para detectar os patógenos com genomas de DNA conforme metodologias de PCR e N-PCR:	página 154
- Anexo 4: Sequência de oligonucleotídeos dos primers usados conforme metodologia de PCR em tempo real para detecção do vírus Zika.....	página 155
- Anexo 5: Folha de Direitos de reprodução do artigo submetido à Revista Paulista de Pediatria.....	página 156
- Anexo 6: Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa.....	página 157

INTRODUÇÃO

Algumas infecções causadas por vírus, bactérias ou protozoários podem ser transmitidas da mãe para o feto ou recém-nascido e causar sinais e sintomas nestes pacientes. As infecções podem ser transmitidas no período pré-natal através da via hematogênica e transplacentária, ou no momento do parto e pós-natal pelo contato com sangue ou secreções vaginais contaminadas (1).

Como consequência deste processo infeccioso adquirido na fase de vida intra-uterina podem ocorrer: aborto, natimortalidade, malformações congênitas, prematuridade, retardo do crescimento intrauterino (RCIU), doença aguda do recém-nascido (RN), infecção assintomática no período neonatal com posteriores sequelas neurológicas (2).

Os diversos agentes etiológicos podem causar, ainda, no período peri-parto ou pós natal, sinais relacionados ao local acometido, como: meningites, encefalite ou meningoencefalites, com quadro clínico-laboratorial relacionado ao dano neurológico causado pela presença do patógeno nessas estruturas, podendo evoluir com convulsão, sequelas ou até o óbito do neonato (1, 2, 3-6).

As meningites são mais comuns na faixa etária neonatal, provocando febre e outros sintomas, muitas vezes inespecíficos como irritabilidade, baixa aceitação alimentar. Já a encefalite é um quadro agudo, difuso, que atinge o cérebro, causando febre, convulsões e sintomas neurológicos. Pode ocorrer também meningoencefalite, com o acometimento de ambas estruturas - meninges e parênquima cerebral (7-9).

Além da mortalidade, há também dano associado à morbidade causada por essas infecções, principalmente as sequelas relacionadas a déficits no desenvolvimento neuropsicomotor (1, 2, 4, 5, 10).

Os vírus da família *Herpesviridae* (herpesvírus humanos - HHV) são alguns dos patógenos causadores de infecções nos recém-nascidos (11,12). Muitos dos casos de infecção apresentam-se assintomáticos ao nascer. Ainda assim, sinais e sintomas a longo prazo podem ocorrer devido à característica de manter latência e possibilidade de reativação em outros momentos, comum aos HHV (13- 16).

O neurotropismo é outra característica dos HHVs, podendo estas infecções se manifestarem como: meningite, encefalite, ou meningoencefalite. Essas patologias podem ter uma série de apresentações clínicas, como febre, convulsões, mas em neonatos muitas vezes os sinais iniciais são inespecíficos, o que dificulta o diagnóstico etiológico, se baseado apenas no quadro clínico (11,13-16).

A família *Herpesviridae* possui três subfamílias: os *Alphaherpesviridae*, em que estão os vírus Herpes simples tipos 1 e 2 (HSV-1, HSV-2) e o vírus Varicella-Zoster (VZV); os *Betaherpesviridae* – à qual pertence o Citomegalovírus (CMV) e os *Gamaherpesviridae* – em que está incluído o vírus Epstein- Barr (EBV) – (17, 18).

Os HSV são pertencentes à subfamília *Alphaherpesviridae*, gênero *Simplexvirus*, espécie 1 e 2. São vírus de DNA de dupla fita (15), sendo que o HSV-1 possui 152 mil pares de bases (pb). A infecção primária causada por esse vírus pode causar lesões da mucosa, principalmente da boca, com a formação de aftas. A excreção de partículas infectantes de HSV-1 por saliva pode ocorrer em adultos e crianças, de forma assintomática, a qual é uma via de transmissão importante, junto com as infecções verticais.

Manifestações graves também podem ser observadas, como a encefalite herpética. Uma vez que o vírus fica latente, pode atingir posteriormente o parênquima cerebral (18, 19, 20).

Com DNA fita dupla de cerca de 155 mil pb e características morfológicas semelhantes ao HSV-1, o HSV-2 também tem neurotropismo e permanece latente em tecido nervoso. Este patógeno está bastante relacionado ao herpes genital, mas também pode provocar encefalites, assim como meningites em neonatos. O contágio de recém-nascidos com o vírus pode acontecer no canal do parto, ao entrarem em contato com secreções e lesões maternas contaminadas (21- 24).

O vírus da Varicela Zoster (VZV) ou Herpesvírus humano tipo 3 (HHV-3) possui DNA fita dupla com aproximadamente 125 mil PB. Está incluído na família *Herpesviridae*, subfamília *Alphaherpesviridae*, gênero *Varicellovirus*. Sua estrutura é semelhante aos demais vírus da família *Herpesviridae*, com a mesma característica de estado de latência (25).

A varicela é transmitida através de secreções respiratórias ou por contato direto com as vesículas de um indivíduo infectado, além da possibilidade de transmissão transplacentária (25). Além da varicela, o VZV pode provocar herpes zoster, com aparecimento de vesículas dolorosas, em região limitada a um dermatomo. Também são associadas a esse vírus infecções do Sistema Nervoso, inclusive em indivíduos que não apresentaram as lesões de pele e mucosas (26).

O vírus Epstein- Barr (EBV) ou Herpesvírus humano tipo 4 (HHV-4) com DNA dupla fita, é composto por 184 mil pb. A manifestação mais frequentemente associada é denominada mononucleose infecciosa. Mas também são possíveis manifestações neurológicas provocadas pelo EBV, causando doenças como a meningite, encefalite ou meningoencefalite, inclusive com descrição de contágio por via vertical (27).

O Citomegalovírus (CMV), também conhecido como Herpesvírus humano tipo 5 (HHV-5), é da subfamília *Betaherpesviridae*, com cerca de 230 mil pb. Está presente em grande parte da população mundial, com soroprevalência de 95%. É reconhecido como agente etiológico de infecção congênita mais prevalente no mundo (28-34). A infecção é geralmente assintomática, porém com a latência viral, comum aos agentes da família *Herpesviridae* (35), esse vírus pode provocar em outros momentos da vida do indivíduo, manifestações clínicas de hepatites, miocardites e também lesões de Sistema Nervoso (36-38). Em neonatos infectados por via vertical, a possibilidade de reativação viral posterior traz consigo o risco de sequelas de desenvolvimento neuropsicomotor e perda auditiva neurossensorial a médio e longo prazos (29).

A toxoplasmose é uma doença causada pelo protozoário *Toxoplasma gondii* que é um protozoário parasita intracelular. Tem ampla distribuição geográfica (acomete aproximadamente um terço da população mundial), sendo responsável por uma alta prevalência sorológica, e pode atingir 60% da população em determinados países, como o Brasil . O ser humano pode adquirir esta infecção pela ingestão de oocistos de *Toxoplasma* presentes na água ou alimentos contaminados, em carne crua ou mal cozida ou pela via congênita transplacentária (39- 43).

O Parvovírus B19 é um vírus pertencente à família *Parvoviridae*, gênero *Erythrovirus*. É responsável por causar infecção no homem, podendo ser transmitido pelas secreções respiratórias e por via transplacentária durante a gravidez (44). O Parvovirus B19 causa o eritema infeccioso, ou quinta doença em crianças. Cerca de 25 a 80% das mulheres já são imunes ao vírus antes de engravidar. A taxa de soroconversão de mulheres em idade fértil é de 1,5%. A infecção transplacentária por Parvovirus B19 ocorre em 30 a 50 % das mulheres com infecção aguda. No entanto, ainda que infectados, a maioria dos recém-nascidos nascem assintomáticos. Porém, sabe-se que o Parvovirus B-19 pode causar hidropsia fetal e anemia aplásica congênita- pois o vírus é um inibidor potente da diferenciação dos glóbulos vermelhos (45).

O vírus Zika é um arbovírus pertencente à família *Flaviviridae*. É um vírus envelopado com genoma de RNA (46, 47), que causa infecções transmitidas por vetores artrópodes presentes em regiões do planeta, principalmente de clima tropical (46-50), como o nosso país (46, 48-50).

A maioria dos indivíduos infectados pelo vírus Zika (ZIKV) são assintomáticos, mas muitas vezes causam infecções no Sistema Nervoso. Após a epidemia de 2015 a 2017 no Brasil, vários estudos vêm descrevendo os sintomas e sinais que passaram a ser associados a este vírus, em especial a associação do ZIKV com uma síndrome congênita em recém-nascidos, descrita na literatura desde 2016, destacando os numerosos casos de microcefalia nos neonatos (51, 52). Além disso, outras possíveis malformações podem estar associadas aos pacientes com LCR positivos na investigação deste patógeno (53-55).

O acrônimo TORCH é bem conhecido no campo da medicina neonatal/perinatal. O conceito original dos agentes TORCH foi composto por um grupo de cinco infecções com apresentações semelhantes: a Toxoplasmose, Rubéola, Citomegalovírus e Herpes simples tipos 1 e 2. Entretanto, há outras infecções congênitas descritas com sintomatologia similar, tais como as causadas por Parvovírus B-19, Epstein-Barr, Varicela zoster e mais recentemente o vírus Zika, com o que há proposta de mudança do termo para TORCHZ (54,55).

Essas características clínicas não se restringem às infecções por agentes TORCHZ e algumas delas podem ocorrer em outras infecções. Assim,

todo o quadro clínico, além da história materna e de exposições na gestação, devem ser considerados ao se decidir avaliar um neonato para determinada infecção congênita (56).

Em alguns casos, pode-se suspeitar de infecção intrauterina com base nos resultados laboratoriais obtidos durante a gestação como, por exemplo, sorologia materna positiva para toxoplasmose. Na ausência desses resultados sugestivos, pode-se suspeitar de infecção intrauterina em recém-nascidos com certas manifestações clínicas (57). No entanto, como muitas vezes esse quadro clínico inicial é inespecífico ou mesmo ausente, faz-se necessário um método diagnóstico eficiente, para que haja rápida detecção e possibilite a instituição precoce da terapêutica disponível, minimizando a morbi-mortalidade associadas a essas patologias (58, 59).

OBJETIVOS

➤ Geral:

Identificar os principais patógenos causadores de infecções congênitas em amostras de LCR de recém-nascidos (RN) com suspeita destas infecções, atendidos no Hospital da Mulher Professor Doutor José Aristodemo Pinotti – do Centro de Atenção Integral à Saúde da Mulher (CAISM) na Universidade Estadual de Campinas (Unicamp), SP, através da utilização de metodologia molecular.

➤ Específicos:

- 1) Identificar o quadro clínico presente nos pacientes com detecção dos patógenos TORCHZ, através da avaliação dos prontuários, dos recém-nascidos com suspeita de infecções congênitas, provenientes do CAISM Unicamp.
- 2) Identificar as malformações congênitas presentes nos pacientes com detecção dos patógenos TORCHZ, através da avaliação dos prontuários, dos recém-nascidos com suspeita de infecções congênitas, provenientes do CAISM Unicamp.
- 3) Verificar o uso e identificar as vantagens das metodologias moleculares (PCR, Nested-PCR, PCR em tempo Real) na detecção dos patógenos TORCHZ e Covid-19 (Toxoplasmose, Rubéola, Citomegalovírus, Herpes simplex tipos 1 e 2 e Outros, como Sífilis, Varicela zoster, EBV, Parvovírus B-19, Zika e SARS-CoV-2) em líquido cefalorraquidiano dos recém-nascidos de 1 a 28 dias com suspeita de infecções congênitas, através da realização de Revisão Sistemática.

CASUÍSTICA E MÉTODOS:

1) REVISÃO SISTEMÁTICA

A revisão foi registrada no Registro Prospectivo Internacional de Revisões Sistemáticas – PROSPERO – número CRD42021274210.

Fontes de dados

A busca bibliográfica foi realizada nas seguintes bases de dados: PubMed, BVS/BIREME, Scopus, Web of Science, EMBASE, Biblioteca Cochrane, PROQUEST, EBSCOhost. Não houve restrição de datas de publicação. Incluímos artigos publicados em inglês, espanhol, italiano e português.

A pesquisa bibliográfica realizada sobre a detecção de DNA/RNA de patógenos causadores de infecções congênitas TORCH no líquido cefalorraquidiano por métodos moleculares foi revisada utilizando descritores específicos e seus sinônimos de acordo com os “Medical Subject Headings” (MeSH) e Descritores em Ciências da Saúde (DeCS). Os termos de pesquisa foram: “newborn” and agentes TORCHZ (“congenital toxoplasmosis” or “encephalitis varicella-zoster virus” or “parvovirus B-19” or “congenital rubella syndrome” or “congenital syphilis” or “congenital cytomegalovirus” or “encephalitis herpes simplex virus” or “SARS-CoV-2” or “Covid-19”) and “PCR” or “polymerase chain reaction” and “cerebrospinal fluid”. Nesta pesquisa, operadores booleanos e símbolos como OR e AND foram usados para fazer a busca.

A estratégia de busca foi realizada de agosto de 2021 a outubro de 2021. As buscas foram feitas em inglês, português, italiano e espanhol, não sendo utilizados filtros para o ano de publicação. A pesquisa foi atualizada em dezembro de 2022.

Seleção

Esta revisão foi realizada respeitando os critérios da lista de verificação descritos pelo “Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses” (PRISMA) - Figura 1.

Dois autores independentes fizeram esta seleção e um 3º autor resolveu as discordâncias , quando havia, até que fosse alcançado o consenso.

Critérios de elegibilidade

Foram considerados estudos investigando o diagnóstico de infecção congênita utilizando métodos de Biologia Molecular com técnica de reação em cadeia da polimerase no líquido cefalorraquidiano de recém-nascidos.

Foram incluídos estudos com recém-nascidos de até 28 dias de vida, com suspeita de infecções congênitas (causadas pelos agentes TORCHZ, Parvovírus B-19, vírus Varicela, Zika e SARS-CoV-2), diagnosticadas por PCR.

Consideramos ensaios clínicos randomizados (RCTs), não-RCTs (como ensaios controlados quase randomizados), estudos longitudinais (retrospectivos, prospectivos, caso-controles), estudos transversais, artigos revisados por pares, estudos em humanos.

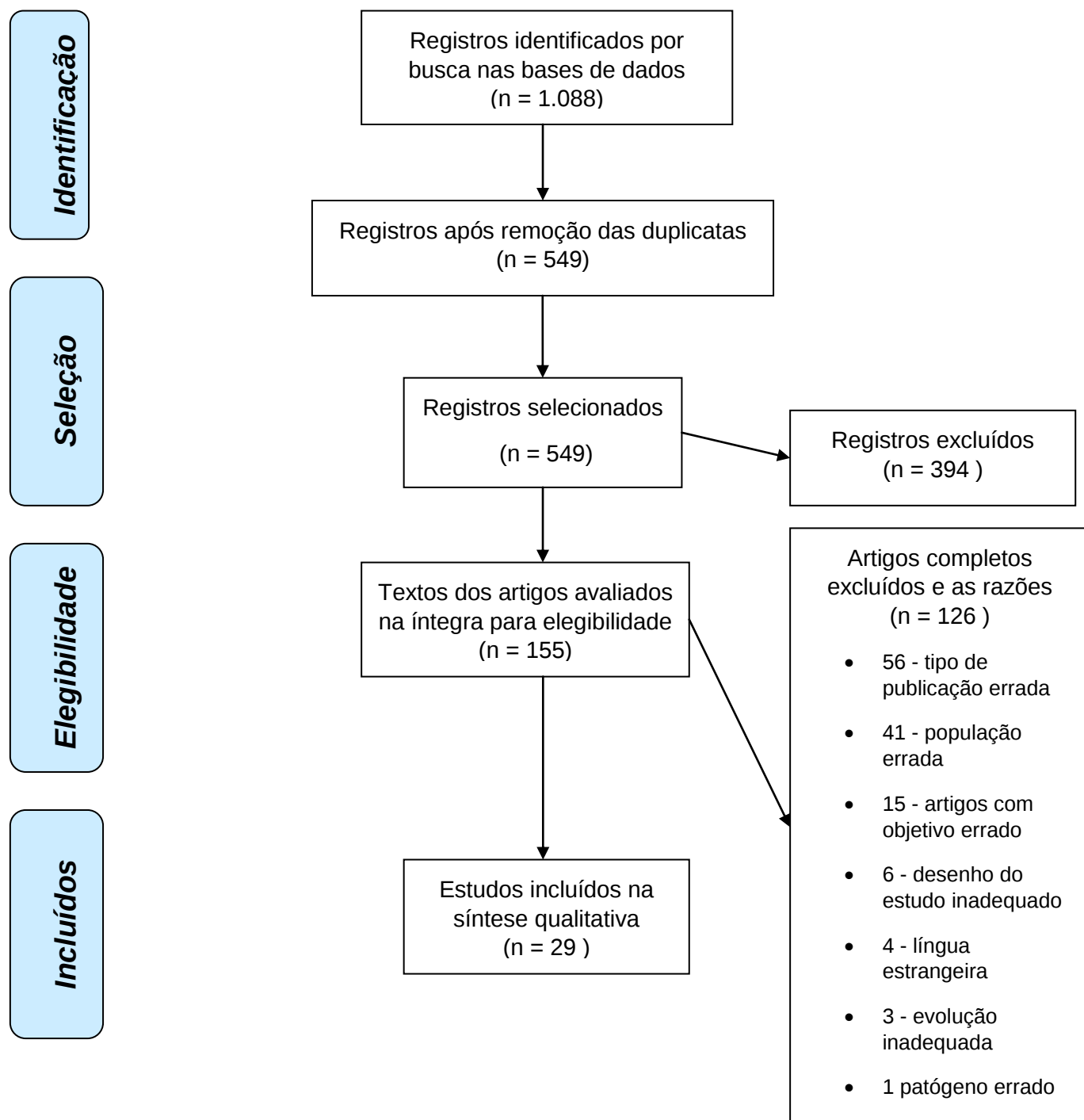
Estudos com recém-nascidos de até 28 dias submetidos a outras metodologias de diagnóstico de infecções congênitas pelos agentes TORCHZ ou lactentes com 29 dias ou mais foram excluídos.

Dados extraídos

Dois avaliadores realizaram a extração de dados e análise dos artigos selecionados. Extraíram informações necessárias como autores, ano de publicação, nacionalidade, desenho e tipo de estudo, sujeitos da amostra, e informações mais detalhadas sobre os métodos moleculares para detecção de DNA/RNA de patógenos TORCHZ e SARS-CoV-2, causadores de infecções congênitas no LCR, resultados e conclusões dos estudos selecionados.



Figura 1- Fluxograma PRISMA



From: Moher D, Liberati A, Tetzlaff J, Altman DG,

The PRISMA Group (2009). Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses: The PRISMA Statement. PLoS Med 6(7): e1000097. doi:10.1371/journal.pmed1000097

For more information, visit www.prisma-statement.org.

2) TIPO DE ESTUDO: PESQUISA DE CARÁTER DESCRITIVO PROSPECTIVO

Foram incluídas prospectivamente amostras de líquido cefalorraquidiano (LCR) de pacientes recém-nascidos (1 a 28 dias), com suspeita de infecção congênita, atendidos na Unidade de Terapia Intensiva Neonatal do CAISM, captados a partir da demanda, no período de julho de 2017 a junho de 2021.

As amostras de LCR coletadas eram originadas da Unidade neonatal do CAISM e enviadas para pesquisas citológicas e bioquímicas solicitadas pelo médico, para condução clínica do caso, ao Laboratório de Líquidos Biológicos do Departamento de Patologia Clínica do Hospital de Clínicas da Unicamp. O material remanescente destes exames, ao invés de ser descartado, foi estocado em freezer a -20 °C e posteriormente encaminhado ao Laboratório de Virologia da Faculdade de Ciências Médicas (FCM) Unicamp. O estudo não solicitou coletas adicionais não oferecendo nenhum prejuízo aos pacientes.

Todas as amostras ficaram armazenadas a -80°C, em caixas específicas (criobox), etiquetadas e numeradas, seguindo a ordem de numeração gerada no ato de entrada da amostra. Uma vez descongeladas, as amostras foram submetidas à extração dos ácidos nucleicos (DNA e RNA) e serviram para as análises moleculares sobre a presença dos genomas estudados. Após realizar a extração do DNA e RNA dos patógenos investigados, foram feitas as reações da PCR e Nested PCR (N-PCR) para identificar os agentes etiológicos e, no caso da identificação do genoma do vírus Zika, foi feita a PCR em tempo real.

Os dados de identificação dos pacientes foram coletados do prontuário juntamente com os principais sinais e sintomas, além de outras variáveis especificadas a seguir.

As atividades de investigação laboratorial molecular em todas as fases do estudo aconteceram no Laboratório de Virologia da FCM/UNICAMP.

Extrações do DNA das amostras de LCR

O DNA da amostra foi extraído a partir de 200ul de LCR, utilizando BIOPUR Kit Extração Mini Spin Plus, seguindo-se as instruções do fabricante. O volume final obtido foi de 200ul.

Para monitorar a presença de inibidores, primers do gene da Beta2-microglobulina (F: GGTGTCTTGAGGCTCAGGGAG; R: CAACTTCAATGTCAATGTGCGATGGATG) foram incluídos em cada amostra como controle interno. A extração do DNA no LCR foi repetida quando as amostras da PCR para o gene da Beta2-microglobulina não foram positivas. Foram incluídos como controles negativos a água e também outros controles de pacientes negativos.

Extrações do RNA das amostras de LCR

O RNA foi extraído a partir de 140ul da amostra de LCR, utilizando-se o Biogene Bioclin para extração de DNA/RNA viral (Quibasa, Belo Horizonte/MG), seguindo-se as instruções do fabricante. O volume final obtido foi de 200ul.

Reação de Transcrição reversa (RT) para formação do cDNA

Para a reação de transcrição reversa (RT) nas amostras de RNA extraídas foi utilizado o AccessQuick™ RT-PCR System kit (Promega). A mistura de RT consistiu de 5ul do RNA, 1 unidade (U) da enzima transcriptase reversa (Promega, USA), 12,5ul do Master Mix AccessQuick™ (2x), 1μl do Random primer, 20U do inibidor de ribonuclease (RNaseOUT-Invitrogen, USA) e água suficiente para completar 20ul. A mistura contendo o RNA e a enzima foi incubada a 72°C por 5 minutos. Após a incubação, a mistura foi colocada em banho de gelo e adicionado o master mix, seguindo para uma segunda incubação de 60 minutos a 45°C. Após obtenção do cDNA, este foi armazenado a -20 °C.

PROTOCOLO DE IDENTIFICAÇÃO DE AGENTES CAUSADORES DE INFECÇÃO CONGÊNITA – RASTREAMENTO “TORCHZ”

Os oligonucleotídeos utilizados nas reações de Nested PCR específicos para cada agente causador de infecção congênita estudados, estão descritos

no Anexo 3. Os conjuntos de iniciadores que foram usados para cada região dos herpesvírus (HSV-1, HSV-2, VZV, EBV, CMV), assim como do Parvovírus B-19 e da Toxoplasmose foram escolhidos de acordo com os respectivos autores- (anexo 3).

Já o vírus Zika (ZIKA) foi detectado por método de PCR em Tempo Real (RT-qPCR) e descrito por Lanciotti e colaboradores (anexo 4).

As reações de PCR e N-PCR foram feitas com um volume total de 10µL, contendo 0,5µL de DNA extraído para PCR (e 0,5 µL do produto de PCR para N-PCR), 5,0 mL de GoTaq® Green (Promega, Winchester, EUA), 0,5 µL de cada iniciador e 3,5 µL de água ultrapura. A corrida eletroforética foi realizada com 5,0 µL do material amplificado do N-PCR em gel de agarose 2%, corado com *Unisafe Dye* (Uniscience, Osasco, Brasil) e submetido à eletroforese sob luz ultravioleta para visualização das bandas de DNA/ RNA dos amplicons específicos de cada patógeno.

As reações de PCR em tempo real (*Real-Time PCR*) foram feitas utilizando o *TaqMan™ Fast Advanced* (Applied Biosystem), iniciadores/primers e sondas de hidrólise (sequências já descritas na literatura) sintetizados como PrimeTime qPCR Primers (Integrated DNA Technologies inc., EUA) e os ensaios foram realizados no Sistema *StepOnePlus™ Real-Time PCR* (Applied Biosystem) da seguinte forma: 95°C por 20 segundos, 40 ciclos de 95 °C a 1 segundo e 60 °C durante 20 segundos.

CRITÉRIOS DE INCLUSÃO DE PACIENTES NA PESQUISA

Foram incluídos neste estudo os RNs (de 1 a 28 dias de idade) atendidos na Unidade Neonatal do CAISM, dos quais foi colhido LCR para pesquisa citológica e bioquímica a critério clínico. A amostragem foi selecionada de forma sequencial a partir da existência de amostra de LCR no Laboratório de Líquidos Biológicos do Departamento de Patologia Clínica do Hospital de Clínicas (HC) da Unicamp.

CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO DA PESQUISA

Foram excluídos deste estudo pacientes cujo volume da amostra era insuficiente ($< 400\mu\text{L}$) para realização dos testes e aqueles indivíduos que tinham mais que 28 dias de vida.

COLETA DE DADOS

Os dados dos pacientes foram obtidos nos sistemas do Prontuário eletrônico do CAISM e exames laboratoriais pelos sistemas eletrônicos da Unicamp: CICS-HC e AGHUSE, os quais ofereceram todas as informações cadastrais bem como a requisição e resultados de exames, as datas em que eles foram solicitados, dados de internação, evolução e hipóteses diagnósticas, durante o período de internação do paciente.

ASPECTOS ÉTICOS

Esta pesquisa não ofereceu nenhum risco adicional ao paciente, pois foi utilizado material remanescente da coleta de LCR enviado, para realização de exames citológicos e bioquímicos, ao Laboratório de Líquidos Biológicos do Departamento de Patologia Clínica do Hospital de Clínicas da Unicamp.

Este projeto foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos (CEP) de acordo com as normas previstas na resolução Nº466/12, do Conselho Nacional de Saúde e foi aprovado via Plataforma Brasil-Certificado de Apresentação de Apreciação Ética (CAAE: **86760218.3.0000.5404**).

Após esclarecimento do propósito da pesquisa, foi feito consentimento em participar, mediante assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) por responsáveis pelo menor (Anexo 1).

VARIÁVEIS LABORATORIAIS

Os parâmetros de avaliação de resultados foram baseados na ausência ou presença do genoma estudado.

- i. **NEGATIVO:** ausência do genoma DNA/RNA pesquisado
- ii. **POSITIVO:** presença do genoma DNA/RNA Humano pesquisado

Foram considerados como:

- Resultados falsos negativos ocorrem em pacientes em uso de antivirais ou outras medicações.
- Resultados falsos positivos ocorrem em pacientes que tiveram acidente de punção durante a coleta de LCR, pois os leucócitos contaminantes podem conter vírus latentes e o resultado pode não ser indicativo de infecção ativa onde há replicação viral.
- Resultado negativo não exclui a infecção/ doença, pacientes devem ser monitorizados.

O estudo possuiu caráter qualitativo, com o objetivo de identificar os genomas estudados em uma amostra de LCR com possibilidade de encontrá-los ou não. Devido à especificidade do método em função dos primers que foram desenhados especificamente para cada patógeno, a possibilidade de uma reação cruzada foi reduzida.

VARIÁVEIS DOS DADOS CLÍNICOS E EPIDEMIOLÓGICOS

As variáveis do recém-nascido que foram analisadas eram: sexo, peso e comprimento ao nascer; idade gestacional, idade pós-nascimento, perímetro cefálico, índice de Apgar de 1º. e 5º. minutos, anomalias de qualquer sistema, presença ou não de microcefalia e quaisquer outras intercorrências.

ANÁLISE ESTATÍSTICA

Foi realizada estatística descritiva utilizando medidas de tendência central (média, mediana e frequências) e medidas de dispersão de dados (intervalos de desvio padrão e quartis).

Os dados foram analisados com os softwares SPSS 16.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) e Stata 12.0 (Stata - Statistical Software: Release 12. College Station, TX: StataCorp LP). As variáveis categóricas estão apresentadas em tabelas contendo as frequências absolutas e relativas. Para as variáveis quantitativas determinou-se a média, o desvio padrão, os quartis, os valores mínimo e máximo e as amplitudes máxima e interquartil. Para comparar as distribuições da idade em relação ao sexo empregou-se o teste de Mann-Whitney. Determinou-se a porcentagem de testes positivos para cada reação, com os respectivos Intervalos de confiança de 95%, pelo método exato usando a distribuição Binomial. Para avaliar a associação entre duas variáveis categóricas empregou-se o teste Exato de Fisher ou o teste Exato de Fisher-Freeman-Halton. Em todas as análises adotou-se o nível de significância de 5% ($p = 0,05$).

RESULTADOS

Obtivemos 151 amostras de LCR dos RNs provenientes do CAISM Unicamp, com suspeita de infecção congênita, para pesquisa da presença do genoma dos patógenos TORCHZ, através da utilização de metodologia molecular.

A mediana de idade dos RNs incluídos neste estudo foi de três dias (média de 6,41 dias). Predominaram indivíduos do sexo feminino (53,3%), em relação ao sexo masculino (46,7%); recém-nascidos a termo (59,6%) em relação aos prematuros (40,4%); sendo que do total de 151, apenas 42,4% tiveram baixo peso ao nascer (peso < 2,5Kg)- Tabela 1. Não houve diferença estatisticamente significativa da distribuição da idade em relação ao sexo.

A causa de coleta de LCR mais frequente, Hipótese diagnóstica inicial (HDi), foi sepse (40,4%) e todas as causas, com suas respectivas porcentagens, estão descritas também na Tabela 1.

Tabela 1 - Características dos RNs da Unidade Neonatal do CAISM - Unicamp, com amostras de LCR incluídas neste estudo, de 2017 a 2021

Sexo	N	%
Feminino	80	53,3
Masculino	70	46,7

Idade Gestacional	RN Pré-termo IG < 37 semanas		RN a Termo IG = 37 a 42 semanas	
	N	%	N	%
	61	40,4	90	59,6

Média de idade (dias)	Mediana de idade (dias)	Peso < 2,5 kg ao nascer (%)
6,44	3	42,4%

HDi	N	%
Sepse	61	40,4
Malformações congênitas	20	13,2
Exposição a Sífilis na gestação	42	27,8
Convulsão	19	12,6
Outros	9	6,0

Número total de amostras de LCR de neonatos do CAISM com pesquisa de infecção congênita: 151; HDi: Hipótese Diagnóstica inicial que motivou a coleta do LCR; LCR: líquido cefalorraquidiano; IG: Idade Gestacional; Kg: Quilogramas; RN: recém-nascidos; Outros: Doença exantemática febril na gestação; Restrição de crescimento intrauterino; Coleção subdural parietal bilateral moderada - secundária a atrofia cerebral? - Dilatação ventricular leve; Encefalopatia hipóxico-isquêmica moderada; Desconforto respiratório

Obtivemos, dentre essas 151 amostras de LCR dos RNs do CAISM: 16 amostras positivas, sendo 10,6% de detecção de DNA ou RNA do patógeno no LCR [IC95%: 6,18% – 16,63%]. Das 16 amostras, 15 foram positivas somente para um patógeno e uma foi positiva para dois diferentes patógenos ao mesmo tempo (VZV e B-19). Duas dessas amostras tiveram identificação positiva para HSV-1 (1,3%), quatro amostras foram positivas para VZV (2,6%), uma positiva para CMV (0,67%), duas para Toxoplasmose (1,3%), quatro para Parvovírus B-19 (2,6%) e quatro para o vírus Zika (2,6%). Já os genomas dos patógenos HSV-2 e EBV também foram pesquisados, mas não foram identificados nas amostras incluídas neste estudo.

A Tabela 2 mostra as frequências dos genomas identificados, assim como seus respectivos Intervalos de Confiança de 95%.

Tabela 2- Percentual de positividade das identificações moleculares dos patógenos detectados no LCR dos 151 RNs e Intervalos de Confiança 95%

Patógenos	PCR +	Total	%	IC 95% *
TOXO	2	151	1,3	0,16 – 4,70
HSV-1	2	151	1,3	0,16 – 4,70
VZV	4	151	2,6	0,72 – 6,64
CMV	1	151	0,67	0,02 – 3,63
B-19	4	151	2,6	0,72 – 6,64
ZIKA	4	151	2,6	0,72 – 6,64

N: total= 151 amostras ; HSV-1: Herpes simples tipo 1; VZV: Varicela Zoster; EBV: Epstein-Barr virus; CMV: Citomegalovírus; Toxo: Toxoplasmose; B-19: Parvovírus B-19; Zika: Zika vírus; IC 95%: Intervalo de Confiança 95%; LCR: líquido cefalorraquidiano; RN: recém-nascido; PCR: Nested PCR ou PCR em tempo real; +: Positivo

Dentre as malformações citadas nos prontuários dos pacientes cujo LCR havia sido coletado, tivemos: dois pacientes com Malformação de Arnold Chiari tipo II e outro com Encefalocele occipital e Microcefalia (um de cada positivo para Parvovírus B-19); nove casos de Hidrocefalia (um positivo para Zika vírus); dois casos de Mielomeningocele lombossacra rota e espinha bífida (um positivo para Zika); um gemelar com Cisto occipitocervical, Disrafismo e Ventriculomegalia enquanto seu irmão apresentou Encefalocele occipital; dois pacientes com Macrocrania; sendo no total três casos de Microcefalia (um positivo para Toxoplasmose e o outro para o Parvovírus B-19) - Tabela 3.

Tabela 3 - Malformações Congênicas e patógenos detectados no LCR dos RNs de 2017 a 2021

Tipo de malformação congênita							
	N	HSV-1	VZV	CMV	TOXO	B-19	ZIKA
Hidrocefalia	9	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	1 POS
Microcefalia	3	NEG	NEG	NEG	1 POS	1 POS	NEG
Macrocrania	2	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
Mielomeningocele Lombossacral/Espinha bífida	2	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	1 POS
Malformação de Arnold Chiari Tipo II	2	NEG	NEG	NEG	NEG	1 POS	NEG
Encefalocele Occipital	2	NEG	NEG	NEG	NEG	1 POS	NEG
Cisto Occipitocervical	1	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG

Malformações Congênicas mencionadas nos registros médicos do CAISM e patógenos detectados;
LCR: líquido cefalorraquidiano; RN: recém-nascidos; N total = 151 amostras

Não foi constatada associação entre a positividade dos testes de identificação molecular para os diferentes patógenos e a Hipótese diagnóstica inicial (HDi)- quando analisado cada agente etiológico individualmente.

Dentre o total de 20 pacientes com malformação, tivemos cinco pacientes positivos para algum dos patógenos detectados por PCR. Dentre o total de pacientes com sepse (61), obtivemos cinco positivos para algum dos agentes TORCHZ estudados por PCR (dois positivos para o vírus Zika, dois para Parvovírus B-19, um com coinfeção por VZV e Parvovírus B-19). Dentre o total de 19 pacientes com convulsões, nenhum patógeno foi detectado por técnicas moleculares. Quanto aos pacientes expostos à Sífilis na gestação (42), apenas cinco tiveram PCR positivos (dois para HSV-1, dois para VZV, um para Toxoplasmose). Um outro paciente positivo para VZV teve Diagnóstico inicial de desconforto respiratório.

A avaliação global dos resultados dos testes moleculares em relação aos HDi está apresentada na Tabela 4. Quando avaliada a relação da positividade do teste (para todos os patógenos) com cada HDi individualmente - a proporção de positividade foi maior no grupo que apresentou malformações [25,0% versus 8,4%] - diferença estatisticamente significativa: $p = 0,040$, ou seja, $p < 0,05$. Nos outros grupos de HDIs estudados não houve diferença significativa, porém - (Tabela 4).

Tabela 4- Avaliação dos resultados dos testes moleculares conforme a HDi

HDi	PCR		Total	
	positivo	negativo		
Malformações Congênicas	Sim	5 (25%)	15	20
	Não	11 (8,4%)	120	131
	Total	16	135	151
P= 0,040				
Sepse	PCR		Total	P=0,306
	positivo	negativo		
	Sim	5	56	61
	Não	11	79	90
	Total	16	135	151
	PCR		Total	P=0,102
Convulsões	positivo	negativo		
	Sim	0	19	19
	Não	16	116	132
	Total	16	135	151
	PCR		Total	P=0,474
Exposição à Sífilis na gestação	positivo	negativo		
	Sim	5	37	42
	Não	11	98	109
	Total	16	135	151
	PCR		Total	P=0,645
Outros	positivo	negativo		
	Sim	1	8	9
	Não	15	127	142
	Total	16	135	151
	PCR		Total	

HDi: Hipótese diagnóstica inicial; LCR: líquido cefalorraquidiano; total= 151 amostras;

P = p-valor do teste exato de Fisher unilateral; PCR: Nested PCR ou PCR em tempo real

Quando foi realizada a avaliação global dos resultados dos testes moleculares e diagnósticos em relação aos resultados da citologia e bioquímica no LCR, considerou-se: hiperproteínoorraquia em LCR de RN (proteína > 145mg/dl); pleocitose (leucócitos >30 células/mm³) e, no caso de LCR com presença de hemácias, provavelmente por punção traumática, descontamos: a proporção de 1 leucócito para cada 500 hemácias, e na proteinorraquia, 1 mg para cada 500 hemácias (7). Não foi possível realizar análise da glicorraquia em relação à glicemia, pois na maioria dos prontuários não estava disponível o valor da glicose sérica no momento da punção líquórica.

Portanto, verificou-se que avaliando a positividade dos testes moleculares em relação à proteína no LCR - não houve diferença estatisticamente significativa na porcentagem de PCR positivo em relação à hiperproteínoorraquia- nem globalmente, nem individualmente para cada patógeno. Quando realizada a correlação entre celularidade e positividade dos testes moleculares globalmente e depois individualmente para cada patógeno - não houve diferença na porcentagem de positividade do PCR e pleocitose- (tabela 5).

Feita análise da hiperproteínoorraquia em relação a todas as HDi, avaliados globalmente e individualmente; também não houve diferença na porcentagem de hiperproteínoorraquia em relação a cada HDi (Tabela 5).

Também foi analisada a relação entre celularidade no LCR e cada grupo de diagnóstico: não houve diferença na porcentagem de pleocitose em relação a malformação, sepse, convulsão, exposição a Sífilis na gravidez ou outras causas de coleta de LCR. Estes resultados estão apresentados na tabela 5.

Tabela 5- Avaliação Global do PCR e diagnósticos conforme proteína e citologia

Características do LCR		PCR			P valor
		positivo	negativo	Total	
Pleocitose	Sim	9	68	77	P= 0,423
	Não	6	59	65	
	Total	15	127	142	
PCR					
		positivo	negativo	Total	
Hiperproteinorquia	Sim	13	116	129	P = 0,373
	Não	2	10	12	
	Total	15	126	141	
Diagnósticos	Sepse	Malformação	Convulsões	Exposição à Sífilis	Outros
Hiperproteinorquia	49 (90,7%)	15 (78,9%)	19 (100%)	40 (95,2%)	6 (85,7%)
					P=0,12
Pleocitose	32 (58,2%)	11 (57,9%)	7 (36,8%)	24 (57,1%)	3 (42,9%)
					P= 0,528

LCR: líquido cefalorraquidiano; total= 151 amostras; P = p-valor do teste exato de Fisher

unilateral; PCR: Nested PCR ou PCR em tempo real

Outra análise feita foi a da proteína (bioquímica) com a celularidade (citologia) no LCR: não houve associação entre hiperproteinorraquia e pleocitose também ($p=0,505$: p- valor do teste Exato de Fisher).

ARTIGO 1- submetido à Revista Paulista de Pediatria:

Systematic review on molecular detection of congenital and neonatal infections caused by agents TORCH and SARS-CoV-2 in newborns' cerebrospinal fluid

Congenital neuroinfections by agents TORCH and SARS-CoV-2

Revisão Sistemática sobre Detecção molecular de infecções congênicas e neonatais causadas por agentes TORCH e SARS-CoV-2 no líquido cefalorraquidiano de recém-nascidos

Neuroinfecções Congênicas pelos agentes TORCH e SARS-CoV-2

Suzana Ferreira Zimmerman*(ORCID: 0000-0003-4846-2071); Department of Pediatrics, School of Medical Sciences, State University of Campinas –Unicamp

Sandra Helena Alves Bonon**(ORCID: 0000-0002-0630-5062); ** Laboratory of Virology, School of Medical Sciences, State University of Campinas - Unicamp

Sergio Tadeu Martins Marba*(ORCID: 0000-0003-2903-6915); Department of Pediatrics, School of Medical Sciences, State University of Campinas –Unicamp

Author's contributions

Study design: Suzana Ferreira Zimmerman , Sandra Helena Alves Bonon and Sergio Tadeu Martins Marba

Data collection: Suzana Ferreira Zimmerman and Sandra Helena Alves Bonon

Data analysis: Suzana Ferreira Zimmerman, Sandra Helena Alves Bonon and Sergio Tadeu Martins Marba

Manuscript writing: Suzana Ferreira Zimmerman

Manuscript revision: Sandra Helena Alves Bonon and Sergio Tadeu Martins Marba

Study supervision: Sandra Helena Alves Bonon and Sergio Tadeu Martins Marba

Declaration: Declare that “the database that originated the article is available in an open repository (Prospero) or upon request, with a corresponding author”.

Corresponding author

Name: Suzana Ferreira Zimmerman

Adress: Tessália Vieira de Camargo Street, 126. Barão Geraldo - Campinas – SP- Brazil. CEP: 13083-887).

Phone: 55(19) 3521-7193 / 3521-7082

e-mail: suzanafz@unicamp.br

Conflict of interests: none

Funding: none

Total number of words: texto 2960; resumo 250; abstract 250; referências 29; tabela 1; figura 1.

ABSTRACT

Objective: to verify the use and identify the advantages of molecular methods for congenital infections' diagnosis in cerebrospinal fluid of neonates. **Data source:** We registered into the International Prospective Register of Systematic Reviews - PROSPERO – CRD42021274210. The literature search was performed in databases: PubMed, BVS / BIREME, Scopus, Web of Science, EMBASE, Cochrane Library, PROQUEST, EBSCOhost. The search strategy was carried out from August 2021 to October 2021 and updated in December 2022, respecting checklist by Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses (PRISMA). In selection, the sequence was: 1) Duplicate title removal; 2) Examination of titles and abstracts; 3) Full-text retrieval of potentially relevant reports; 4) Evaluation of the full text potentially qualified study and assessment of the eligibility criteria- by two independent authors. We included: randomized control trials, non-RCTs, longitudinal studies (prospective, retrospective and case-control studies), cross-sectional studies, peer-reviewed and human studies- published in English, Spanish, Italian and Portuguese. Were included studies with newborns up to 28 days old who underwent congenital neuroinfections (by the agents TORCH, Syphilis, Zika, Parvovirus B-19 and SARS-CoV-2), diagnosed by PCR. Two evaluators extracted information: author, year of publication, nationality, subjects, study type, methods, results and conclusion. **Data synthesis:** The most studied pathogen was Herpes Simplex. There are several reports with only nonspecific initial signs, motivating the collection of CSF and performance of PCR to investigation of the causal agent. **Conclusion:** the molecular methods are fast and effective to identify the pathogen in CSF, which can impact the evolution and neurological prognosis.

Key words: “congenital toxoplasmosis” or “congenital Zika syndrome” or “congenital syphilis” or “congenital cytomegalovirus” or “encephalitis herpes simplex virus” or “SARS-CoV-2” and “polymerase chain reaction” and “cerebrospinal fluid”

RESUMO

Objetivo: verificar a utilização e identificar as vantagens dos métodos moleculares para diagnóstico de infecções congênicas no líquido cefalorraquidiano de neonatos. **Fontes de dados:** Realizado Registro Prospectivo Internacional de Revisões Sistemáticas - PROSPERO – CRD42021274210. A busca bibliográfica foi realizada nas bases de dados : PubMed, BVSI/BIREME, Scopus, Web of Science, EMBASE, Cochrane Library, PROQUEST, EBSCOhost. A estratégia de busca foi feita no período de agosto de 2021 a outubro de 2021 e atualizada em dezembro de 2022, respeitando checklist pelo Preferred Reporting Items for Systematic Reviews e Meta-Análises (PRISMA). A sequência de seleção foi: 1) Remoção de títulos duplicados; 2) Exame de títulos e resumos; 3) Recuperação do texto completo de relatórios potencialmente relevantes; 4) Avaliação do texto completo do estudo potencialmente qualificado e avaliação dos critérios de elegibilidade - por dois autores independentes. Foram incluídos: ensaios clínicos randomizados, não ECRs, estudos longitudinais (estudos prospectivos, retrospectivos e de caso-controle), estudos transversais, estudos revisados por pares e estudos em humanos - publicados em inglês, espanhol, italiano e português. Foram incluídos estudos com recém-nascidos de até 28 dias de idade que sofreram neuroinfecções congênicas (pelos agentes TORCH, Sífilis, Zika, Parvovirus B-19 e SARS-CoV-2), diagnosticadas por PCR. Dois avaliadores extraíram informações: autor, ano de publicação, nacionalidade, sujeitos, tipo de estudo, métodos, resultados e conclusão. **Síntese dos dados:** O patógeno mais estudado foi o Herpes Simplex, muitos pacientes oligossintomáticos. **Conclusão:** os métodos moleculares são rápidos e eficazes para identificar o patógeno no LCR, o que pode impactar na evolução e no prognóstico neurológico.

Palavras-chave: “toxoplasmose congênita” ou “sífilis congênita” ou “citomegalovírus congênito” ou “vírus da encefalite herpes simples” ou “Síndrome Congênita de Zika” ou “SARS-COV-2” e “reação em cadeia da polimerase” e “líquido cefalorraquidiano”

INTRODUCTION

The risk of transmission from mother to fetus depends on the type of infection and the time of gestation. Generally, the most severe conditions are acquired in the first trimester of pregnancy. Some of these infections are caused by TORCH agents: Toxoplasmosis, Rubella, Cytomegalovirus, Herpes simplex types 1 and 2 and Other, such as Syphilis, Varicella Zoster, Parvovirus B-19, SARS-CoV-2 and Zika virus.

The consequences of which can be stillbirths, prematurity, uterine growth retardation and congenital malformations. Detection of DNA /RNA in Cerebrospinal fluid (CSF) by molecular methods, such as Polymerase Chain Reaction (PCR), is a marker of the involvement of congenital infection in the nervous system (1-3).

This review **aimed to** verify the use and identify the advantages of molecular methodologies (PCR, Nested-PCR, Real time PCR) to detection of TORCH and Covid-19 pathogens (Toxoplasmosis, Rubella, Cytomegalovirus, Herpes simplex types 1 and 2 and Other, such as Syphilis, Varicella zoster virus, Epstein Barr virus, Parvovirus B-19, Zika and SARS-CoV-2) in CSF of newborns aged from 1 to 28 days old, with suspected congenital infection.

METHODS

This review was registered into the International Prospective Register of Systematic Reviews – PROSPERO – number CRD42021274210.

Data sources and searches

This is a systematic review about congenital infections diagnosed in Nervous System by molecular biology using the PCR technique.

The literature search was performed in the following main databases: PubMed, BVS / BIREME, Scopus, Web of Science, EMBASE, Cochrane Library, PROQUEST, EBSCOhost.

There was no restriction on publication dates. We included published articles in English, Spanish, Italian and Portuguese.

The detection of pathogens' genomes causing TORCH and Covid-19 congenital infections in cerebrospinal fluid by molecular methods were reviewed, using specific descriptors and their synonyms according to the Medical Subject Headings (MeSH) and "*Descritores em Ciências da Saúde*" (DeCS). Search terms were "newborns" or "neonates" and TORCH agents: "congenital syphilis" or "congenital toxoplasmosis" or "varicella-zoster virus encephalitis" or "parvovirus B-19" or "congenital Rubella syndrome" or "congenital cytomegalovirus" or "herpes simplex virus encephalitis" or "Epstein Barr virus infection" or "congenital Zika" or "SARS-Cov-2" or "Covid-19" and "PCR" or "Polymerase Chain Reaction" and "cerebrospinal fluid". In this research, Boolean operators and symbols such as OR and AND were used to make a search string.

The search strategy was carried out from August 2021 to October 2021. Searches were made in English, Portuguese, Italian and Spanish, and no filters were used to the year of publication. The search was updated in December 2022.

Study selection

This review was carried out respecting the checklist criteria described by the Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyzes (PRISMA)

Two independent authors selected the appropriate studies based on the below criteria. A discussion with a third author solved the discordances until the agreement, and consensus reached.

In the studies' selection process, the following sequence was respected: 1) Duplicate title removal; 2) Examination of titles and abstracts; 3) Full-text retrieval of potentially relevant

reports; 4) Evaluation of the full text potentially qualified study and assessment of the eligibility criteria.

Two authors independently screened the studies by title and abstract for potential inclusion in the study. Full-texts of all eligible articles were subsequently reviewed and assessed for eligibility in the study. Disagreement or conflicts between reviewers were resolved by consensus.

Were performed manual searches on the references of the studies included in the final review process. Information on the different phases of the selection process was carried out based on the PRISMA Flow Diagram (Figure 1).

Eligibility Criteria

We considered studies investigating the congenital infection diagnosis using methods of Molecular Biology with Polymerase Chain Reaction technique in cerebrospinal fluid in newborns.

We included studies with: Newborns up to 28 days old who underwent congenital neuroinfections (by the agents TORCH and SARS-CoV-2), diagnosed by PCR.

Were considered randomized controlled trials (RCTs), longitudinal studies (retrospective, prospective, case-control studies), cross-sectional studies, peer-reviewed articles, non-RCTs (such as quasi-randomized controlled trials) and human studies.

Exclusion criteria were: Published abstracts (due to limited information); treatment studies; editorials; commentaries; unpublished manuscripts; guidelines (usually based on non-research evidence, or expert opinions); reviews and systematic reviews; meta-analyses of experimental and controlled observational studies; electronic websites; conference proceedings, dissertations, and research reports; animal studies; case studies and case series. Studies with

newborns up to 28 days old who underwent other diagnosis methodologies of congenital infections by the agents TORCH, or infants aged 29 days and older.

The final decision was after a consensus among all the authors.

Data extraction

Two evaluators performed data extraction and analysis of the selected articles. They extracted necessary information such as authors, year of publication, nationality, study design and type, subjects and more detailed information about molecular methodology for DNA/RNA detection of pathogens TORCH and SARS-CoV-2, causing congenital infections in cerebrospinal fluid, results and conclusion of selected studies.

This data was organized in the Microsoft Office Excel 365 software.

RESULTS - Data synthesis

The data extracted from the articles included in this review can be seen in table 1.

DISCUSSION

Infections in the Central Nervous System of neonates have several possibilities of etiological agents. In the literature, we found that 66% of encephalitis is caused by viruses (27) and 26% of newborns who present convulsions, have it due to some neuroinfection of viral etiology (23).

The differential diagnosis of congenital neuroinfections only by clinical signs is quite difficult, due to the presentation of nonspecific signs in this age group, not pathognomonic of only one specific pathogen (26). It is necessary to identify the pathogen in the cerebrospinal fluid, which can impact the evolution and neurological prognosis of these newborns, since molecular methods are fast and effective for detecting these causal agents by PCR, allowing the early institution of the recommended therapy (29).

We will discuss each pathogen and the studies that investigated it, included in this review, one at a time.

Herpes Simplex

The most frequent among the congenital infections studied in the cerebrospinal fluid that we found in this review was the neuroinfection by Herpes simplex virus (16 of 29 studies included = 55,2%). HSV-1 and 2 were the most isolated pathogens through PCR performed in Neonatal CSF. Acute sporadic encephalitis is most frequently caused by herpes simplex viruses 1 and 2 (1,3, 6, 9) in patients aged 0 to 19 years accounting for about 31% to 50% (15,16). While Herpes Simplex Virus type 1 is normally isolated from adults and children, Herpes Simplex Virus type 2 is detected mainly in newborns (17, 20).

Vertical transmission of the herpes simplex virus (HSV) usually occurs during childbirth as a result of contact with the maternal infectious secretion during passage through the vaginal canal, however it can also occur through the transplacental and postnatal route, but does not contraindicate breastfeeding (23, 26). This predominant mode of transmission in the birth canal should explain why HSV-2 predominated over HSV-1 in newborn CSF (1, 12, 13, 16, 17).

Herpes viruses-1 and 2 can cause different pathologies and establish latent infections and can be reactivated causing lesions that can be located at or near the primary site of infection (26).

About 30% of infected neonates have HSV infection in the Central Nervous System and the symptoms are usually nonspecific, similar to a severe bacterial infection. Skin lesions are an indication of HSV infection, however, 35% of newborns do not manifest this symptom (27). Herpetic encephalitis can have a devastating course: poor prognosis. Approximately 70% of untreated patients die. Meningitis occurs in 10% of cases of primary HSV-2 infection.

In several of these works, there are reports only of nonspecific initial signs (6, 14, 16, 26, 29), while only one of these articles mentioned seizures in more than 50% of the newborns,

motivating the collection of CSF and the performance of PCR to investigation of the causal agent (27).

The detection sensitivity of HSV-1 and 2 in the cerebrospinal fluid of neonates with disease in the Central Nervous System, according to some authors around 70% (23, 24, 26), is consistent with the model of pathogenesis in which encephalitis first occurs before meningitis (27, 29) - which is thought to be neuronal transport to the brain resulting in an initially localized encephalitis prior to involvement of the meninges.

Diagnosis through PCR is of great value to identify the type of herpes virus in cases of herpetic encephalitis, eliminating the need for a biopsy (27).

Varicella zoster

Primary infection with Varicella Zoster (VZV) or Human Herpesvirus (HHV-3) during pregnancy brings significant complications for maternal and fetal health. If the mother acquires varicella infection during the early gestational period (weeks 8 to 20), the fetus is at risk of developing Congenital Varicella Syndrome (3, 15).

Congenital Varicella Syndrome is characterized by an embryofetopathy, which includes cicatricial skin lesions, limb hypoplasia, muscle atrophy, clubfoot, intrauterine growth restriction, microcephaly, cerebellar and cortical atrophy, hydrocephalus, seizures, intracranial and extracranial calcifications (26). With neurological involvement, the following may occur: cerebellar ataxia, usually the first sign of encephalitic involvement; acute myelitis and optic neuritis; polyradiculoneuritis; cerebrospinal fluid with eventual increase in lymphocytic cellularity; meningoencephalitis; seizures.

Among the studies included with molecular analysis of the cerebrospinal fluid by PCR for pathogens that cause congenital infections, there are four that investigated, beyond the presence of Herpes Simplex types 1 and 2, the Varicella Zoster virus (3, 15, 23, 26) and others of the Herpesviridae Family, such as Cytomegalovirus and the Epstein-Barr virus. There were not positive PCR for VZV in CSF samples of neonates.

Epstein-Barr Virus

The Epstein-Barr Virus (EBV) is also called human Herpesvirus 4, whose transmission can occur through saliva but also through the transplacental route (vertical transmission). In the first trimester of pregnancy, it can infect the fetus, causing a syndrome with several congenital anomalies (micrognathia, cryptorchidism and cataracts), hypotonia, thrombocytopenia, persistent monocytosis, proteinuria and metaphysitis at birth.

It was investigated in studies with research of several pathogens of the Herpesviridae Family, through Molecular Biology, in the CSF of neonates (3,15, 26). None of these newborns were positive for EBV in PCR.

Cytomegalovirus

Cytomegalovirus (CMV) is the Herpes Virus 5 that is usually found in the urine and saliva of infected people, intermittently, but can also be found in the cerebrospinal fluid, as well as in the mucus of the uterine cervix, semen, feces and breast milk. Therefore, it can be transmitted sexually, non-sexually and also vertically (from mother to child). It is known as the most frequent cause of congenital infections in the world (3, 5, 10, 11, 15, 24, 26).

Perinatal infection is asymptomatic in the vast majority of full-term newborns (10). However, it may be associated with clinical conditions of varying severity, such as the “sepsis-like” syndrome, cholestasis, thrombocytopenia, neutropenia and pneumonitis, when it affects preterm newborns weighing less than 1.500g and/or gestational age of less than 32 weeks (11, 15).

The involvement of the Central Nervous System must be evaluated with special attention. In this work, seven studies were found with identification of this pathogen in CSF, through PCR - 24.1% among the 29 articles included in the review (3, 5, 10, 11, 15, 24, 26).

Syphilis

Syphilis is a systemic infection caused by the spirochete *Treponema pallidum*, which is of particular concern during pregnancy due to the risk of transplacental infection. Congenital

infection is associated with several adverse outcomes. When *Treponema pallidum* invades the Central Nervous System (CNS), it can cause varied clinical conditions, from alterations in CSF in asymptomatic patients, to more serious conditions such as progressive general paralysis (18,19).

Molecular tests would show better results than serological tests with a sensitivity of 91% for diagnosing Syphilis. However, due to their high cost and complexity to perform, they are not widely distributed to routine laboratories (such as the serological, treponemal and non-treponemal tests - used in clinical practice, due to a growing prevalence of this condition in pregnant women), being the PCR limited to research centers (21). This review included three articles with CSF analysis identifying treponema by molecular tests (18, 19, 21). In two of these studies (18, 19), presumptive cases of congenital syphilis with positive Western Blot IgM results were found. Of these, only some had CSF with positive PCR for *Treponema*. These observations confirmed that prenatal syphilis screening facilitates treatment during pregnancy and reduces the risk of mother-to-child transmission. In addition, the use of IgM Western Blot and careful examination of CSF allowed the identification and treatment of high-risk newborns. In these studies, PCR was less sensitive because it detected fewer cases than sorologic tests (18,19, 21).

In another study, only 35% of the infected infants had positive CSF PCR (21). On the other hand, 13 of 14 children with positive CSF PCR tests (93%) had positive serum IgM immunoblotting results, suggesting that a positive CSF PCR result indicates true infection (specificity).

Most children with *T. pallidum* infection of the CNS can be identified by physical examination, standard laboratory tests, and radiographic studies. However, identifying all these children requires the use of tests including IgM immunoblotting and PCR.

Toxoplasmosis

Toxoplasmosis is a disease caused by the protozoan *Toxoplasma gondii* that has a wide geographic distribution and high serological prevalence, up to 60% of the population in

certain countries (2). Congenital toxoplasmosis is installed when the mother acquires an acute infection during pregnancy and the consequences for the fetus will depend on factors such as strain virulence, ability of maternal antibodies to defend the fetus, degree of exposure of the fetus and period of gestation (4). Statistical data indicate that the frequency is higher in pregnant women who already have positive serology (25). In this review, three studies analyzing this agent were identified (2, 4, 25).

A study have demonstrated that the REP-529 sequence is superior to other regions in identifying the DNA in CSF for toxoplasmosis, using molecular tests, and suggests that this region be adopted as part of the standardization of the PCR assay (2).

In another study, in 134 cases (119 negative samples and 15 positive samples), there was good agreement between the diagnostic methods of Toxoplasmosis (98.5%). The higher sensitivity of the RE-LC assay has been confirmed (4).

PCR was positive in CSF in 27/58 infected infants for an overall CSF sensitivity of 46.5%. Sensitivity varied by age group and in the 0 to 30 days group it was 60%. In newborns of mothers who were not treated for toxoplasmosis during pregnancy, CSF PCR can contribute to the early confirmation of the diagnosis of congenital toxoplasmosis, especially in those with clinical signs (25).

Parvovirus B19

Transmission of Parvovirus B19 occurs through secretions from the respiratory system or vertical transmission. This occurs in 30% of cases of maternal infection, the risk of transplacental transmission is highest in the first and second trimesters of pregnancy.

Laboratory tests such as immunoglobulins IgG research are extremely necessary, especially when the mother has a rash. However, there are cases of asymptomatic infections that do not exclude transmission to the fetus. In this review, an article was found analyzing the CSF of 29 neonates by PCR for this pathogen, but there was no positive sample (26).

Zika Virus

Zika virus is an arbovirus that belongs to the Flaviviridae family. In 2015, the circulation of the Zika virus (ZIKV) in Brazil was confirmed, as well as the etiological agent causing acute exanthematous disease, in addition to microcephaly in newborns who had acquired this infection through the vertical route (7,8). Other signs of this congenital infection (calcifications, ventriculomegaly and cortical development disorder) made up the Congenital Zika Syndrome (28), whose epidemic was established since 2015 and by the end of 2016, 2.205 cases were confirmed (7,8).

In this review, three articles (7, 8, 28) are included, with identification of the Zika virus as a pathogenic agent of the Central Nervous System, through PCR in CSF.

Mothers of newborns with microcephaly (cases) had more serological markers of previous Zika virus infection compared to mothers of controls (without microcephaly), although mothers in both groups were PCR negative (8). Among newborns, 33 of 91 cases (35%) and none of the 173 of the control infants had laboratory-confirmed Zika virus infection. Laboratory and imaging were available for 79 of 91 (87%) of the cases: 10/23 (43%) tested positive for Zika virus and had brain abnormalities; 13 were positive for Zika virus infection but had no brain abnormalities, while 11/56 (20%) were negative for Zika virus but had brain abnormalities. The association between microcephaly and Congenital Zika Virus infection has been confirmed (8).

In another study, maternal-fetal transmission appears to occur in approximately 1/4 of exposed fetuses and is associated with adverse fetal and early neonatal outcomes in 1/3 of infected fetuses: fetal loss or severe signs of Congenital Zika Syndrome (28).

SARS-CoV-2

In this review, were found one study in which all patients who met the criteria of the Centers for Disease Control and Prevention (CDC) for confirmed COVID-19 infection were

included, being patients with a positive SARS-CoV-2 RNA amplification test via nasopharyngeal swab, and who underwent lumbar puncture in the same admission (22).

CSF was often abnormal, as they showed elevated white blood cell and protein counts in 44% and 52% of patients, respectively. Among patients diagnosed with SARS-CoV-2, CSF results changed treatment decisions in more than a third of the patient cohort studied: 10/27 (37%) of patients, either by changing antibiotics, influencing therapeutic decision or for providing an alternative diagnosis. The qRT-PCR in the CSF for SARS-CoV-2 was performed in 8/27 (30%) patients, with negative results in all samples. More studies are needed to define whether CSF SARS-CoV-2 PCR is recommended in certain clinical settings (22).

CONCLUSION

The diagnosis through PCR is relevant to identify the pathogen of congenital neuroinfection, the most studied was Herpes Simplex as the cause of encephalitis, eliminating the need for biopsy.

The main advantage of Molecular Biology is to reduce the time to detect an infectious agent, avoiding the period of immunological window. Thus, it becomes more effective compared to immunological methods.

References:

1. Anderson, N. E.; Powell, K. F.; Croxson, M. C. A polymerase chain reaction assay of cerebrospinal fluid in patients with suspected herpes simplex encephalitis. *Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry* - Volume 56, Issue 5, pp. 520-5, 1993.
2. Belaz, S.; Gangneux, J. P.; Dupretz, P.; Guiguen, C.; Robert-Gangneux, F. A 10-year retrospective comparison of two target sequences, REP-529 and B1, for *Toxoplasma gondii* detection by quantitative PCR. *Journal of Clinical Microbiology* - Volume 53, Issue 4, pp. 1294-1300, 2015.
3. Bhaskaran, A.; Racska, L.; Ger, R.; Southern, P.; Cavuoti, D.; Alatoom, A. Interpretation of positive molecular tests of common viruses in the cerebrospinal fluid. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* - Volume 77, Issue 3, pp. 236-240, 2013.
4. Cassaing, S.; Bessi res, M. H.; Berry, A.; Berrebi, A.; Fabre, R.; Magnaval, J. F. Comparison between two amplification sets for molecular diagnosis of toxoplasmosis by real-time PCR. *Journal of Clinical Microbiology* - Volume 44, Issue 3, pp. 720-4, 2006.
5. Czech-Kowalska, J.; Jedlińska-Pijanowska, D.; Kasztelewicz, B.; Kłodzińska, M.; Pietrzyk, A.; Sarkaria, E.; Dunin-Wąsowicz, D.; Gradowska, K.; Niezgoda, A.; Gruszczyński, D.; Dobrzańska, A. The Limitations of Cytomegalovirus DNA Detection in Cerebrospinal Fluid of Newborn Infants With Congenital CMV Infection: A Tertiary Care Neonatal Center Experience. *The Pediatric Infectious Disease Journal* - Volume 40, Number 9, pp.838-45, 2021.
6. Davis, Kara L.; Shah, Samir S.; Frank, Gary; Eppes, Stephen C. Why are young infants tested for herpes simplex virus? *Pediatr Emerg Care* - Volume 24, Issue 10, 673-8, 2008.
7. de Araújo, Thalia Velho Barreto; Rodrigues, Laura Cunha; de Alencar Ximenes, Ricardo Arraes; de Barros Miranda-Filho, Demócritio; Montarroyos, Ulisses Ramos; de Melo, Ana Paula Lopes; Valongueiro, S; de Albuquerque, Maria de Fátima Pessoa Militão; Souza, Wayner Vieira; Braga, Cynthia; Filho, Sinval Pinto Br o; Cordeiro, Marli Tenório; Vazquez, Enrique; Di Cavalcanti Souza Cruz, Danielle; Henriques, Cláudio Maierovitch Pessanha; Bezerra, Luciana Caroline Albuquerque; da Silva Castanha, Priscila Mayrelle; Dhalia, Rafael; Marques-J nior, Ernesto Torres Azevedo; Martelli, Celina Maria Turchi. Association between Zika virus infection and microcephaly in Brazil, January to May, 2016: preliminary report of a case-control study. *Lancet Infectious Disease* - Volume 16, Issue 12, pp. 1356-63, 2016.
8. de Araújo, T. V. B.; Ximenes, R. A. D. A.; Mir a-Filho, D. D. B.; Souza, W. V.; Montarroyos, U. R.; de Melo, A. P. L.; Valongueiro, S.; de Albuquerque, M. D. F. P. M.; Braga, C.; Filho, S. P. B.; Cordeiro, M. T.; Vazquez, E.; Cruz, D.D.C.S.; Henriques, C. M. P.; Bezerra, L. C. A.; Castanha, P. M. D. S.; Dhalia, R.; Marques-Júnior, E. T. A.; Martelli,

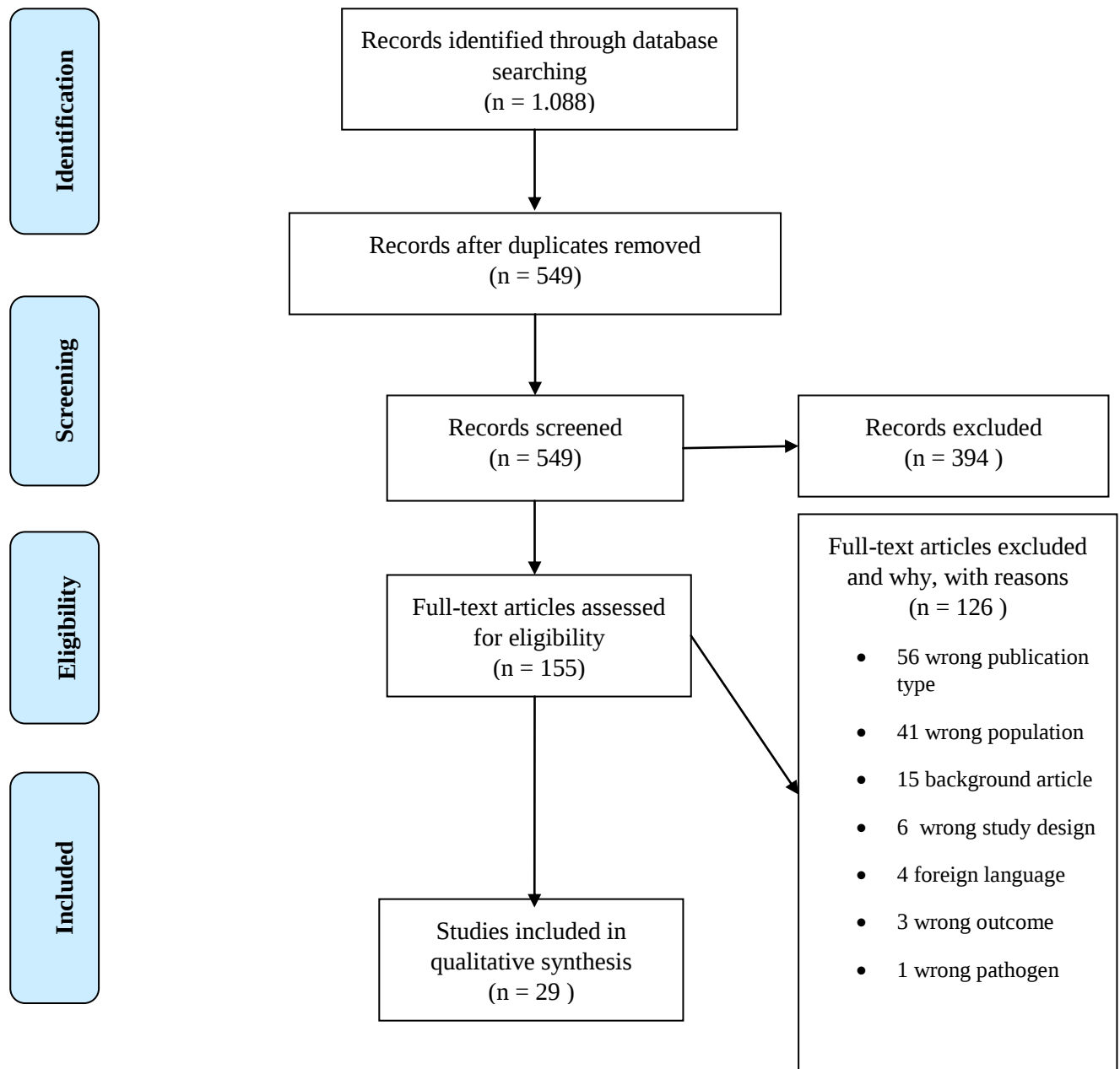
- C. M. T.; Rodrigues, L. C.; Dhalia, C.; Santos, M.; Cortes, F.; Kleber de Oliveira, W.; Evelim Coelho, G.; Cortez-Escalante, J. J.; Campelo de Albuquerque de Melo, C. F.; Ramon-Pardo, P.; Aldighieri, S.; Mendez-Rico, J.; Espinal, M.; Torres, L.; Nassri Hazin, A.; Van der Linden, A.; Coentro, M.; Santiago Dimech, G.; Siqueira de Assuncao, R.; Ismael de Carvalho, P.; Felix Oliveira, V. Association between microcephaly, Zika virus infection, and other risk factors in Brazil: Final report of a case-control study. *Lancet Infectious Disease* Volume 18, pp. 328-36, 2017.
9. Diamond, C.; Mohan, K.; Hobson, A.; Frenkel, L.; Corey, L. Viremia in neonatal herpes simplex virus infections. *The Pediatric Infectious Disease Journal* - Volume 18, Issue 6, pp. 487-9, 1999.
 10. Goycochea-Valdivia, W. A.; Baquero-Artigao, F.; Del Rosal, T.; Frick, M. A.; Rojo, P.; Echeverría, M. J.; Noguera-Julian, A.; Bringué, X.; Saavedra-Lozano, J.; Vives-Oñós, I.; Moliner, E.; Cilleruelo, M. J.; Cuadrado, I.; Colino, E.; Castells, L.; Tagarro, A.; Vilas, J.; Soler-Palacin, P.; Blázquez-Gamero, D. Cytomegalovirus DNA Detection by Polymerase Chain Reaction in Cerebrospinal Fluid of Infants With Congenital Infection: Associations With Clinical Evaluation at Birth and Implications for Follow-up. *Clinical Infectious Diseases*. 2017 May 15; 64 (10):1335-42. doi: 10.1093/cid/cix105.
 11. Halwachs-Baumann, G.; Genser, B.; Pailer, S.; Engele, H.; Rosegger, H.; Schalk, A.; Kessler, H. H.; Truschnig-Wilders, M. Human cytomegalovirus load in various body fluids of congenitally infected newborns. *Journal of Clinical Virology*, vol 25, pg 81-7, 2002.
 12. Hanson, K. E.; Alex, er, B. D.; Woods, C.; Petti, C.; Reller, L. B. Validation of laboratory screening criteria for herpes simplex virus testing of cerebrospinal fluid. *Journal of Clinical Microbiology*, vol 45, issue 3, pg 721-4, 2007.
 13. Jeyanthi, J. C.; Ong, I.; Guan. Epidemiology and Outcome in Neonatal and Pediatric Herpes Simplex Encephalitis: A 13-Year Experience in a Singapore Tertiary Children's Hospital. *Journal of Pediatric Infectious Diseases- Vol 1*, issue 1, 16-21, 2015.
 14. Kawada, J. I.; Kimura, H.; Ito, Y.; Hoshino, Y.; Tanaka-Kitajima, N.; Ando, Y.; Futamura, M.; Morishima, T. Comparison of real-time and nested PCR assays for detection of herpes simplex virus DNA. *Microbiology and Immunology*, vol 48, issue 5, 411-5, 2004.
 15. Kleines, M.; Scheithauer, S.; Schiefer, J.; Häusler, M. Clinical application of viral cerebrospinal fluid PCR testing for diagnosis of central nervous system disorders: A retrospective 11-year experience. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, vol 80, issue 3, 207-15, 2014.
 16. Kurtz, J; Anslow, P. Infantile herpes simplex encephalitis: diagnostic features and differentiation from non-accidental injury. *Journal of Infection*, vol 46, issue 1, 12-6, 2003.

17. Malm, G.; Forsgren, M. Neonatal herpes simplex virus infections: HSV DNA in cerebrospinal fluid and serum. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed.* Vol 81, issue 1, pp. F24-9, 1999.
18. Marangoni, A.; Moroni, A.; Tridapalli, E.; Capretti, M. G.; D'Antuono, A.; Biagi, M.; Ruscello, S.; Savioli, F.; Cevenini, R. Congenital syphilis surveillance. *Microbiologia Medica*, Vol. 26 (2), pp.108-11, 2011.
19. Marangoni, A.; Moroni, A.; Tridapalli, E.; Capretti, M. G.; Farneti, G.; Faldella, G.; D'Antuono, A.; Cevenini, R. Antenatal syphilis serology in pregnant women and follow-up of their infants in northern Italy. *Clinical microbiology and infection*- vol 14, issue 11, PP. 1065-8, 2008.
20. Melvin, A. J.; Mohan, K. M.; Schiffer, J. T.; Drolette, L. M.; Magaret, A.; Corey, L.; Wald, A. Plasma and cerebrospinal fluid herpes simplex virus levels at diagnosis and outcome of neonatal infection. *Journal of Pediatrics*- vol 166, issue 4, pp 827-33, 2015.
21. Michelow, Ian C.; Wendel, George D.; Norgard, Michael V.; Zelay, Fiker; Leos, N. Kristine; Alsaadi, Rajiha; Sánchez, Pablo J. Central nervous system infection in congenital syphilis. *N England J Med*- vol 346, issue 23, PP 1792-8, 2002.
22. Miller, E. H.; Namale, V. S.; Kim, C.; Dugue, R.; Waldrop, G.; Ciryam, P.; Chong, A. M.; Zucker, J.; Miller, E. C.; Bain, J. M.; Willey, J. Z.; Doyle, K.; Boehme, A.; Claassen, J.; Uhlemann, A. C.; Thakur, K. T. Cerebrospinal Analysis in Patients with COVID-19. *Open Forum Infectious Disease*- vol 7, issue 11, 2020.
23. Mustonen, K.; Mustakangas, P.; Uotila, L.; Muir, P.; Koskiniemi, M. Viral infections in neonates with seizures. *Journal of Perinatal Medicine*- vol 31, issue 1, pp 75-80, 2003.
24. Norero Vega, Ximena. Infecciones virales en neonatos febriles con sepsis clínica. Hospital del Niño. Panamá Diciembre 2013-2014. *Pedátric Panamá*- vol 44, issue 2, pp 12-22, 2015.
25. Olariu, Tudor R.; Remington, Jack S.; Montoya, Jose G. Polymerase chain reaction in cerebrospinal fluid for the diagnosis of congenital toxoplasmosis. *Pediatric Infectious Disease*- Vol 33, issue 6, PP 566-70, 2014.
26. Parisi, S. G.; Basso, M.; Del Vecchio, C.; Andreis, S.; Franchin, E.; Bello, F. D.; Pagni, S.; Biasolo, M. A.; Manganelli, R.; Barzon, L.; Palù, G. Virological testing of cerebrospinal fluid in children aged less than 14 years with a suspected central nervous system infection: A retrospective study on 304 consecutive children from January 2012 to May 2015. *Eur J Paediatr Neurol* vol 20, issue 4, pp 588-96, 2016.
27. Petel, Dara; Barton, Michelle; Renaud, Christian; Ouchenir, Lynda; Brophy, Jason; Bowes, Jennifer; Khan, Sarah; Bitnun, Ari; McDonald, Jane; Boisvert, Andrée-Anne; Ting, Joseph; Roberts, Ashley; Robinson, Joan L. Enteroviral and herpes simplex virus central nervous system infections in infants < 90 days old: a Paediatric Investigators' Collaborative Network on Infections in Canada (PICNIC) study. *BMC Pediatrics* – vol 20, issue 0, pp 1-10, 2020.

28. Pomar, L.; Vouga, M.; Lambert, V.; Pomar, C.; Hcini, N.; Jolivet, A.; Benoist, G.; Rousset, D.; Matheus, S.; Malinger, G.; Panchaud, A.; Carles, G.; Baud, D. Maternal-fetal transmission and adverse perinatal outcomes in pregnant women infected with Zika virus: Prospective cohort study in French Guiana. *BMJ* (online) – vol 363, pp, 2018.
29. Schleede, L.; Bueter, W.; Baumgartner-Sigl, S.; Opladen, T.; Weigt-Usinger, K.; Stephan, S.; Smitka, M.; Leiz, S.; Kaiser, O.; Kraus, V.; Van Baalen, A.; Skopnik, H.; Hartmann, H.; Rostasy, K.; Lücke, T.; Schara, U.; Häusler, M. Pediatric herpes simplex virus encephalitis: A retrospective multicenter experience. *Journal of Child Neurology* – vol 28, issue 3, pp 321- 31, 2013.



Figura 1- PRISMA Flow Diagram



From: Moher D, Liberati A, Tetzlaff J, Altman DG,

The PRISMA Group (2009). Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses:

The PRISMA Statement. PLoS Med 6(7): e1000097. doi:10.1371/journal.pmed1000097

For more information, visit www.prisma-statement.org

Table 1- Data synthesis from the articles included in the Review

First Author, Year	Country	Subjects	Study type	Methods	Results and Conclusion
Anderson, N.E. 1993 (1)	New Zealand	Patients with clinical diagnosis of possible HSV encephalitis (n= three newborns)	Longitudinal Prospective	detection of HSV DNA with PCR assay in CSF	HSV1 in 15 (none neonates), HSV2 in four patients (three newborns). PCR is a highly specific test for herpes simplex encephalitis
Belaz, S. 2015 (2)	France	76 samples (four CSF) of 56 patients: 41 suspicious Congenital Toxoplasmosis	observational longitudinal retrospective	During the study period, routine PCR diagnosis from 2003 to 2013. All positive samples were reanalyzed with both gene targets in the same PCR. All samples from proven congenitally infected infants.	PCR positive for Toxoplasmosis in CSF the diagnosis of toxoplasmosis by PCR and suggest that region should be adopted as part of the standardization

Table 1- Data synthesis from the articles included in the Review

First Author, Year	Country	Subjects	Study type	Methods	Results and Conclusion
Bhaskaran, A. 2013 (3)	USA	N= 1663 patients with PCR HSV, VZV, EBV, CMV	longitudinal retrospective	Chart Review between january 01st , 2009 and december 31th, 2011 Positive predictive value was calculated collectively and individually for each virus.	detection of viral DNA PCR positive: none of them were newborns. considered “Definite true positive” and ‘Likely true positive” as true positives
Cassaing, S. 2006 (4)	France	prenatal and neonatal diagnosis toxoplasmosis patients	prospective study	Between June and October 2003, all samples for suspicion of toxoplasmosis were tested	136 clinical samples: six CSF . PCR method: 134/136 (98,5%)-agreement between two methods) -119 negative and 15 positive samples.The sensitivity of the assay was confirmed in positive clinical samples, including CSF (n=3) improved the performance of the diagnosis of toxoplasmosis

Table 1- Data synthesis from the articles included in the Review

First Author, Year	Country	Subjects	Study type	Methods	Results and Conclusion
Czech-Kowalska, J. 2021 (5)	Poland	N= 216 completed lumbar puncture: 168	Observational retrospective and prospective	A cohort of infants diagnosed with cCMV were collected retrospectively between 2012 and 2015 and prospectively between 2016 and 2019, to evaluate a diagnostic value of the positive CSF-CMV-PCR in congenital CMV	216 congenital CMV : 181 lumbar puncture- 168 PCR in CSF: 145 negative (6 asymptomatic, 139 with some symptoms); 23 positive for CMV (all symptomatic) CSF positive: higher CNS damage rate (abnormal MRI, severe hearing loss)-needs more studies, very low prevalence positive PCR for CMV)

Table 1- Data synthesis from the articles included in the Review

First Author, Year	Country	Subjects	Study type	Methods	Results and Conclusion
Davis, K. L. 2008 (6)	USA	infants 0 to 60 days 88 cases and 83 controls	Retrospective case-control study	to identify the factors that to include HSV PCR in evaluation of young infants undergoing lumbar puncture 88 infants had CSF HSV testing by PCR between January1, 1999 and December 31, 2004	HSV infection was diagnosed in four (4,5%) of 88 cases and in no controls: (three in CNS) - HSV in CSF was diagnosed by PCR in 3.4% of cases. Features traditionally associated with neonatal HSV infection, such as elevated numbers of CSF white blood cells or red blood cells, did not appear to influence the decision. A seizure, the performance of CSF enteroviral PCR testing, and the decision to obtain hepatic transaminases were independently associated with the decision to perform CSF HSV PCR testing testing in this population was low. Clinicians should weigh the benefits of early diagnosis in a few patients against the consequences of excessive testing in this population

Table 1- Data synthesis from the articles included in the Review

First Author, Year	Country	Subjects	Study type	Methods	Results and Conclusion
de Araújo, T. V. B. 2016 (7)	Brazil	32 case patients and 62 control patients were identified. Mean age: 12 days Cases were neonates with microcephaly. Two controls (neonates without microcephaly), matched by expected date of delivery and area of residence, were selected for each case.	case-control study	Between Jan 2016 and May 2016 Serum samples of cases and controls and CSF samples of cases were tested for Zika virus-specific IgM and by quantitative RT-PCR. Laboratory-confirmed Zika virus infection during pregnancy was defined as detection of Zika virus-specific IgM or a positive RT-PCR result in neonates. Maternal serum samples were tested by plaque reduction neutralisation assay for Zika virus and dengue virus.	24/30 (80%) mothers of cases had Zika virus infection compared with 39 (64%) of 61 mothers of controls: 13/32 (41%) 32 cases and none of 62 controls had laboratory-confirmed Zika virus infection: 11/27 RN cases investigated by brain imaging: with brain abnormalities. Microcephaly epidemic is a result of congenital Zika virus infection. We await further data from this ongoing study to assess other potential risk factors and to confirm the strength of association in a larger sample size.

Table 1- Data synthesis from the articles included in the Review

First Author, Year	Country	Subjects	Study type	Methods	Results and Conclusion
de Araújo, T. V. B. 2017 (8)	Brazil	173 controls were live neonates without microcephaly and without brain abnormalities (determined from transfontanellar ultrasonography) and without major birth defects. 91 Cases— neonates with microcephaly (livebirths or stillbirths)— had head circumferences at least 2 SD smaller than the mean for their sex and gestational age on the Fenton growth chart Two controls, matched by expected date of delivery and area of residence, were selected for each case	case-control study	Between Jan 2016 and Nov 2016 Serum samples of cases and controls and CSF samples of cases were tested for Zika virus-specific IgM and by quantitative RT-PCR. Laboratory-confirmed Zika virus infection during pregnancy was defined as detection of Zika virus-specific IgM or a positive RT-PCR result in neonates. Maternal serum samples were tested by plaque reduction neutralisation assay for Zika and Dengue virus	32/91 (35%) confirmed Zika infection: PCR e/ou positive IgM Laboratory / imaging available for 79/91 (87%) cases: 10/23 (43 %) positive for Zika virus and had cerebral abnormalities, 13 were positive for Zika infection but had no cerebral abnormalities, and 11/56 (20%) were negative for Zika virus but had cerebral abnormalities The association between microcephaly and congenital Zika virus infection was confirmed. Evidence of the absence of an effect of other potential factors, such as exposure to pyriproxyfen or vaccines during pregnancy, confirming the findings of an ecological study of pyriproxyfen in Pernambuco and previous studies on the safety of Tdap vaccine administration during pregnancy

First Author, Year	Country	Subjects	Study type	Methods	Results and Conclusion
Diamond, C. 1999 (9)	USA	in 11 consecutive cases of neonatal HSV infection Mean age: 10 days	Descriptive transversal	HSV DNA were submitted from at least 1 specimen site. (among them, cerebrospinal fluid) in 11 consecutive cases of neonatal HSV infection	7 /11(64%) had HSV 2 disease and 4/11 (36%) had HSV 1 infection four (36%) had SEM and CNS disease, two (18%) had disseminated infection and 1/11 (9%) had localized CNS disease.; one infant had only CSF submitted. HSV DNA was detected by PCR in the CSF of 4/11 tested (36%) recommend PCR testing of plasma, PBMC and CSF from all neonates with suspected HSV infection.

Table 1- Data synthesis from the articles included in the Review

First Author, Year	Country	Subjects	Study type	Methods	Results and Conclusion
Goycochea-Valdivia, W. A. 2017 (10)	Spain	Newborns with cCMV and a lumbar puncture performed within 30 days of life and before antiviral treatment	multicenter, retrospective, observational study, from January, 2011 until November, 2015	Symptoms of cCMV were evaluated at birth and at 6 months of age. Symptomatic infection at birth was defined by the presence of thrombocytopenia, petechiae, jaundice, hyperbilirubinemia, elevated alanine aminotransferase levels (>80 IU/L), hepatomegaly, splenomegaly, neurological symptoms (hypotonia, seizures, paresis, or weak suck), chorioretinitis, small for gestational age, microcephaly, SNHL, or neuroimaging abnormalities in cranial ultrasound or magnetic resonance imaging (MRI)	136 neonates were included in the study: 21 (15.4%) with positive CSF hCMV-PCR and 115 (84.6%) with negative 17 patients (81%) in the positive group were symptomatic at birth compared with 52.2% of infants in the negative group. Only 4 asymptomatic newborns (6.8%) had a positive CSF hCMV-PCR . A positive hCMV-PCR result in CSF is associated with symptomatic cCMV and SNHL at birth

First Author, Year	Country	Subjects	Study type	Methods	Results and Conclusion
Halwachs-Baumann, G. 2002 (11)	Austria	of 30 children with CMV congenital infection (hCMV IgM in cord vein blood and/or maternal serum), 14 had clinical symptoms and/or pathological laboratory results and 16 had none of them at birth	case-control study	Cord vein blood, urine and CSF of congenitally hCMV-infected children were investigated and hCMV load was determined by quantitative PCR. Ganciclovir was given to 21 children (10 of them with symptoms, 11 of them without symptoms). Viral load before and after therapy was measured	PCR in CSF: 8/27 positive Virus load in CSF was always found to be less than 400 copies/ml, and only those children with symptoms showed a positive result. hCMV virus load in cord vein blood was significantly lower than in urine. The hCMV virus load in urine seems to reflect organ involvement and effect of therapy best. Only hCMV detection in the CSF appears to be promising to predict neurologic outcome.
Hanson, K. E. 2007 (12)	USA	patients an age of <2 years, a CSF white blood cell count of >5 cells/mm ³ , or a protein level of >50 mg/dl	retrospective	specimens were pooled and tested retrospectively. Electronic medical records were also reviewed.	of the 1,296 HSV PCR tests performed : 33 (2.5%) were positive for HSV DNA (7 for HSV-1 and 26 for HSV-2)- 1 newborn of each pathogen, 1,213 were negative, 50 not available PCR in CSF should be used judiciously and based on the probability of particular pathogens in the given clinical context, CSF values, seasonality, and host immune status

First Author, Year	Country	Subjects	Study type	Methods	Results and Conclusion
Jeyanthi, J. C 2015 (13)	Singapura	Patients with HSE during November 1998 to December 2011 were identified .	retrospective	HSE was proven by culture or PCR or HSV specific intrathecal antibody: We identified 13 patients during the study period: nine neonates and four older children, all of whom were treated with intravenous acyclovir	In the neonatal cohort, three (33%) presented with seizures and only four (44%) had vesicles. The initial CSF HSV PCR was positive in seven (78%) and HSV- 2 was the most common. Repeat CSF study showed HSV positivity of 100%. Two (22%) neonates died and three of the seven survivors (43%) had long-term neurodevelopmental sequelae. Developmental delay, focal neurological deficit and cognitive deficit were among the most frequent neurological sequelae noted. Early CSF studies may be negative in HSE, so a repeat CSF analysis should be considered, particularly in neonates. Early administration of acyclovir could prevent adverse outcomes in HSE

Table 1- Data synthesis from the articles included in the Review

First Author, Year	Country	Subjects	Study type	Methods	Results and Conclusion
Kawada, J. I. 2004 (14)	Japan	Patients suspected of having neonatal HSV infection ou HSV encephalitis	prospective	real-time PCR assay to detect herpes simplex virus (HSV) DNA, and compared it prospectively with a nested PCR assay in 164 clinical samples (109 CSF) from patients suspected of HSV infection or HSV encephalitis	In 25/164 samples, HSV DNA was detected by the nested PCR assay. All samples positive for HSV DNA in the nested PCR assay were also positive in the real-time PCR assay, and all but 2 samples negative for HSV DNA in the nested assay were negative in the real-time assay. The real-time PCR assay thus had a sensitivity of 100% and a specificity of 99%, when compared with the nested assay. Sequential assays in a case of disseminated HSV showed that a decrease in HSV DNA paralleled clinical improvement. Quantification of HSV DNA by real-time PCR was useful for diagnosing and monitoring patients with HSV encephalitis and neonatal HSV infection (Higher viral load in neonates)

Table 1- Data synthesis from the articles included in the Review

First Author, Year	Country	Subjects	Study type	Methods	Results and Conclusion
Kleines, M. 2014 (15)	German	100 newborns	retrospective	retrospective analysis of CSF PCR data of 481 pediatric patients, including HSV, VZV, EBV, CMV - between 2001 and 2012	positive Neonates: only CMV detected 4% (1/25) the detection CMV strongly indicates symptomatic viral CNS disease. Secondary viral reactivation mostly underlies positive EBV. Their detection does not rule out clinical impact but recommends searching for additional underlying conditions.

Table 1- Data synthesis from the articles included in the Review

First Author, Year	Country	Subjects	Study type	Methods	Results and Conclusion
Kurtz, J 2003 (16)	United Kingdom	12 RN (<28 days) infants with HSE recently diagnosed by PCR, from wide range of British hospitals	retrospective	Screening of CSF samples sent HSV PCR analysis, from wide range of British hospitals, identified HSV infected infants. After a diagnosis made, the case notes and neuroradiology (where available) were reviewed, between October 1996 and May 1999, and a limited follow-up was undertaken.	12 infants had HSV encephalitis (HSE), which in 4 followed a relapsing course. On subsequent assessment 6 infants had neurological sequelae, six appeared to be normal, and one was lost to follow-up. Neither a history of primary HSV infection in pregnancy, nor skin lesions in the baby, were helpful diagnostically. Magnetic resonance imaging indicated haemorrhage in the cortex, but no subdural haematomata, a hallmark of non-accidental injury (NAI), in 5/6 infants. As the early clinical features of both HSE and NAI may be similar, both CSF and neuroradiology examination for HSV DNA should be undertaken in all small children with unidentified encephalopathic illnesses.

Table 1- Data synthesis from the articles included in the Review

First Author, Year	Country	Subjects	Study type	Methods	Results and Conclusion
Malm, G. 1999 (17)	Sweden	36 children with neonatal HSV infections, diagnosed between 1973 and 1996, were examined using PCR	retrospective	CSF from 36 children with verified neonatal HSV infections, diagnosed between 1973 and 1996, examined using PCR	seven children had HSV-1 and 29 HSV-2 infection. Neonatal disease was classified as disseminated in 6 children, and CNS form in 29 the presence of HSV DNA in CSF and serum has increased the possibility of a rapid diagnosis and treatment of neonatal HSV CNS infections. The analysis of both specimens seems to enhance the diagnostic sensitivity.

Table 1- Data synthesis from the articles included in the Review

First Author, Year	Country	Subjects	Study type	Methods	Results and Conclusion
Marangoni, A. 2011 (18)	Italy	165 RN de 151 mães IgM+: 15 mãe não tratadas tiveram 9 RN infectados infants Born to syphilis seropositive mothers in a prospective follow up with + RPR at birth	prospective surveillance	CSF analysis (VDRL and PCR), from November 2000 through June 2010 All pregnant women during pregnancy and at delivery were screened for syphilis. Positive samples were further analysed by TPHA and RPR tests. Western Blot (WB) was also performed. Infants born to syphilis seropositive mothers were enrolled in a prospective follow up. At birth, tests were performed (including IgM WB). Infants with positive RPR tests at birth, born to mothers not adequately treated received also a complete CSF analysis, including VDRL and PCR. All seroreactive infants received careful follow up examinations and serological testing at 0, 3, 6, 9, 12 months or until the tests became negative	9 cases of congenital syphilis with IgM western blot positive results were found. 4 Newborns: positive CSF These observations confirmed that antenatal syphilis screening facilitates treatment during pregnancy and offsets vertical transmission; moreover, the use of IgM western blot and careful CSF examination allowed the identification and treatment of high-risk newborns.

Table 1- Data synthesis from the articles included in the Review

First Author, Year	Country	Subjects	Study type	Methods	Results and Conclusion
Marangoni, A. 2008 (19)	Italy	133 infants Born to 119 syphilis seropositive mothers (0,49% of the 24053 pregnant women delivering)	prospective	six presumptive cases of congenital syphilis with IgM western blot positive results were analysed CSF, from November 2000 through July 2007	six newborns: IgM found two infants had a CSFpositive: VDRL; one with PCR positive in CSF These observations confirmed that antenatal syphilis screening facilitates treatment during pregnancy and offsets vertical transmission; moreover, the use of IgM western blot and careful CSF examination allowed the identification and treatment of high-risk newborns.

Table 1- Data synthesis from the articles included in the Review

First Author, Year	Country	Subjects	Study type	Methods	Results and Conclusion
Melvin, AJ 2015 (20)	USA	All infants , during the neonatal period between the years 1993 and 2012, with at least one HSV DNA PCR result from either CSF, plasma or both were included	retrospective	Clinical and virologic data were abstracted by medical record review from neonatal HSV cases treated at Seattle Children's Hospital between 1993 and 2012.	HSV infection (n=63) had HSV PCR positive results from CSF (n=56) or both CSF and plasma (n=40) at the time of diagnosis; infants -18 (29%) had CNS and 19 (30%) had DISseminated disease Plasma HSV levels correlate with clinical presentation of neonatal HSV disease and mortality, but not neurologic outcome. HSV DNA detection by PCR in the CSF of neonates with CNS disease in our cohort was around 70%-pathogenesis in which encephalitis first occurs before there is meningitis

Table 1- Data synthesis from the articles included in the Review

First Author, Year	Country	Subjects	Study type	Methods	Results and Conclusion
Michelow, I.C 2002 (21)	USA	148 infants were prospectively enrolled if they were born between July 1989 and July 1999, their mothers had had syphilis during pregnancy, their evaluation for congenital syphilis included a lumbar puncture, and there was sufficient cerebrospinal fluid for tests	prospective	PCR of serum or blood and CSF; testing of the cerebrospinal fluid to detect <i>T. pallidum</i> infection of the central nervous system in infants born to mothers with syphilis. The results were compared with those of clinical, radiographic, and conventional laboratory evaluations	<i>T. pallidum</i> detected in CSF in 17/76 infants (22%) who had no prior antibiotic exposure. These 17 infants included 41 % (16/39) of those with some abnormality on clinical, laboratory, or radiographic evaluation; 60 % (15 / 25) of those with abnormal physical examination that were consistent with congenital syphilis; and 41% (17/41) of those with a positive result on IgM or PCR of serum, blood or CSF. CNS infection was best predicted by IgM of serum or PCR of serum or blood. Only 35 % of these infants had positive CSF PCR. 13/14 infants with positive CSF PCR (93 %) had positive results on serum IgM, suggesting a positive CSF PCR result indicates true infection. Most infants with <i>T. pallidum</i> infection of the SNC can be identified by physical examination, conventional laboratory tests, and radiographic studies. However, the identification of all such infants requires the use of additional tests, including IgM and PCR

First Author, Year	Country	Subjects	Study type	Methods	Results and Conclusion
Miller, E. H.; 2020 (22)	USA	patients admitted to New York Presbyterian–Columbia Irving Medical Center between March 1, 2020, and May 26, 2020. All patients with a positive SARS-CoV-2 RNA amplification test (via nasopharyngeal swab) who underwent lumbar puncture during the same admission were included	retrospective	review patients diagnosed with SARS-CoV-2 undergoing lumbar puncture (LP) admitted to Columbia University Irving Medical Center (New York,) from March 1 to May 26, 2020. In a subset of patients, CSF SARS-CoV-2 quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction (qRT-PCR) was done	CSF profiles showed elevated white blood cell counts and protein in 44% and 52% of patients, respectively. LP results impacted treatment decisions in 10/27 (37%) patients, either by change of antibiotics, influence in therapeutic decision, or by providing an alternative diagnosis. CSF SARS-CoV-2 qRT-PCR was performed on 8/27 (30%) patients, with negative results in all samples. Among patients diagnosed with SARS-CoV-2, CSF results changed treatment decisions or disposition in over one-third of our patient cohort. CSF was frequently abnormal, though CSF SARS-CoV-2 qRT-PCR was negative in all samples. Further studies are required to define whether CSF SARS-CoV-2 testing is warranted in certain clinical contexts.

Table 1- Data synthesis from the articles included in the Review

First Author, Year	Country	Subjects	Study type	Methods	Results and Conclusion
Mustonen, K.; 2003 (23)	Finland/ United Kingdom	Neonates with seizures of unknown origin, between January 1, 1995 and December 1997, born at North Karelia Central Hospital	prospective	Serum CSF samples of 50 neonates were studied for antibodies to 13 different microbes by enzyme immunoassay, and CSF samples were investigated for three specific nucleic acids by PCR: HSV-1 e 2, VZV . For viral cultures throat, stool and CSF samples were obtained.	CNS viral infection was suggested in 13 of the 50 neonates (26%). HSV2 specific DNA was found in one child. In one child (of the 2 with CMV in urine) was found evident pleocytosis in the CSF. The incidence of CNS viral infections in association with neonatal seizures may be much higher than previously reported
Norero, X. 2015 (24)	Panama	All febrile newborns with suspicion of sepsis between December 2013 and June 2014, at the Del Niño's Hospital	prospective descriptive	PCR of CSF, sent to the Department of Virology for HSV and CMV.	60 infants: 4,7% were admitted for observation due to sepsis - 15% of cases of enterovirus infection, 2% of cases of CMV infection and no cases of HSV infection (PCR of CSF) Viral PCR in newborns with sepsis not only allows adequate and timely management of cases but also results in less hospital expenses (less hospital stay) and rational use of antibiotics

Table 1- Data synthesis from the articles included in the Review

First Author, Year	Country	Subjects	Study type	Methods	Results and Conclusion
Olariu, T. R. 2014 (25)	USA	The infants ranged in age from 0 to 180 days	retrospective	PCR in CSF for diagnosis of congenital toxoplasmosis. Studied both congenitally infected (diagnosed clinically and serologically) and noninfected infants born to untreated mothers- between september1993 and november 2005	PCR was positive in CSF sensitivity varied by age group; 0–30 days = 60% VPP e especificidade: 100% infants born to mothers who have not been treated for toxoplasmosis during gestation, CSF PCR can contribute to the early confirmation of the diagnosis of congenital toxoplasmosis particularly in those with clinical signs

Table 1- Data synthesis from the articles included in the Review

First Author, Year	Country	Subjects	Study type	Methods	Results and Conclusion
Parisi, S. G. 2016 (26)	Italy	CSF from 68 newborns	retrospective	Between January 2012 and May 2015, CSF from 304 children were tested with an in-house real-time PCR method	PCR: the mean number of tests performed in patients who showed a viral infection was significantly higher with respect to that reported in negative samples. HSV-DNA was performed on almost all samples (97% of all). Only three children (1%) were positive, all aged more than 30 days. None positive for Pvb19 / EBV/ VZV/ CMV. All children were immunocompetent The detection rate of a possible viral aetiology in CSF in our cohort is low, probably because it was an unselected cohort but this feature is also of value to the study, which describes the diagnostic approach in clinical practice

Table 1- Data synthesis from the articles included in the Review

First Author, Year	Country	Subjects	Study type	Methods	Results and Conclusion
Petel, D. 2020 (27)	Canada	enrolled hospitalized infants younger than 90 days of age	cross-sectional retrospective study	Seven paediatric academic centres within the Paediatric Investigators Collaborative Network on Infections in Canada (PICNIC) - infants with microbiologically confirmed CNS infection (proven to be due to r HSV with PCR in CSF, from January 01, 2013 through December 31, 2014.	7/174 CNS infections HSV (4%). All HSV cases presented before 21 days of age. 4 HSV cases (57%) had seizures. Three (43%) HSV cases lacked cerebrospinal fluid (CSF) pleocytosis. HSV cases were more likely to require ICU admission, present with seizures and have extra-CNS disease (Unfavorable outcome occurred more likely following HSV than EV infection) Proven viral CNS infections appear to be more common than proven bacterial infections in the first 90 days of life. Age younger than 21 days and presence of seizures or extra-CNS involvement are clues to HSV infection, even in the absence of CSF pleocytosis. However, not all infants with CNS HSV have seizures.

Table 1- Data synthesis from the articles included in the Review

First Author, Year	Country	Subjects	Study type	Methods	Results and Conclusion
Pomar, L 2018 (28)	French Guiana	Pregnant women at any stage of pregnancy with a laboratory confirmed symptomatic or asymptomatic Zika virus infection during the epidemic period in French Guiana. The cohort enrolled 300 participants and prospectively followed their 305 fetuses/newborns	prospective	From January to July, 2016 Main outcome measures: Rate of maternal-fetal transmission of Zika virus (fetal and neonatal CSF); clinical, biological, and RX outcomes (blindly reviewed); and adverse outcomes defined as moderate signs potentially related to congenital Zika syndrome (CZS), severe complications compatible with CZS, or fetal loss. Associations between a laboratory confirmed congenital Zika virus infection and adverse fetal/neonatal outcomes were evaluated.	Positive Zika virus results were obtained from 4/7 (57%) CSF. Maternal-fetal transmission: 26% (76/291) of fetuses/newborns. Among the Zika virus + fetuses/newborns, 45% (34/76) no signs/complications at birth, 20% (15/76) moderate signs potentially related to CZS, 21% (16/76) severe complications of CZS, and 14% (11/76) fetal loss. Compared with the Zika virus positive fetuses/neonates, those that were identified as negative for Zika virus (215/291) were less severe complications (5%; 10/215) or fetal loss (0.5%; 1/215). Association between a +Zika virus test and any adverse fetal/neonatal outcome was also significant (The population attributable fraction estimates that a confirmed congenital Zika virus infection contributes to 47% of adverse outcomes and 61% of severe adverse outcomes observed). Maternal-fetal transmission seems to occur in approximately 1/4 of exposed fetuses and is associated with early adverse fetal/neonatal outcomes in 1/3 of infected fetuses

Table 1- Data synthesis from the articles included in the Review

First Author, Year	Country	Subjects	Study type	Methods	Results and Conclusion
Schleede, L.; 2013 (29)	German	The total study group of 38 patients was divided into 6 neonatal cases (female 4, male 2; median age 12 days; range 2-18 days)	retrospective and prospective	combined pro- and retrospective survey, 38 patients with HSV encephalitis deriving from 12 pediatric units. Six neonates and 32 children diagnosed by PCR (n = 37) or serological studies (n = 1), respectively	37 patients: a PCR positive for HSV in CSF (all six neonates) ; one patient positive by serologic findings confirm the difficulty to diagnose HSV encephalitis because of its nonspecific early symptoms. Early outcome was better than expected. Consider HSV encephalitis in patients with nonspecific, clinical complaints, and in children with normal CSF studies

CSF: cerebrospinal fluid; PCR: Polymerase chain reaction; HSV: Herpes simplex virus 1 and 2; CMV: cytomegalovirus; CZS: congenital Zika syndrome; CNS: Central Nervous System; LP: Lumbar Puncture; SEM: skin-eye-mouth disease by HSV-1 and 2; PvB-19: Parvovirus B-19

ARTIGO 2:**Diagnosis by molecular biology of congenital and neonatal infections in the cerebrospinal fluid of Unicamp's CAISM newborns**

PCR diagnosis of congenital neuroinfections in newborn

Suzana Ferreira Zimmerman[1]; *Rodrigo Gonçalves de Lima*[2]; *André Moreno Morcillo*[1]; *Sandra Helena Alves Bonon*[2]; *Sergio Tadeu Martins Marba*[1]

[1]: *Departamento de Pediatria, Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas –Unicamp*

[2]: *Laboratório de Virologia, Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas - Unicamp*

Corresponding author : Suzana Ferreira Zimmerman - e-mail: suzanafz@unicamp.br

ORCID:

Suzana Ferreira Zimmerman: <https://orcid.org/0000-0003-4846-2071>

Rodrigo Gonçalves de Lima: <https://orcid.org/0000-0002-9345-9931>

André Moreno Morcillo: <https://orcid.org/0000-0002-2088-972X>

Sandra Helena Alves Bonon: <https://orcid.org/0000-0002-0630-5062>

Sergio Tadeu Martins Marba: <https://orcid.org/0000-0003-2903-6915>

ABSTRACT

Background: The risk of infection's transmission from mother to fetus depends on the pathogen; TORCH agents cause some neuroinfections: toxoplasmosis, rubella, cytomegalovirus, Herpes simplex 1 and 2, and others (Varicella-zoster, Parvovirus B-19, Epstein-Barr virus and Zika virus). The consequences can be stillbirths, prematurity, uterine growth restriction, and congenital malformations. Detection of DNA/RNA from CSF by molecular methods is a marker of the involvement of congenital infection in the central nervous system. This study aimed to identify the frequency of these pathogens in CSF samples from newborns (1 to 28 days old) at CAISM Unicamp, using PCR and its clinical consequences. **Methods:** a prospective descriptive study with molecular analysis of 151 CSF samples from neonates, collected for cytological and biochemical diagnosis, from 2017 to 2021. After these results and consent of the responsables, the leftover material was sent to Virology Laboratory/FCM Unicamp and submitted to DNA/RNA extraction and Nested-PCR/ RT-PCR. A review of patients' medical records and descriptive statistics were performed. This work was approved by the Ethics Committee (CAAE: 86760218.3.0000.5404). **Results:** were obtained 151 CSF samples, 16 of which were positive (10.6% [95% CI%: 6,18% – 16,63%]). Two of these were PCR positive for HSV-1 (1.3%), four positives for VZV (2.6%), one for CMV (0.67%), two for Toxoplasmosis (1.3%), four for Parvovirus B-19 (2.6%) and four for Zika (2.6%). The proportion of positive PCR is higher in the group that presented malformations [25.0% vs 8.4%], $p = 0.040$. **Conclusion:** This association suggests the clinical relevance of etiological diagnosis by molecular biology.

Key Words: newborn; congenital Toxoplasmosis; Cytomegalovirus Infections; Zika virus infection; polymerase chain reaction; cerebrospinal fluid.

INTRODUCTION

Infections caused by viruses, bacteria, or protozoan can be transmitted from the mother to the fetus or newborn and cause signs and symptoms in them. The disease can be transmitted in the prenatal period through the hematogenous and transplacental route or at the time of delivery and postnatal by contact with blood, vaginal secretions, or breast milk¹.

The risk of transmission from mother to fetus depends on the infection type and the gestational trimester. Usually, the most severe conditions are acquired in the pregnancy's first trimester. As a consequence of this infectious process, embryo resorption, abortion, stillbirth, congenital malformations, prematurity, intrauterine growth restriction (IUGR), acute disease of the newborn (NB) in the uterus or postpartum, persistent asymptomatic infection in the neonatal period with neurological sequelae can occur².

Some of these infections come from TORCH pathogens: Toxoplasmosis, Rubella, Cytomegalovirus (CMV), Herpes simplex types 1 and 2 (HSV-1 and 2), and others, such as Varicella zoster (VZV), Epstein-Barr virus (EBV), Parvovirus B-19, Zika virus, and Syphilis. The acronym TORCH is well known in the neonatal/perinatal medicine field, and since 2016, it has been suggested to add the letter Z (TORCHZ) referencing congenital Zika virus infection³. Detection of DNA/RNA in cerebrospinal fluid (CSF) by polymerase chain reaction (PCR) is a marker of congenital infection in the nervous system².

In this study, we aimed to identify the primary pathogens causing congenital infection in CSF samples of newborns (NB) with suspicion of these infections, cared at the Hospital da Mulher Professor Doutor José Aristodemo Pinotti – from the Centro de Atenção Integral à Saúde da Mulher (CAISM), Campinas/SP, through the use of

molecular methodology. In addition, another goal was to identify the clinical picture and congenital malformations present in patients carrying TORCHZ's pathogens by evaluating the medical records of newborns suspected of congenital infections from CAISM of Universidade Estadual de Campinas (Unicamp).

METHODS

This study was prospective descriptive type: CSF samples were studied from neonates (1 to 28 days) with suspected congenital infection attended at the Neonatal Unit of CAISM from 2017 to 2021. The samples were sent for cytological and biochemical research, requested for clinical conduction of the case, to the Laboratory of Biological Fluids of the Department of Clinical Pathology of Unicamp's Hospital de Clínicas. The remaining material was stored in a freezer at -20 degrees Celsius and sent to the Virology Laboratory of the Faculdade de Ciências Médicas (FCM), Unicamp, where they were stored in a freezer at -80°C.

The study did not request additional collections, offering no harm to patients. This work was approved by the Ethics Committee on Research in Human Beings (CEP) following the standards outlined in resolution N°466/12 of the National Health Council. It was approved via Plataforma Brasil (CAAE: 86760218.3.0000.5404).

Once thawed, the CSF was subjected to DNA and RNA extraction and was used for molecular analysis on the presence of the studied pathogens' genomes. Next, the polymerase chain reaction (PCR) and Nested-PCR were performed, and for the Zika virus, a real-time PCR (RT-qPCR) was done.

The sample's DNA was extracted from 200µl of CSF using BIOPUR's Mini Spin Plus kit, following the manufacturer's guidelines. The volume obtained was 200 µl. To

monitor the presence of inhibitors, Beta2-microglobulin gene primers (F: GGTGTCTTGAGGCTCAGGGAG; R: CAACTTCAATGTCAATGTCGATGGATG) were included in each sample as a control. DNA extraction was repeated when PCR samples for the Beta2-microglobulin gene were not positive. The sample's RNA was extracted from 140 µl of the CSF sample using the SV Total RNA Isolation System. The volume obtained was 200 µl. The Access Quick ® RT-PCR System kit (Promega) was used for the reverse transcription (RT) reaction. Then, the cDNA was obtained and stored at -20 °C.

PCR and NPCR were performed with a total volume of 10 µl, containing 0.5 µL of DNA extracted for PCR (and 0.5 µL of PCR product for NPCR), 5.0 mL of GoTaq® Green (Promega, Winchester, USA), 0.5 µL of each primer and 3.5 µL of ultrapure water. The electrophoretic analysis was performed with 5.0 µL of the amplified material of the NPCR in 2% agarose gel, stained with *Unisafe Dye* (Uniscience, Osasco, Brazil) and subjected to electrophoresis under ultraviolet light to visualize the DNA/RNA bands of the specific amplicons of each pathogen.

Real-time PCR was performed using *TaqMan™ Fast Advanced* (Applied Biosystem), primers, and hydrolysis probes (sequences already described in the literature) synthesized as PrimeTime qPCR Primers (Integrated DNA Technologies Inc., USA). The tests were performed in the System (Applied Biosystem) StepOnePlus™ *Real-Time PCR*: 95 °C by 20 seconds, 40 cycles of 95 °C at 1 second, and 60 °C for 20 seconds.

The variables of the newborns collected from the medical records were gender, age, gestational history of the mother and neonatal (weight, head circumference, and length at birth; gestational age, Apgar score at 1st and 5th minutes, anomalies of any

system, presence or absence of microcephaly and any other complications), with corresponding complementary exams and clinical evolution: initial diagnostic hypothesis, cytological and biochemical results of routine CSF exams, with records of proteins, glucose, red blood cells and leukocytes; in addition to the following: bacterioscopy and culture of CSF samples. This information was described using absolute values (n), prevalences, and percentages, as well as descriptive statistical results, for example, median and expected values.

The variables were studied descriptively in the statistical analysis using SPSS 16.0 software (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) and Stata 12.0 (Stata - Statistical Software: Release 12. College Station, TX: Stata Corp LP). Categorical variables are presented in tables containing absolute and relative frequencies. The mean, standard deviation, quartiles, minimum and maximum values, and maximum and interquartile amplitudes were determined for the quantitative variables. The Mann-Whitney test was used to compare age distributions regarding gender. The percentage of positive tests for each reaction was determined – with the respective 95% confidence intervals – by the exact method using the Binomial distribution. Fisher's exact test or Fisher-Freeman-Halton exact test was used to evaluate the association between two categorical variables. The significance level of 5% was adopted for all analyses.

RESULTS

Were obtained 151 CSF samples from CAISM Unicamp's newborns with suspected congenital infection to investigate the presence of TORCH pathogens.

The median age of the NB included in this study was three days, and the average was 6.41 days. Females predominated (53.3%) - Table 1. There is no statistically significant difference in the distribution of age regarding gender.

The most frequent causes of CSF collection were: sepsis (61 samples = 40.4% of the total); congenital malformation (20 = 13.2%), among which microcephaly (3 samples = 2.0%); seizures (19 = 12.6%); exposure to syphilis during pregnancy (42 = 27.8%) and others, such as respiratory distress, febrile exanthematous disease during pregnancy, neonatal death, a mother with CMV+, moderate hypoxic-ischemic encephalopathy, intrauterine growth restriction, hypertonic syndrome, hyperexcitability syndrome - Table 1.

Among these 151 CSF samples from CAISM neonates, we obtained positive results in 16 of all evaluated samples (10.6% detection of pathogen DNA or RNA in cerebrospinal fluid [95% CI: 6.18% – 16.63%]. Out of the 16 samples, 15 were positive for only one PCR reaction, and one was positive for two PCR reactions (VZV and Parvovirus B-19). Two of these samples had positive PCR for HSV-1 (1.3%), four samples were positive for VZV (2.6%), one positive for CMV (0.7%), two for toxoplasmosis (1.3%), four for Parvovirus B-19 (2.6%) and four for Zika virus (2.6%) – the frequencies of positive PCR for HSV1, VZV, HCMV, TOXO, B19 and Zika are presented in Table 2.

There is no association between positive PCR and diagnostic groups in the different agents (for each pathogen alone). This means that it cannot be said that there is a statistically significant difference between the percentage of positive PCR for each pathogen individually between the diagnostic groups. The PCR reactions of HSV-2, EBV were all negative.

Among the malformations mentioned in the medical records of patients whose CSF had been collected, we have two patients with Arnold Chiari Type II malformation and another with occipital encephalocele and microcephaly (one of each positive for Parvovirus B-19); nine cases of hydrocephalus (one positive for Zika virus); one case of lumbosacral myelomeningocele (positive for Zika); one twin with occipitocervical cyst, dysraphism, and ventriculomegaly while his brother had occipital encephalocele; two patients with macrocrania; three cases of microcephaly (one positive for Toxoplasmosis and other positive for Parvovirus B-19)- Table 3.

The global evaluation of PCR reactions regarding the diagnostic groups is presented in Table 4. The proportion of positive PCR (for all pathogens) was higher in the group that showed malformations [25.0% versus 8.4%] - statistically significant difference: $p = 0,040$, ($p < 0,05$). When this relation of positive PCR was evaluated with each diagnosis individually, there was no difference in the percentage of positive PCR and seizure, sepsis, or syphilis exposure, nor with other causes (respiratory distress, febrile exanthematous disease in pregnancy, neonatal death, mother with CMV+, moderate hypoxic-ischemic encephalopathy, intrauterine growth restriction, hypertonic syndrome, hyperexcitability Syndrome)- Table 4.

In the biochemistry analysis in CSF, we considered hyperproteinorachia $> 145\text{mg/dL}$; hypoglycorrachia would depends on serum glucose values (to which we did not have access in most cases) - it was not possible to perform glycorrachia analysis regarding glycemia, because, in most medical records, the value of serum glucose at the time of CSF puncture was not available.

In the cytology analysis in CSF: pleocytosis were considered when leukocytes >30 cells/mm³; and in case of CSF with the presence of red blood cells, probably by

traumatic puncture, we discounted: the proportion of 1 leukocyte for every 500 red blood cells, and in proteinorachia, 1 mg for every 500 red blood cells.

When performing the global assessment of PCR reactions concerning protein in CSF, there was no statistically significant difference in the percentage of positive PCR and hyperproteinorrhachia - neither globally (Table 5) nor individually for each pathogen. Hyperproteinorrhachia analysis was performed regarding diagnoses: there was also no difference in the percentage of hyperproteinorrhachia regarding diseases: sepsis, seizure, malformation, syphilis exposure, or other causes.

When crossing between cellularity and positive PCR globally and individually for each pathogen, there was no difference in the percentage of positive PCR and pleocytosis- Table 5.

The relation between CSF cellularity and each diagnostic group was also analyzed. There was no difference in the percentage of pleocytosis regarding each diagnostic group: malformation, sepsis, seizure, syphilis exposure, or other causes (Table 5).

Another analysis was protein (biochemistry) with cellularity (cytology) in CSF: there was no association between proteinorachia and pleocytosis either ($P=0,505$: P - Fisher's exact test value).

Regarding the samples included in the study, we could not verify positive PCR for syphilis since we could not obtain positive control for this pathogen.

DISCUSSION

The first thing to consider is that it is impossible to define the diagnosis of congenital infections based only on signs and symptoms in pregnant women and even

by maternal serological results since infection may not have generated an immune response in the body.

In addition, the signs and symptoms of congenital infections are very similar, depending considerably on the gestational age at which the fetus was infected, that is, on the fetal organs and systems that were being developed at that time, in addition to the pathogenic capacity of the microorganism and the genetic predisposition of the host.

Thus, the use of molecular methods to diagnose the congenital and neonatal infections investigated in this study in newborn patients undergoing CSF collection was proper, as it offered an overview of the most frequent infectious diseases found in CAISM neonates included in this evaluation.

The original concept of TORCH infections consisted of infections with similar presentations: Toxoplasmosis, Rubella, Cytomegalovirus, and Herpes simplex. However, others are described, such as Parvovirus B-19, Varicella zoster, Epstein-Barr virus, Syphilis, and more recently, Zika virus^{3,4}.

In some cases, intrauterine infection may be suspected based on laboratory results obtained during pregnancy, such as positive serology for Toxoplasmosis. In the absence of suggestive maternal laboratory results, intrauterine infection may be suspected in newborns with specific clinical manifestations including fetal dropsy, microcephaly, seizures, cataracts, hearing loss, congenital heart disease, hepatosplenomegaly, jaundice, rash, and thrombocytopenia⁵.

These findings are not restricted to TORCHZ infections. Some of the above signs may occur in other diseases (e.g., enterovirus encephalitis) and conditions other than intrauterine infection (e.g., inborn errors of metabolism, Rh blood group mismatch). Thus, the entire clinic, including maternal history and exposures, should be considered when evaluating a child for congenital infection⁵.

Lumbar puncture (LP) for the study of cerebrospinal fluid (CSF) in newborns is a standard procedure, as it is part of the neonates with sepsis investigation to verify the existence of associated meningitis. However, the symptomatology is often not specific, making early diagnosis difficult⁶.

Changes in the composition of CSF may indicate the presence of infections that affect the CNS and can cause irreversible damage and even death. Lumbar puncture targets these pathologies, facilitates diagnosis, and reduces deaths of hospitalized newborns, especially those admitted to Neonatal Intensive Care Units⁷.

We obtained two positive samples for Toxoplasmosis (1.3%), one patient with microcephaly of unknown cause (until this N-PCR result was obtained), and another with exposure to syphilis in pregnancy, which motivated CSF collection.

Congenital Toxoplasmosis is one of the most severe forms of the disease, which generally causes symptoms framed within Sabin's Tetrad, in which the fetus has chorioretinitis (90% of cases), brain calcifications (69%), neuropsychomotor development restriction (60%) and cranial volume changes with macro or microcephaly (50% of cases)^{8,9}, as presented by one of the positive patients in our sample.

Herpes Simplex types 1 and 2: two HSV-1 positive samples were obtained. The reason for CSF collection was exposure to syphilis in pregnancy in both HSV-1 positive samples.

However, there was no detection of NB with HSV-2 in CSF, which is inconsistent with the literature¹⁰, that describes vertical transmission from contamination with infected maternal secretion in the vaginal canal as the most frequent (HSV-2 is defined as more prevalent than HSV-1 in the CSF of newborns).

Vertical transmission of the herpes simplex virus (HSV) usually occurs during childbirth due to contact with infectious secretion through the vaginal canal. However, it can still happen by the transplacental and postnatal route¹¹.

Pathogens of the Herpesviridae family cause infections that affect the Nervous System, presenting neurotropism, either by hematogenous dissemination or neuronal transmission^{12,13}.

About 30% of neonates have HSV infection in the Central Nervous System, and the symptoms are usually nonspecific¹⁴⁻¹⁶.

Four samples were positive PCR for Varicella Zoster (VZV). The initial reason for collection was infectious screening in 50% of cases, one for respiratory distress and the other for exposure to syphilis in pregnancy.

If the mother develops chickenpox during the early gestational period (weeks 8 to 20), the fetus is at risk of developing Congenital Chickenpox Syndrome^{17,18}, with intrauterine growth restriction, microcephaly, cerebellar and cortical atrophy, hydrocephalus, convulsions, intra and extracranial calcifications. These symptoms were not found in patients positive for this pathogen in our sample.

The literature has documented vertical transmission of Epstein-Barr Virus, although which is rare, it can occur in the first trimester of gestation: infection of the fetus can lead to a syndrome with various congenital anomalies (micrognathia, cryptorchidism, and cataracts), hypotonia, thrombocytopenia, persistent monocytosis, proteinuria, and metaphysitis¹⁸. However, all CSF samples from neonates included in this study had negative PCR results for this pathogen.

Although the literature cites Cytomegalovirus (CMV) as the most frequent cause of congenital infection¹⁹⁻²³, this was not found in this sampling: only one CSF sample with positive PCR was taken from a patient with suspected meningitis.

Positive PCR in CSF of neonates with clinical symptoms of CNS infection at birth is described as the most common¹⁹. Congenital CMV infection is a significant public health problem due to the high risk of late adverse consequences in both symptomatic and asymptomatic children at birth. Approximately 0.5% to 1% of newborns are estimated to be infected with CMV due to congenital infection^{19,20,21}.

In Brazil, in the city of Ribeirão Preto, São Paulo, the prevalence of congenital infection by CMV was estimated at 1%. Approximately 10% to 15% of infected children show clinical signs at birth.

Symptomatic newborns with CMV neuroinfection at birth usually have a poor prognosis. About 90% may evolve with neurological sequelae and 50% to 70% with bilateral and profound sensorineural deafness²². Lethality in symptomatic newborns with severe systemic involvement in the neonatal period can range from 5% to 10%²³.

Four samples had DNA detection of Parvovirus B-19 in the CSF of neonates: two with suspected sepsis and two with congenital malformation in the CNS: one with occipital encephalocele and microcephaly, another with Arnold Chiari Malformation Type II/Lumbar spina bifida with hydrocephalus.

Vertical transmission occurs in 30% of cases of maternal infection, being more frequent in the 1st and 2nd trimesters of pregnancy, which can cause dropsy and fetal death - due to a drop in the number of erythrocyte precursors causing intense anemia. Laboratory tests are needed mainly when the mother presents a rash. However, there are cases of asymptomatic infections that do not exclude transmission to the fetus²³.

There were four samples with detection of the RNA of Zika Virus in the CSF of NB by real-time PCR. One of these patients had spina bifida/corrected route lumbosacral myelomeningocele/Arnold Chiari Syndrome Type 2 and hydrocephalus.

Another patient had only hydrocephalus, and two others with sepsis investigation/infectious screening.

In April 2015, Brazil's Zika virus (ZIKV) spread was confirmed as an etiological agent causing acute exanthematous disease^{3,4}. From October of the same year, an epidemic of microcephaly was related to a maternal infection by ZIKV during the gestational period, with indications of congenital infection (calcifications, ventriculomegaly, and cortical development disorder), having been ruled out other causes of congenital infection with similar manifestations (such as Cytomegalovirus and Toxoplasmosis), as well as other genetic or environmental causes^{3,4}.

The World Health Organization (WHO) defines microcephaly as a head circumference (CP) equal to or less than 31.9 cm for boys and equal to or less than 31.5 cm for girls born at term^{3,4}. The most likely cause of this decrease is related to the presence of the virus in the CNS, promoting neuronal death directly or through the activation of immune responses of infected hosts, compromising the structure and functioning of important areas²⁴.

The main benefit of molecular biology is to reduce the detection time of an infectious agent by avoiding the immunological window period, the time it takes for the body to create an immune response to an infectious agent. Thus, it becomes more effective compared to immunological methods that depend on the binding between antigen and antibody²⁵.

Molecular methods allow laboratories to quickly detect and identify earlier a pathogen that is difficult to grow or those that are present in low quantities in the clinical sample²⁵.

This study's limitation was the impossibility of performing PCR for Syphilis in the included samples, given that we did not obtain a positive control. However, it is

worth noting that in the literature, this pathogen does not have good detection sensitivity in CSF by PCR^{26,27}, and exposure to Syphilis in pregnancy already has a well-established investigation flowchart based on serological, treponemal and non-treponemal tests²⁶⁻²⁸.

Investigating vertically transmitted infectious diseases during pregnancy is critical and often the only possible way to confirm that an asymptomatic NB may be infected. However, except for Toxoplasmosis, Rubella, and Syphilis, the universal screening of several of the pathogens studied here that are responsible for a large contingent of cases of congenital infection, such as Cytomegalovirus, Herpes simplex types 1 and 2, Varicella zoster, Epstein-Barr virus, Parvovirus B-19, and Zika virus, is not yet recommended.

CONCLUSION

In such a way, we conclude that the most frequent pathogens causing congenital infection in CSF samples of newborns in CAISM were Zika virus, Varicella Zoster virus and Parvovirus B-19, obtained through the detection of DNA/RNA by molecular methods. The proportion of positive PCR was higher in the group that presented congenital malformations (statistically significant difference: $p = 0,040$), suggesting the clinical relevance of investigating these pathogens by molecular methodology.

REFERENCES

1. Cofré F, Delpiano L, Labraña Y, Reyes A, Sandoval A, Izquierdo G. Síndrome de TORCH: Enfoque racional del diagnóstico y tratamiento pre y post natal.: Recomendaciones del Comité Consultivo de Infecciones Neonatales Sociedad Chilena de Infectología. *Rev Chilena Infectol.* 2016;33(2):191-216.
2. Leite AA, Honório SR, Torres GR, Errante PR. Análise do líquido cefalorraquidiano. Revisão de literatura, *Atas de Ciências da Saúde, São Paulo.* Jul-Set 2016;4(3):1-24.
3. de Araújo TVB, Rodrigues LC, de Alencar XRA, de Barros MFD, Montarroyos UR, de Melo APL, et al. Association between Zika virus infection and microcephaly in Brazil, January to May 2016: preliminary report of a case-control study. *Lancet Infectious Disease.* 2016;(16)12:1356-63.
4. de Araújo TVB, Ximenes RADA, Mir ADDB, Souza WV, Montarroyos UR, de Melo APL, et al. Association between microcephaly, Zika virus infection, and other risk factors in Brazil: Final report of a case-control study. *Lancet Infectious Disease.* 2017;(1)8:328-36.
5. Neu N, Duchon J, Zachariah P. TORCH infections. *Clin Perinatol.* 2015 Mar; 42(1):77-103, viii. doi: 10.1016/j.clp.2014.11.001. Epub 2014 Dec 20.
6. Karen E Johnson, MD. Overview of TORCH infections. Literature review current through; 2023 [Cited 2023 May 5].
Available from: https://www.uptodate.com/contents/overview-of-torch-infections?search=overview-oftorch-infections&source=search_result&selectedTitle=1~150&usage_type=default&display_rank=1

7. Leite AA, Honório SR, Torres GR, Errante PR. Análise do líquido cefalorraquidiano. Revisão de literatura. Atas de Ciências da Saúde, São Paulo. Jul-Set 2016; (4)3:1-24.
8. Belaz S, Gangneux JP, Dupretz P, Guiguen, C, Robert-Gangneux F. A 10-year retrospective comparison of two target sequences, REP-529 and B1, for *Toxoplasma gondii* detection by quantitative PCR. *Journal of Clinical Microbiology*. 2015;(53)4:1294-300.
9. Olariu, Tudor R.; Remington, Jack S.; Montoya, Jose G. Polymerase chain reaction in cerebrospinal fluid for the diagnosis of congenital toxoplasmosis. *Pediatric Infectious Disease*. 2014; (33) 6: 566-70.
10. Bhaskaran A, Racska L, Gender R, Southern P, Cavuoti D, Alatoom A. Interpretation of positive molecular tests of common viruses in the cerebrospinal fluid. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. 2013;(77)3:236-40.
11. Melvin AJ, Mohan KM, Schiffer JT, Drolette LM, Magaret A, Corey L, Wald, A. Plasma and cerebrospinal fluid herpes simplex virus levels at diagnosis and outcome of neonatal infection. *Journal of Pediatrics*. 2015;(166)4:827-33.
12. Hanson KE, Alexander BD, Woods C, Petti C, Reller LB. Validation of laboratory screening criteria for herpes simplex virus testing of cerebrospinal fluid. *Journal of Clinical Microbiology*. 2007;(45)3:721-4.
13. Jeyanthi JC, Ong I. Guan. Epidemiology and Outcome in Neonatal and Pediatric Herpes Simplex Encephalitis: A 13-Year Experience in a Singapore Tertiary Children's Hospital. *Journal of Pediatric Infectious Diseases*. 2015;(1)1:16-21.
14. Kawada JI, Kimura H, Ito Y, Hoshino Y, Tanaka-Kitajima N, Ando Y, Futamura M, Morishima T. Comparison of real-time and nested PCR assays for

- detection of herpes simplex virus DNA. *Microbiology and Immunology*. 2004;(48)5:4115.
15. Davis KL, Shah SS, Frank G, Eppes SC. Why are young infants tested for herpes simplex virus? *Pediatr Emerg Care*. 2008;(24)10:673-8.
 16. Schleede L, Bueter W, Baumgartner-Sigl S, Opladen, T, Weigt-Usinger K, Stephan S, et al. Pediatric herpes simplex virus encephalitis: A retrospective multicenter experience. *Journal of Child Neurology*. 2013;(28)3:321- 31.
 17. Petel D, Barton M, Renaud C, Ouchenir L, Brophy J, Bowes Jr, et al. Enteroviral and herpes simplex virus central nervous system infections in infants < 90 days old: a Paediatric Investigators' Collaborative Network on Infections in Canada (PICNIC) study. *BMC Pediatrics*. 2020;(20)0:1-10.
 18. Kleines M, Scheithauer S, Schiefer J, Häusler M. Clinical application of viral cerebrospinal fluid PCR testing for diagnosis of central nervous system disorders: A retrospective 11-year experience. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. 2014;(80)3:207-15.
 19. Czech-Kowalska J, Jedlińska-Pijanowska D, Kasztelewicz B, Kłodzińska M, Pietrzyk A, Sarkaria E, et al. The Limitations of Cytomegalovirus DNA Detection in Cerebrospinal Fluid of Newborn Infants with Congenital CMV Infection: A Tertiary Care Neonatal Center Experience. *The Pediatric Infectious Disease Journal*. 2021;(40)9:838-45.
 20. Goycochea-Valdivia WA, Baquero-Artigao F, Del Rosal T, Frick MA, Rojo P, Echeverría MJ, et al. Cytomegalovirus DNA Detection by Polymerase Chain Reaction in Cerebrospinal Fluid of Infants with Congenital Infection: Associations with Clinical Evaluation at Birth and Implications for Follow-up.

- Clinical Infectious Diseases. 2017 May 15;64(10):1335-1342. doi: 10.1093/cid/cix105.
21. Halwachs-Baumann G, Genser B, Pailer S, Engele H, Rosegger H, Schalk A, et al. Human cytomegalovirus load in various body fluids of congenitally infected newborns. *Journal of Clinical Virology*. 2002;(25):81-7.
 22. Norero VX. Infecciones virales en neonatos febriles con sepsis clínica. *Hospital del Niño. Panamá Diciembre 2013-2014. Pedátric Panamá*. 2015;(44)2:12-22.
 23. Parisi SG, Basso M, Del Vecchio C, Andreis S, Franchin E, Bello FD, et al. Virological testing of cerebrospinal fluid in children aged less than 14 years with a suspected central nervous system infection: A retrospective study on 304 consecutive children from January 2012 to May 2015. *Eur J Paediatr Neurol*. 2016;(20)4:588-96.
 24. Pomar L, Vouga M, Lambert V, Pomar C, Hcini N, Jolivet A, et al. Maternal-fetal transmission and adverse perinatal outcomes in pregnant women infected with Zika virus: Prospective cohort study in French Guiana. *BMJ [online]*. 2018;(363).
 25. Mustonen K, Mustakangas P, Uotila L, Muir P, Koskiniemi M. Viral infections in neonates with seizures. *Journal of Perinatal Medicine*. 2003;(31)1:75-80.
 26. Marangoni A, Moroni A, Tridapalli E, Capretti MG, D' Antuono A, Biagi M, et al. Congenital syphilis surveillance. *Microbiologia Médica*. 2011;(26)2:108-11.
 27. Marangoni A, Moroni A, Tridapalli E, Capretti MG, Farneti G, Faldella G, et al. Antenatal syphilis serology in pregnant women and follow-up of their infants in northern Italy. *Clinical microbiology and infection*. 2008;(14)11:1065-8.

28. Michelow IC, Wendel GD, Norgard MV, Zeray F, Leos NK, Alsaadi R, et al. Central nervous system infection in congenital syphilis. N England J Med. 2002;(346)23:1792-8.

Table 1 - Characteristics of newborns from the Neonatal Unit of CAISM-Unicamp, with CSF samples included in the study, from 2017 to 2021

Gender	N	%
Female	80	53.3
Male	70	46.7
Gestational Age	Preterm NB (%) GA< 37 weeks	Full-term NB (%) GA= 37 to 42 weeks
	40,4	59,6
Average age (days)	Median age (days)	Weight < 2.5 kg at birth (%)
6,44	3	42,4%
Initial diagnostic hypothesis that motivated CSF collection	N	%
Sepsis	61	40.4
Congenital malformations	20	13.2
Exposure to Syphilis in pregnancy	42	27.8
Seizure	19	12.6
Other	9	6

Total of CSF samples from CAISM neonates with congenital infection screening: 151

CSF: cerebrospinal fluid; GA: Gestational Age; Kg: Kilograms; NB: newborns

Others include Febrile exanthematous disease in pregnancy; intrauterine growth restriction; moderate bilateral subdural parietal collection - secondary to cerebral atrophy - mild ventricular dilatation; moderate hypoxic-ischemic encephalopathy; respiratory distress

**Table 2- Percent positivity of PCRs - pathogens detected in the respective CSF samples of the NB
and 95% Confidence Interval**

Pathogens	Positive PCR	Total	%	CI 95% *
TOXO	2	151	1,3	0,16 – 4,70
HSV-1	2	151	1,3	0,16 – 4,70
HSV-2	0	151	0	0 – 2,41
VZV	4	151	2,6	0,72 – 6,64
CMV	1	151	0,7	0,02 – 3,63
EBV	0	151	0	0 – 2,41
B-19	4	151	2,6	0,72 – 6,64
ZIKA	4	151	2,6	0,72 – 6,64

N: total= 151 samples ; HSV-1: Herpes simplex type 1; VZV: Varicella Zoster; EBV: Epstein-Barr virus;
CMV: Cytomegalovirus; Toxo: Toxoplasmosis; B-19: Parvovirus B-19; Zika: Zika virus; CI 95%: 95%
Confidence Interval 95%; CSF: cerebrospinal fluid; NB: newborns; PCR: Polymerase Chain Reaction

Table 3 - Congenital malformations and pathogens detected in the respective CSF samples of newborns from 2017 to 2021

Type of congenital malformation	Pathogens detected in the CSF of newborns								
	N	HSV-1	HSV-2	VZV	CMV	TOXO	B-19	ZIKA	EBV
Hydrocephalus	9	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	POS	NEG
Microcephaly	3	NEG	NEG	NEG	NEG	POS	POS	NEG	NEG
Macrocrania	2	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
Myelomeningocele Lumbosacral	2	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	POS	NEG
Arnold Chiari Malformation Type II	2	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	POS	NEG	NEG
Occipital encephalocele	2	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	POS	NEG	NEG
Occipitocervical cyst	1	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG

Congenital malformations mentioned in the medical records of CAISM and pathogens detected in the respective CSF samples of the NB; N total = 151 samples

Table 4- Global evaluation of PCR reactions regarding patients' diagnosis

Overall Diagnostics	PCR			Total	
	positive	negative			
Congenital Malformations	Yes	5 (25%)	15	20	P= 0,040
	No	11 (8,4%)	120	131	
	Total	16	135	151	
	PCR			Total	
	positive	negative			
Sepsis	Yes	5	56	61	P=0,306
	No	11	79	90	
	Total	16	135	151	
	PCR			Total	
	positive	negative			
Seizure	Yes	0	19	19	P=0,102
	No	16	116	132	
	Total	16	135	151	
	PCR			Total	
	positive	negative			
Exposure to Syphilis in pregnancy	Yes	5	37	42	P=0,474
	No	11	98	109	
	Total	16	135	151	
	PCR			Total	
	positive	negative			
Others	Yes	1	8	9	P=0,645
	No	15	127	142	
	Total	16	135	151	

N: total= 151 samples; P = p-value of one-sided Fisher's exact test; PCR: Polymerase chain reaction

Table 5- Global evaluation of PCR and diagnostics regarding CSF's protein and cellularity

CSF characteristics		PCR			P value
		positive	negative	Total	
Pleocytosis	Yes	9	68	77	P = 0,423
	No	6	59	65	
	Total	15	127	142	
		PCR			P = 0,373
		positive	negative	Total	
Hyperproteinorachia	Yes	13	116	129	
	No	2	10	12	
	Total	15	126	141	
Diagnostics	Sepsis	Malformation	Seizures	Exposure to Syphilis	Others
Hyperproteinorachia	49 (90,7%)	15 (78,9%)	19 (100%)	40 (95,2%)	6 (85,7%)
					P=0,12
Pleocytosis	32 (58,2%)	11 (57,9%)	7 (36,8%)	24 (57,1%)	3 (42,9%)
					P= 0,528

CSF: cerebrospinal fluid; N: total= 151 samples; P = p-value of one-sided Fisher's exact test;

PCR: Polymerase chain reaction

DISCUSSÃO

A primeira consideração a ser feita é que não é possível definir o diagnóstico de infecções congênitas com base apenas em sinais e sintomas na gestante, e até mesmo pelos resultados sorológicos maternos, uma vez que a infecção pode não ter gerado uma resposta imunológica no organismo (55).

Além disso, os sinais e sintomas das infecções congênitas no RN são muito similares, dependendo consideravelmente da idade gestacional na qual o feto foi infectado, isto é, dos órgãos e sistemas fetais que estavam sendo desenvolvidos naquele momento, além da capacidade patogênica do microorganismo e da predisposição genética do hospedeiro (56).

As infecções no Sistema Nervoso Central de neonatos têm várias possibilidades de agentes etiológicos. Na literatura, encontramos que 66% das encefalites são por vírus (57) e 26% dos recém-nascidos que apresentam convulsão, o tem devido a alguma neuroinfecção de etiologia viral (23).

Em alguns casos, pode-se suspeitar de infecção intrauterina com base em certas manifestações clínicas incluindo a hidropsia fetal, microcefalia, convulsões, catarata, perda auditiva, doença cardíaca congênita, hepatoesplenomegalia, icterícia, rash e trombocitopenia (54).

Porém, o diagnóstico diferencial das neuroinfecções congênitas apenas por meio de sinais clínicos é bastante difícil, devido a possibilidade de apresentação de sinais inespecíficos nessa faixa etária, não patognomônicos de apenas um patógeno determinado (56).

A punção lombar (PL) para estudo do líquido cefalorraquidiano (LCR) no RN é um procedimento frequente, pois faz parte da investigação nos neonatos com sepse, a fim de verificar a existência de meningite associada, embora muitas vezes a sintomatologia inicial pouco específica, dificulte o diagnóstico precoce (6).

Alterações na composição do LCR podem indicar a presença de infecções que acometem o SNC e têm capacidade de causar danos irreversíveis e até o óbito. A punção lombar contribui para o direcionamento ao facilitar o diagnóstico destas patologias, reduzindo óbitos de RNs hospitalizados, especialmente aqueles internados em Unidades de Terapia Intensiva Neonatal (7).

Faremos a discussão de cada patógeno pesquisado, causador das neuroinfecções congênitas, separadamente, a seguir.

HERPES VÍRUS SIMPLES 1 e 2

Os patógenos da família *Herpesviridae* causam infecções que acometem o Sistema Nervoso, apresentando neurotropismo, seja por disseminação hematogênica ou transmissão neuronal (11-13).

Foram identificadas duas amostras positivas para HSV-1, cujo motivo para coleta de LCR foi exposição à Sífilis na gestação, em ambos os casos. A coleta do LCR deu-se em um paciente no dia do nascimento e no outro, no dia seguinte ao nascimento.

Os herpesvírus 1 e 2 possuem características biológicas semelhantes, como a capacidade de estabelecer infecções latentes, podendo ser reativados, causando lesões que podem se localizar no sítio primário da infecção ou perto dele (15, 18, 20-22). No entanto, podem causar diferentes tipos de patologias.

A transmissão pode ocorrer no momento em que o indivíduo está excretando o vírus pelo contato com fluidos corporais como saliva, sêmen, secreções cervicais e principalmente pelo contato íntimo com as vesículas. O vírus penetra o organismo pela mucosa oral, genital ou pelo contato com pele lesionada (22, 23).

A infecção primária por HSV no primeiro trimestre da gravidez pode causar aborto, mas não há uma descrição de malformações fetais nas gestações que persistem, como numa síndrome (não é frequente a transmissão intra-útero). O risco de transmissão da mãe infectada para o recém-nascido é alto (30- 50%) se a gestante tiver se contaminado próximo ao parto. O risco é bem menor (< 1%) nas gestantes que se contaminaram na primeira metade da gravidez ou com antecedentes de lesões recorrentes de herpes genital anteriores à gestação. No entanto, na maioria dos bebês com herpes neonatal, as mães não tinham história de herpes genital visível (29).

A transmissão vertical do Herpes vírus simples (HSV) geralmente ocorre durante o parto como resultado do contato com a secreção infecciosa materna durante a passagem pelo canal vaginal, no entanto ainda pode ocorrer pela via transplacentária e pós-natal.(15,17, 24).

A infecção causada pelo herpesvírus no período neonatal pode ter três formas clínicas de apresentação: 1) doença disseminada: em diversos órgãos como pulmão, fígado, glândulas suprarrenais, pele, olhos e/ou cérebro; 2) infecção do Sistema Nervoso Central (SNC); ou 3) envolvimento cutâneo (pele e mucosas)- doença da pele, olhos e/ou boca (13, 22, 29).

Cerca de 30% dos neonatos apresentam infecção por HSV no Sistema Nervoso Central e geralmente os sintomas são inespecíficos, semelhantes a uma infecção bacteriana grave. As lesões cutâneas são um indicativo de infecção por HSV, porém, cerca de 35% dos recém-nascidos não manifestam este sintoma, o que dificulta o diagnóstico diferencial com outras infecções virais e bacterianas do SNC- como descrito por Jeyanthi e colaboradores, em estudo retrospectivo de 2015 (16).

O comprometimento do SNC não é incomum na forma disseminada da doença. As manifestações apresentadas pelos recém-nascidos com acometimento do SNC surgem em torno de duas a três semanas de vida, com convulsões, letargia, irritabilidade, tremores, má aceitação alimentar e dificuldade em manter a temperatura (19-21).

Em vários destes trabalhos, há relatos apenas de sinais iniciais inespecíficos (12, 14, 16, 21, 29), enquanto somente um destes artigos, de um estudo multicêntrico publicado por Petel em 2020, citou convulsão em mais de 50% dos RN com diagnóstico de encefalite herpética, motivando a coleta de LCR e realização do PCR para investigação do agente causal (35).

A sensibilidade de detecção do HSV-1 e 2 em líquido cefalorraquidiano de neonatos com doença no Sistema Nervoso Central, de acordo com alguns autores está em torno de 70% (23, 24, 26) e é coerente com o modelo de patogênese em que primeiramente ocorre encefalite antes de haver meningite (29).

A encefalite herpética é uma complicação devastadora, dentre as outras causadas pelos herpesvírus. Os sintomas incluem febre, irritabilidade, má aceitação alimentar, convulsão. Aproximadamente 70% dos pacientes não tratados poderão evoluir para o óbito. Meningite ocorre em 10% dos casos de infecção primária pelo HSV-1 e 2 (21-24).

O diagnóstico através da PCR possui grande valia para identificar o tipo de HSV em caso de encefalite herpética, eliminando a necessidade de biópsia. Além disso, conforme descrito por Schleede e colaboradores em 2013, muitas vezes, a citologia e bioquímica não estão alterados em pacientes com este diagnóstico (24), demonstrando a necessidade de realização da pesquisa do DNA destes patógenos por métodos moleculares. Ademais, a sensibilidade da PCR é superior ao da cultura de células fornecendo diagnóstico mais rápido, sendo considerado “padrão ouro” para a identificação de HSV no LCR (17-20).

Apesar da literatura demonstrar que existem mais casos de positividade no LCR do HSV-2, adquirido através do contágio no canal do parto, não foram observados casos positivos para este patógeno em nossa casuística (12, 14, 17-21).

VARICELA ZOSTER

Quatro amostras tiveram identificação do genoma do VZV, cujo motivo inicial da coleta foi em 50% dos casos triagem infecciosa, um caso com HD inicial de desconforto respiratório e o outro foi exposição à Sífilis na gestação.

No caso da mãe adquirir infecção por VZV durante o período gestacional precoce (semanas 8 a 20), o feto corre o risco de desenvolver a Síndrome da Varicela Congênita (29, 60).

A Síndrome da Varicela Congênita é caracterizada por uma embriofetopatia, que inclui lesões cutâneas cicatriciais, hipoplasia de membros, atrofia muscular, pé torto, restrição de crescimento intrauterino, microcefalia, atrofia cerebelar e cortical, hidrocefalia, convulsões, calcificações intra e extracranianas, atrofia de medula espinhal, disfunção de esfíncter anal, disfagia, atresia intestinal, bexiga neurogênica, disfunção renal, pneumonia por aspiração recorrente, microftalmia, atrofia do nervo óptico, hipoplasia de disco óptico, coriorretinite, catarata congênita e nistagmo (60, 61).

A incidência da síndrome é maior (2%) se a infecção materna ocorrer entre a 13^a e 20^a semanas de gestação, comparando-se com aquela acometendo a gestante entre 0 e 12 semanas (0,4%)- (62,63).

Com o acometimento neurológico, diversas manifestações podem ocorrer: ataxia cerebelar, mielite aguda e neurite óptica aparecem isoladamente ou associadas ao quadro de encefalite; polirradiculoneurite; líquido com eventual aumento de celularidade linfocítica; meningoencefalite (63, 64). Estes sintomas não foram encontrados nos pacientes positivos para este patógeno na nossa casuística, mas sim as alterações liquóricas.

Há, também na literatura, registro de casos de Varicela Congênita em que as mães eram assintomáticas durante a gestação- como no estudo de Mustonen e colaboradores (64), em 2001, em que 201 RN tiveram seus LCR investigados e em quatro deles, houve detecção de infecção congênita por VZV, sendo que as mães destes pacientes tiveram Varicela subclínica durante a gravidez. O mesmo se deu com os quatro neonatos da nossa casuística com PCR positivo para este patógeno, porém suas mães não apresentavam quaisquer sintomas de Varicela durante as gestações.

Já na Revisão Sistemática realizada, não houve nenhum RN com detecção positiva para VZV, sendo a Síndrome da Varicela Congênita citada como uma raridade nos dias atuais (10,18).

EPSTEIN-BARR VÍRUS

Neste estudo, todas amostras de LCR dos neonatos incluídas tiveram resultados negativos para este patógeno, embora já tenha sido documentada pela literatura a transmissão vertical pelo EBV que, apesar de rara, pode ocorrer: no primeiro trimestre da gestação, a infecção do feto pode acarretar uma síndrome com várias anomalias congênitas (micrognatia, criptorquidia e catarata), hipotonia, trombocitopenia, monocitose persistente, proteinúria e metafisite (27). Também nos estudos incluídos na Revisão Sistemática que pesquisaram este agente (10,18), todas as amostras foram negativas para EBV.

CITOMEGALOVÍRUS

Embora a literatura cite como causa de Infecção Congênita mais frequente o CMV (3,4) principalmente nos países desenvolvidos, este não foi o

patógeno mais frequentemente identificado em nossa casuística: obtivemos apenas uma amostra positiva para CMV no LCR de um RN com suspeita de meningite (0,67%). Este bebê nasceu a termo, com peso adequado para a idade gestacional. Evoluiu com crise convulsiva, Hemissíndrome deficitária à esquerda, Síndrome hipotônica axial, Síndrome hipertônica apendicular discreta.

A chance de transmissão do CMV para o feto fica em torno de 30% (29). No entanto, apenas cerca de 10% serão sintomáticos no nascimento. A infecção em bebês sintomáticos varia de doença leve a uma doença disseminada grave com risco de vida, chegando a até 20% de mortalidade perinatal. Mais de 80% dos recém-nascidos sintomáticos poderão apresentar seqüelas como retardo do desenvolvimento neuromotor, paralisia cerebral, convulsões, problemas visuais e perda auditiva neurossensorial. RNs sintomáticos ao nascer usualmente apresentam mau prognóstico (30-33).

A letalidade nos RN sintomáticos com acometimento sistêmico grave no período neonatal pode variar de 5% a 10% (34). Entre os RN com infecção sintomática leve a moderada, 25% a 35% poderão ter algum grau de comprometimento neurológico (28-31)

Aproximadamente 90% de bebês são assintomáticos ao nascimento, como o paciente da nossa casuística com detecção positiva para este patógeno, mas 8 a 15% destes apresentarão sequelas futuras, principalmente perdas auditivas (29). Isso é bastante preocupante e ressalta a importância do diagnóstico por técnicas moleculares de infecções congênicas no LCR de RNs, como é o caso do paciente da nossa casuística que teve N-PCR positivo.

É descrita como mais frequente a positividade do CMV em LCR de recém-nascidos com sintomas clínicos de infecção no SNC ao nascer (28-34). A infecção congênita pelo CMV é um importante problema de saúde pública devido ao elevado risco de consequências adversas tardias tanto em crianças sintomáticas quanto assintomáticas ao nascer. Estima-se que aproximadamente 0,5% a 1% de todos os RN sejam infectados pelo CMV como resultado de infecção congênita (28, 29).

A infecção perinatal é assintomática na grande maioria dos RNs a termo. No entanto, pode estar associada a quadros clínicos de gravidade variável,

como a síndrome “sepsis-like”, colestase, plaquetopenia, neutropenia e pneumonite, quando acomete RNs pré-termo com peso inferior a 1.500g e/ou idade gestacional inferior a 32 semanas (31). Os sintomas clínicos nestes bebês podem ser inespecíficos como: retardo do crescimento intra-uterino, icterícia, hepatoesplenomegalia, petéquia ou púrpura, coriorretinite, perda auditiva neurossensorial, calcificações periventriculares, encefalite, microcefalia (29).

O envolvimento do Sistema Nervoso Central deve ser avaliado com realização de tomografia computadorizada de crânio, sempre que possível, nas crianças com infecção congênita por CMV, mesmo nas assintomáticas. Os achados anormais frequentemente observados em crianças sintomáticas são calcificações e/ou cistos periventriculares, áreas de gliose, vasculite, ventriculomegalia (raramente com hidrocefalia), distúrbios na migração neuronal e, em casos mais graves, atrofia cortical, porencefalia e hidroencefalia (32-37).

A análise do LCR com pesquisa, por técnicas moleculares, do DNA do CMV, deve ser realizada em todas as crianças sintomáticas, ainda que a tomografia de crânio esteja normal, desde que não haja contraindicação pelas condições clínicas e pela contagem de plaquetas (29-33). Essa identificação molecular do genoma do CMV pela N-PCR, feita no LCR, tem altas sensibilidade (80 a 92%) e especificidade (98%) (34, 36-38).

Sendo o CMV a causa mais freqüente de surdez não hereditária, e a segunda causa mais freqüente de atraso do desenvolvimento neuropsicomotor (DNPM) (29), já se justifica a testagem de recém-nascidos para CMV congênita- uma vez que o seu diagnóstico precoce, possibilita rápida instituição de terapêutica, sendo capaz de mudar o prognóstico neurológico destes pacientes.

TOXOPLASMOSE

Obtivemos duas amostras positivas para Toxoplasmose do total dos pacientes estudados (1,3%), sendo que um dos pacientes tinha microcefalia de causa até então desconhecida e o outro com exposição à Sífilis na gestação, o

que motivou a coleta de LCR. O primeiro nasceu com microcefalia, sendo sua mãe ainda suscetível à infecção durante a gestação (com dois exames sorológicos coletados durante a gravidez, demonstrando: IgM e IgG negativos). O segundo não apresentava qualquer malformação, mas sua mãe já tinha anticorpos anti-toxoplasma positivos da classe IgG, demonstrados nos exames realizados rotineiramente para triagem desta afecção, durante a gestação.

Um estudo prospectivo realizado em 2006 por Cassaing e colaboradores também identificou amostras positivas para Toxoplasmose no LCR por método molecular (42): em 134 casos, houve detecção deste patógeno em 15 amostras (11,2%), com maior sensibilidade do teste confirmada, inclusive em LCR. Ressaltou que o teste de Biologia Molecular melhorou o desempenho do diagnóstico.

Olariu em 2014 publicou um trabalho em que detectou a presença do DNA deste agente no LCR em 27/58 (sensibilidade geral de 46,5%) dos bebês infectados, mas no 1º mês de vida a sensibilidade foi de 60%. O valor preditivo positivo (VPP) e a especificidade foram de 100%. Este estudo concluiu que a PCR no LCR pode contribuir para confirmação precoce do diagnóstico de toxoplasmose congênita em bebês nascidos de mães que não foram não tratadas para toxoplasmose durante a gestação (43).

A toxoplasmose congênita é instalada quando a mãe adquire uma infecção aguda durante a gestação e as consequências para o feto dependerão de fatores como virulência da cepa, capacidade dos anticorpos maternos de defenderem o feto, grau de exposição do feto aos toxoplasmas e do período da gestação (39).

A frequência de contágio do feto e a gravidade da doença estão inversamente relacionadas. A infecção precoce da gestante (primeiro ou segundo trimestres) tem baixa taxa de transmissão para o feto (9% a 27%), mas se ocorrer pode causar quadro clínico grave. Uma infecção adquirida no primeiro trimestre da gestação pode provocar aborto. No segundo trimestre além de aborto pode ocorrer nascimento prematuro. Por outro lado, a infecção mais tardia na gestante (terceiro trimestre) apresenta uma maior chance de contágio do feto (até 60% no terceiro trimestre), mas as consequências para ele são menos frequentes, e se existirem, são menos graves. Uma infecção

adquirida no terceiro trimestre da gestação, pode não causar danos imediatos ao RN que muitas vezes irá apresentar evidências da doença em dias, semanas ou meses após o parto (29, 39).

Dentre as manifestações clínicas da toxoplasmose congênita pode-se citar: miocardite, anemia, hepatoesplenomegalia, trombocitopenia, lesões oculares e comprometimento ganglionar generalizado (40-42).

A toxoplasmose congênita é uma das formas mais graves da doença, que em geral provoca sintomas enquadrados dentro da Tétrade de Sabin, em que o feto apresenta coriorretinite (90% dos casos), calcificações cerebrais (69%), retardo do desenvolvimento neuropsicomotor (60%) e alterações do volume craniano com macro ou microcefalia (50% dos casos) (43), como apresentado por um dos pacientes positivos em nossa casuística. Neste paciente que apresentou microcefalia, a mãe havia sido triada na gestação para Toxoplasmose duas vezes e em ambos os exames, mostrou-se suscetível (com IgM e IgG negativos). Sabe-se que se o IgG da grávida for negativo, existe o risco de contágio por *T. gondii* (29), o qual pode ter ocorrido após a última testagem sorológica da gestante- como é o caso desta mãe de um dos pacientes recém nascidos, cujo PCR detectou DNA do Toxoplasma no LCR (e que nasceu com microcefalia de causa até então indeterminada).

Tem sido documentada a realização de IgM e IgA anti-toxoplasma para recém-nascidos. A IgM pode ser usada para o rastreamento neonatal, porém segundo manual da OPAS, obtém-se maior sensibilidade medindo IgA (29).

Pode-se diagnosticar precocemente a toxoplasmose congênita pelo exame de PCR no líquido amniótico não sendo necessário realizar procedimentos invasivos no feto. Mas também tem sido considerada a realização de PCR em outras amostras como sangue periférico, líquido cefalorraquidiano e urina, em qualquer recém-nascido com suspeita de infecção congênita, seja por quadro clínico ou por resultado positivo para IgM (29).

PARVOVÍRUS B-19

Quatro amostras tiveram identificação do DNA deste patógeno no LCR de RNs, sendo que dois tinham suspeita de sepse e outros dois com malformação congênita no SNC: um com encefalocele occipital e microcefalia, outro com Malformação de Arnold Chiari tipo II / Espinha Bífida lombar com Hidrocefalia.

A transmissão do B-19 pode ocorrer por meio de secreções do sistema respiratório, transmissão parental ou vertical. Na gestante, além de poder causar inibição na produção de eritrócitos na medula óssea e de reticulócitos periféricos, pode causar sintomas como febre, mialgia, fadiga e mal estar. O sistema imunológico reage produzindo anticorpos IgM e IgG e pode haver aparecimento de exantema (44, 45). Existem casos de infecções assintomáticas em gestantes que não excluem transmissão para o feto, as quais podem passar despercebidas (45).

A transmissão vertical ocorre em 30% dos casos de infecção materna, o risco de transmissão transplacentária é mais alto no 1º e 2º trimestres da gestação. O intervalo entre a infecção materna aguda e o diagnóstico da doença fetal varia entre duas e seis semanas. O risco de problemas fetais é muito baixo, mas é maior se a infecção ocorrer nos primeiros trimestres da gestação, especialmente entre a 9ª e a 16ª semanas. A doença fetal pode se manifestar por anemia grave, hidropsia não imune ou morte fetal. A hidropsia ocorre devido à queda do número de precursores de eritrócitos, causando anemia intensa no feto, podendo evoluir para aborto espontâneo (44).

Outras anormalidades fetais associadas a este vírus são raras. Não há descrição de casos com seqüelas do desenvolvimento neurológico (29). Embora não seja comum a descrição de malformações congênitas associadas à infecção vertical por Parvovírus B-19, há relato de um caso de anomalia fetal ocular (4) e outro caso de bebê com 38 dias de vida apresentando hidrocefalia, meningite e convulsões com comprovação da presença do Parvovírus B-19 no LCR (65).

VÍRUS ZIKA

Quatro amostras tiveram detecção do RNA deste patógeno no LCR através da PCR em tempo real. Um destes pacientes apresentava: Espinha Bífida/ Mielomeningocele lombossacra rota/ Síndrome de Arnold Chiari Tipo II e Hidrocefalia. Outro paciente tinha apenas hidrocefalia, e outros dois com investigação de sepse/ triagem infecciosa, como motivo para coleta de LCR.

Em abril de 2015, foi confirmada a circulação do vírus Zika (ZIKV) no Brasil, sendo conhecido como agente etiológico causador de doença exantemática aguda (46, 47).

A partir de outubro do mesmo ano, uma epidemia de microcefalia foi relacionada com uma infecção materna por ZIKV durante o período gestacional, com indícios de infecção congênita (calcificações, ventriculomegalia e desordem do desenvolvimento cortical), tendo sido afastadas as outras principais causas de infecção congênita que manifestam calcificações cerebrais (como citomegalovírus e toxoplasmose), assim como outras causas genéticas ou ambientais (46)

A epidemia de microcefalia cresceu consideravelmente no segundo semestre de 2015, e até o final de 2016, 2.205 casos foram confirmados. Em 2017, foram registrados novos casos de infecção pelo vírus Zika no país, com uma taxa de incidência de 1,9 casos/100 mil habitantes (47).

A Organização Mundial da Saúde (OMS) define microcefalia como um perímetro cefálico (PC) igual ou menor que 31,9 cm para meninos e igual ou menor que 31,5 cm para meninas nascidos a termo. A causa mais provável desta redução se relaciona com a presença do vírus no SNC promovendo a morte neuronal diretamente ou por ativação das respostas imunológicas dos fetos infectados, comprometendo a estrutura e o funcionamento de áreas importantes (48).

De Araújo e colaboradores publicaram em 2017 um estudo de caso-controle realizado no estado do Pernambuco, Brasil - em que a associação entre microcefalia e infecção congênita pelo vírus Zika foi confirmada. Também relataram evidências da ausência de efeito de outros fatores potenciais, como a exposição ao inseticida pyriproxyfen ou vacinas durante a gravidez, confirmando os achados de um estudo ecológico da pyriproxyfen em

Pernambuco e estudos prévios de segurança da administração da vacina Tdap durante a gravidez (53).

Em outro estudo realizado naquele mesmo ano, durante a epidemia de Zika na Guiana Francesa, foi verificado PCR positivo para este vírus em 57% dos RNs no LCR. A transmissão materno-fetal ocorreu em 25% dos fetos expostos e esteve associada com evolução precoce ruim fetal/neonatal - perda fetal ou complicações severas da Síndrome da Zika Congênita (SZC) - em 33,3% dos fetos infectados (54).

O Ministério da Saúde declarou o fim da Emergência em Saúde Pública de Importância Nacional (ESPIN) em maio de 2017, em decorrência da diminuição de casos de Zika e microcefalia por todo Brasil. No entanto, deve-se considerar que o fim da emergência não significa o fim da vigilância e assistência (55,56).

Em relação ao agente SARS-CoV-2, houve inclusão de amostras de LCR neste estudo (entre março de 2020 e junho de 2021) também durante a vigência da pandemia do Covid-19 cujos pacientes foram testados por PCR de Swab nasofaríngeo, mas como não houve detecção deste patógeno no swab, não realizamos testagem de PCR nas amostras de LCR dos neonatos. Ainda assim, incluímos na Revisão Sistemática, a pesquisa de estudos que abordassem a realização de PCR no LCR de recém-nascidos para SARS-CoV-2, tendo sido encontrado somente um artigo, em que todas as amostras de LCR tiveram PCR negativo para este vírus (66).

A limitação deste estudo foi a impossibilidade de realizar a identificação de DNA de Sífilis por biologia molecular (N-PCR) nas amostras incluídas, visto que não conseguimos obter controle positivo deste patógeno. Porém, vale ressaltar que de acordo com alguns artigos, esse agente não apresenta boa sensibilidade de detecção no LCR por N-PCR (67-70). A exposição à Sífilis na gravidez já possui um fluxograma de investigação bem estabelecido, baseado em testes sorológicos, treponêmicos e não treponêmicos (71-73). No entanto, estudos futuros utilizando outros primers, de outras regiões do genoma do treponema poderão ser realizados.

A investigação das doenças infecciosas de transmissão vertical durante a gravidez é de extrema importância e, muitas vezes, o único meio disponível

para confirmar que um RN assintomático possa estar infectado. No entanto, com exceção da Toxoplasmose e Sífilis, ainda não é preconizada a triagem universal, nas grávidas, dos patógenos aqui citados, que são responsáveis por um grande contingente de casos de neuroinfecções congênicas (74- 78).

Sendo assim, para que seja possível o diagnóstico etiológico, faz-se necessária a identificação do patógeno no líquido cefalorraquidiano, o que pode impactar na evolução e prognóstico neurológico destes recém-nascidos: uma vez que as técnicas moleculares, como a Nested PCR e a PCR em tempo real, são rápidas e eficazes para detecção destes agentes causais, possibilitando a precoce instituição da terapêutica preconizada (79- 84). Além disso, a realização da metodologia molecular leva a uma redução dos gastos hospitalares (85- 89), pois possibilita menor tempo de internação hospitalar e uso racional dos antibióticos, conforme descrito por Norero em estudo prospectivo de 2015 (28).

Portanto, a realização de métodos moleculares diagnósticos com maior eficácia, para a identificação dos genomas dos patógenos causadores de infecções congênicas e neonatais incluídas neste estudo, foi útil, por oferecerem um panorama dos agravos infecciosos mais frequentes relacionados a esta população de pacientes.

CONCLUSÃO

- Dessa forma, conclui-se que os principais patógenos identificados, causadores de infecções congênitas em amostras de LCR de recém-nascidos, no CAISM, foram o vírus Zika, o vírus Varicela Zoster e Parvovírus B-19, obtidos através da detecção do genoma viral por métodos moleculares.
- Identificou-se a presença de malformações congênitas, através da avaliação dos prontuários, em pacientes cujas amostras de LCR tiveram resultados positivos na detecção molecular dos genomas dos patógenos estudados, numa associação estatisticamente significativa ($p < 0,05$).
- Identificou-se os quadros clínicos presentes nos pacientes com detecção dos patógenos TORCHZ, através da avaliação dos prontuários. Os resultados encontrados sugeriram a relevância clínica da pesquisa da presença destes patógenos (Zika vírus, Parvovírus B-19, HSV, VZV, CMV, Toxoplasmose) pela metodologia molecular, no líquido cefalorraquidiano de recém-nascidos. Estes agentes, com exceção da Toxoplasmose, não são habitualmente triados no pré-natal e o diagnóstico precoce pode mudar o prognóstico.
- Verificou-se, através da Revisão Sistemática, que o diagnóstico por Biologia Molecular possui relevância por identificar os patógenos de neuroinfecção congênita, sendo o mais estudado o Herpes Simples, HSV-1 e 2, como causador de encefalite, eliminando a necessidade de biópsia. Identificou-se que a principal vantagem dessas metodologias (PCR, Nested-PCR, PCR em tempo Real) foi reduzir o tempo de detecção dos patógenos TORCHZ, em líquido cefalorraquidiano dos recém-nascidos de 1 a 28 dias, com suspeita de infecção congênita, evitando o período de janela imunológica. Assim, elas se

mostraram mais eficazes em comparação aos métodos imunológicos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Sampedro A, Aliaga L, Mazuelas P, Rodríguez-Granger J. Diagnóstico de infección congénita. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2011; 29 (Supl 5): 15-20.
2. Cofré F, Delpiano L, Labraña Y, Reyes A, Sandoval A, Izquierdo G. Síndrome de TORCH: Enfoque racional del diagnóstico y tratamiento pre y post natal.: Recomendaciones del Comité Consultivo de Infecciones Neonatales Sociedad Chilena de Infectología. *Rev Chilena Infectol* 2016; 33 (2): 191-216.
3. Johnson KE, Weisman LE, Edwards MS, Torchia MM. Overview of TORCH infections. Literature review current through: Sep 2023. Available from: <https://www.uptodate.com/contents/overview-of-torch-infections?search=overview-oftorch-infections&source=search_result&selectedTitle=1~150&usage_type=default&display_rank=1>. Acesso em 07 de outubro de 2023.
4. Waldorf KA, McAdams RM. Influence of infection during pregnancy on fetal development. *Reproduction*. 2013; 146 (5): R151-62.
5. Neu N, Duchon J, Zachariah P. TORCH infections. *Clin Perinatol*. 2015. Mar; 42(1): 77-103.
6. Seehusen DA, Reeves MM, Fomin DA. Cerebrospinal fluid analysis. *Am Fam Physician*. 2003 Sep 15; 68(6) p 1103-8.
7. Leite AA, Honório SR, Torres GR, Errante PR. Análise do líquido cefalorraquidiano. Revisão de literatura. *Atas de Ciências da Saúde, São Paulo*. JUL-SET 2016; 4 (3): 1-24.
8. Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Microbiologia Clínica para o Controle de Infecção Relacionada à Assistência à Saúde.

Módulo 9: Infecções Virais. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília: Anvisa, 2010; p.87-96.

9. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Coordenação-Geral de Desenvolvimento da Epidemiologia em Serviços. 1. ed. atual. Brasília, 2019; 157-167.
10. Bhaskaran A, Racsa L, Gender R, Southern P, Cavuoti D, Alatoon A. Interpretation of positive molecular tests of common viruses in the cerebrospinal fluid. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. 2013; 77 (3): 236-40.
11. Schmutzhard J, Riedel HM, Wirgart BZ, Grillner L. Detection of Herpes simplex vírus type 1, Herpes simplex vírus type 2 and Varicella-zoster vírus in skin lesions. Comparison of real-time PCR, nested PCR and vírus isolation. 2004; *Journal of Clinical Virology*, 29: 120-6.
12. Anderson NE, Powell KF, Croxson MC. A polymerase chain reaction assay of cerebrospinal fluid in patients with suspected herpes simplex encephalitis. *Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry*. 1993; 56 (5): 520-5.
13. Diamond C, Mohan K, Hobson A, Frenkel L, Corey L. Viremia in neonatal herpes simplex virus infections. *The Pediatric Infectious Disease Journal*. 1999; 18 (6): 487-9.
14. Davis KL, Shah SS, Frank G, Eppes SC. Why are young infants tested for herpes simplex virus? *Pediatr Emerg Care*. 2008; 24 (10): 673-8.
15. Hanson KE, Alexander BD, Woods C, Petti C, Reller LB. Validation of laboratory screening criteria for herpes simplex virus testing of cerebrospinal fluid. *Journal of Clinical Microbiology*. 2007; (45) 3: 721-4.

16. Jeyanthi JC, Ong I, Yeo JG. Epidemiology and Outcome in Neonatal and Pediatric Herpes Simplex Encephalitis: A 13-Year Experience in a Singapore Tertiary Children's Hospital. *Journal of Pediatric Infectious Diseases*. 2015; 1 (1): 16-21.
17. Kawada JI, Kimura H, Ito Y, Hoshino Y, Tanaka-Kitajima N, Ando Y, Futamura M, Morishima T. Comparison of real-time and nested PCR assays for detection of herpes simplex virus DNA. *Microbiology and Immunology*. 2004; 48(5): 411-5.
18. Kleines M, Scheithauer S, Schiefer J, Häusler M. Clinical application of viral cerebrospinal fluid PCR testing for diagnosis of central nervous system disorders: A retrospective 11-year experience. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. 2014; 80 (3): 207-15.
19. Kurtz J, Anslow P. Infantile herpes simplex encephalitis: diagnostic features and differentiation from non-accidental injury. *Journal of Infection*. 2003; 46 (1): 12-6.
20. Malm G, Forsgren M. Neonatal herpes simplex virus infections: HSV DNA in cerebrospinal fluid and serum. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed*. 1999; 81 (1); F24-9.
21. James SH, Sheffield JS; Kimberlin DW. Mother-to-Child Transmission of Herpes Simplex Virus. *J Pediatric Infect Dis Soc*. 2014 Sep; 3 Suppl 1(Suppl 1):S19-23. doi: 10.1093/jpids/piu050.

22. Wigg MD. Viroses Dermotrópicas: Vírus herpes simplex 1 e 2. In: Santos NS de O, Romanos MTV, Wigg MD. Virologia Humana. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2015. 232-259. p.A.
23. Melvin AJ, Mohan KM, Schiffer JT, Drolette LM, Magaret A, Corey L, Wald A. Plasma and cerebrospinal fluid herpes simplex virus levels at diagnosis and outcome of neonatal infection. *Journal of Pediatrics*. 2015; 166 (4): 827-33.
24. Schleede L, Bueter W, Baumgartner-Sigl S, Opladen T, Weigt-Usinger K, Stephan S, Smitka M, Leiz S, Kaiser O, Kraus V, Van Baalen A, Skopnik H, Hartmann H, Rostasy K, Lücke T, Schara U, Häusler M. Pediatric herpes simplex virus encephalitis: A retrospective multicenter experience. *Journal of Child Neurology*. 2013; 28 (3): 321- 31.
25. Wigg MD. Viroses Demotrópicas: Vírus da varicela zoster. In: Santos NS de O, Romanos MTV, Wigg MD. Virologia Humana. 3 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2015. 260-7 p. B.
26. Mustonen, K.; Mustakangas, P.; Uotila, L.; Muir, P.; Koskiniemi, M. Viral infections in neonates with seizures. *Journal of Perinatal Medicine*. , 2003; 31(1): 75-80.
27. Carvalho, L.H.F.R. Mononucleose infecciosa. *Jornal de Pediatria*. 1999; 75 (1): 115-25.
28. Norero X. Infecciones virales en neonatos febriles con sepsis clínica. *Hospital del Niño. Panamá Diciembre 2013-2014. Pediátric Panamá*. 2015; 44 (2): 12-22.

29. Centro Latino-Americano de Perinatologia. Saúde da Mulher e Reprodutiva - CLAP/SMR. Organização Pan-Americana da Saúde / Organização Mundial da Saúde - OPAS/OMS. Infecções Perinatais - Transmitidas de mãe para filho durante a gravidez. [Publicação Científica CLAP/SMR N°1567.03] 2010. Disponível em: <https://iris.paho.org/bitstream/handle/10665.2/49341/CLAP15673-por.pdf?sequence=3&isAllowed=y> [acesso em 23 de out 2023]
30. Kenneson A, Cannon MJ. Review and meta analysis of the epidemiology of congenital cytomegalovirus (CMV) infection. *Rev Med Virol*. 2007 Jul/Aug;17(4):253-76.
31. Mussi-Pinhata MM, Yamamoto AY, Moura Britto RM, de Lima Isaac, de Carvalho e Oliveira PF, Boppana S, Britt WJ. Birth prevalence and natural history of congenital cytomegalovirus infection in a highly seroimmune population. *Clin Infect Dis*. 2009 Aug 15; 49(4): 522–8.
32. Czech-Kowalska J, Jedlińska-Pijanowska D, Kasztelewicz B, Kłodzińska M, Pietrzyk A, Sarkaria E, Dunin-Wąsowicz D, Gradowska K, Niezgoda A, Gruszczyńska D, Dobrzańska A. The Limitations of Cytomegalovirus DNA Detection in Cerebrospinal Fluid of Newborn Infants With Congenital CMV Infection: A Tertiary Care Neonatal Center Experience. *The Pediatric Infectious Disease Journal*. 2021; 40 (9): 838-45.
33. Goycochea-Valdivia WA, Baquero-Artigao F, Del Rosal T, Frick MA, Rojo P, Echeverría MJ, Noguera-Julian A, Bringué X, Saavedra-Lozano J, Vives-Oñós I, Moliner E, Cilleruelo MJ, Cuadrado I, Colino E, Castells L, Tagarro A, Vilas J, Soler-Palacin P, Blázquez-Gamero D. Cytomegalovirus DNA Detection by Polymerase Chain Reaction in Cerebrospinal Fluid of Infants With Congenital Infection: Associations With Clinical Evaluation at Birth and Implications for Follow-up. *Clinical Infectious Diseases*. 2017 May 15; 64 (10):1335-1342. doi: 10.1093/cid/cix105.

34. Halwachs-Baumann G, Genser B, Pailer S, Engele H, Rosegger H, Schalk A, Kessler HH; Truschnig-Wilders M. Human cytomegalovirus load in various body fluids of congenitally infected newborns. *Journal of Clinical Virology*. 2002; vol 25, pg 81-7.
35. Petel D, Barton M, Renaud C, Ouchenir L, Brophy J, Bowes J, Khan S, Bitnun A, McDonald J, Boisvert A-A, Ting J, Roberts A, Robinson JL. Enteroviral and herpes simplex virus central nervous system infections in infants <90 days old: a Paediatric Investigators' Collaborative Network on Infections in Canada (PICNIC) study. *BMC Pediatrics*. 2020; 20 (0): 1-10.
36. Hamprecht K, Maschmann J, Jahn G, Poets CF, Goelz R. Cytomegalovirus transmission to preterm infants during lactation. *J Clin Virol*. 2008 Mar; 41(3):198-205.
37. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde Departamento de Ações Programáticas e Estratégicas. Atenção à Saúde do Recém-Nascido. Vol. 2. Brasília-DF, 2014.
38. Palhares DB, Xavier PCN. Citomegalovirose Neonatal. Disponível em: https://www.sbp.com.br/fileadmin/user_upload/pdfs/Citomegalovirose_neonatal_2011.pdf (acesso em 17 de outubro de 2023).
39. Urara Kawazoe. *Toxoplasma gondii*. In: Neves DP, Melo AL de, Linardi PM, Vitor RWA. *Parasitologia Humana*. 11. ed. São Paulo: Atheneu, 2004. p.163-172.
40. Carvalho AGMA de, Lima JS, Lima MSPR de, Mota C de AX. Diagnóstico Laboratorial da Toxoplasmose Congênita. *Rev. Ciênc. Saúde Nova Esperança*. Jun. 2014;12(1):88-95.

41. Belaz S, Gangneux JP, Dupretz P, Guiguen C, Robert-Gangneux F. A 10-year retrospective comparison of two target sequences, REP-529 and B1, for *Toxoplasma gondii* detection by quantitative PCR. *Journal of Clinical Microbiology*. 2015; 53(4): 1294-300.

42. Cassaing S, Bessi res MH, Berry A, Berrebi A, Fabre R, Magnaval JF. Comparison between two amplification sets for molecular diagnosis of toxoplasmosis by real-time PCR. *Journal of Clinical Microbiology*. 2006; 44 (3): 720-4.

43. Olariu TR, Remington JS, Montoya, JG. Polymerase chain reaction in cerebrospinal fluid for the diagnosis of congenital toxoplasmosis. *Pediatric Infectious Disease*. 2014; 33 (6): 566-70.

44. Couceiro JN dos SS, Arentz LAMGF. *V roses Cong nitas: Parvovírus B19*. In: Santos NS de O, Romanos MTV, Wigg MD. *Virologia humana*. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2015. 294-301.

45. Bultman DB, Klingel K, Sotlar K, Bock T, Kandolf R. Parvovirus B19: a pathogen responsible for more than hematologic disorders. *Virchows Arch* 2003; 442: 8-17. <https://doi.org/10.1007/s00428-002-0732-8>

46. Perera-Lecoin M, Meertens L, Carnec X, Amara A. Flaviv rus Entry Receptors: An Update. *Jornal V roses*. 2014; v.6, n.1.

47. Campos GS, Bandeira AC, Sardi SI. Zika Virus Outbreak, Bahia, Brazil. *Emerg Infect Dis* Oct 2015; 21:1885-6.

48. Miranda-Filho De B, Martelli CM, Ximenes RA, Araújo TV, Rocha MA, Ramos RC, et al. Initial description of the presumed congenital Zika syndrome. *Am J Public Health*. 2016 Apr;106(4):598-600.
49. World Health Organization. Assessment of infants with microcephaly in the context of Zika virus. Interim guidance. Geneva: World Health Organization; 2016. (WHO/ZIKV/MOC/16.3).
50. Brito MN, Donato MAM. Vírus Zika e o sistema nervoso central: Uma revisão de Literatura. *Ciências Biológicas e de Saúde Unit Facipe*. 2017; 3 (1): 37-48.
51. Brasil. Ministério da Saúde. Ministério da Saúde declara fim da Emergência Nacional para Zika e microcefalia. Disponível em: <<http://portalms.saude.gov.br/noticias/722-svs-noticias/28348-ministerio-da-saude-declara-fim-da-emergencia-nacional-para-zika-e-microcefalia>> [acesso em out 2023].
52. de Araújo TVB, Rodrigues LC, de Alencar XRA, de Barros M-FD, Montarroyos UR, de Melo APL, et al. Association between Zika virus infection and microcephaly in Brazil, January to May, 2016: preliminary report of a case-control study. *Lancet Infectious Disease* - Volume 16, Issue 12, pp. 1356-63, 2016.
53. de Araújo TVB, Ximenes RADA, Mir ADDB, Souza WV, Montarroyos UR, de Melo APL, et al. Association between microcephaly, Zika virus infection, and other risk factors in Brazil: Final report of a case-control study. *Lancet Infectious Disease*. 2017; (1) 8: 328-36.
54. Pomar L, Vouga M, Lambert V, Pomar C, Hcini N, Jolivet A, et al. Maternal-fetal transmission and adverse perinatal outcomes in pregnant

women infected with Zika virus: Prospective cohort study in French Guiana. *BMJ* [online]. 2018; 363.

55. Quintans MDS, Bueno AC, Cardoso CAA. Microcephaly caused by or associated with congenital infections in the last 20 years in Brazil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*. 2022; 1-12.
56. De Carvalho NS, De Carvalho B, Fugaça CA, Dóris B, Biscaia ES. Zika vírus infection during pregnancy and microcephaly occurrence: a review of literature and Brazilian data. *Braz Infect Dis* 2016; 20 (3): 282-9.
57. Santos NS de O. In: Santos NS de O, Romanos MTV, Wigg MD. *Virologia Humana: Diagnóstico molecular das infecções*. 3 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2015. 101-140p. B
58. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Guia de vigilância epidemiológica / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. – 7. ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2019. 816 p. (Série A. Normas e Manuais Técnicos).
59. Lito D, Francisco T, Salva I, Tavares Md, Oliveira R, Neto MT. TORCH serology and group B Streptococcus screening analysis in the population of a maternity. *Acta Med Port*. 2013 Sep-Oct;26(5):549-54.
60. Enders G, Miller E, Cradock-Watson J, Bolley I, Ridehalgh M. Consequences of varicella and herpes zoster in pregnancy: prospective study of 1739 cases. *Lancet*. 1994;343(8912):1548-51.

61. Muller R. Varicela na gravidez e no recém-nascido. In Segre CAM, Costa HPF, Lippi UG, editors. Perinatologia. Fundamentos e prática. 2a ed. São Paulo: Sarvier; 2009. p. 320-7.
62. Freire LMS, Freire HBM. Infecção pelo Vírus Varicela-Zoster: considerações diagnósticas e terapêuticas. Sociedade Brasileira de Pediatria. Disponível em: <http://intranet.sbp.com.br/show_item2.cfm?id_categoria=24&id_detalhe=943&tipo_detalhe=s> acesso em 15 de outubro de 2023.
63. CVE - Centro de Vigilância Epidemiológica "Prof. Alexandre Vranjac". Disponível em: <http://www.saude.sp.gov.br/resources/cve-centro-de-vigilancia-epidemiologica/areas-de-vigilancia/doencas-de-transmissao-respiratoria/varicela/dados/varicela_dados.pdf> acesso em 16 de outubro de 2023.
64. Mustonen K, Mustakangas P, Valanne L, Haltia M, Koskiniemi M. Congenital Varicella-Zoster Virus infection after maternal subclinical infection: clinical and neuropathological findings. Journal of Perinatology 2001; 21: 141-6.
65. Ferreira NE, Costa AC, Kallas EG, Silveira CGT, Oliveira ACS, Honorato L, et al. Encephalopathy Caused by Human Parvovirus B19 Genotype 1 Associated with *Haemophilus influenzae* Meningitis in a Newborn. Curr. Issues Mol. Biol. 2023, 45(9), 6958-66; <https://doi.org/10.3390/cimb45090439>.
66. Miller EH, Namale VS, Kim C, Dugue R, Waldrop G, Ciryam P, Chong AM, Zucker J, Miller EC, Bain JM, Willey JZ, Doyle K, Boehme A,

- Claassen J, Uhlemann AC, Thakur KT. Cerebrospinal Analysis in Patients with COVID-19. *Open Forum Infectious Disease*. 2020; 7 (11): 1-9.
67. Errol R Norwitz, Charles B Hicks. Syphilis in Pregnancy. Disponível em: <<https://www.uptodate.com/contents/syphilisinpregnancy?source=s ee link>>. Acesso em: 15 out. 2023.
68. Marangoni, A.; Moroni, A.; Tridapalli, E; Capretti, M. G.; D' Antuono, A.; Biagi, M; Ruscello, S; Saviolli, F; Cevenini, R. Congenital syphilis surveillance. *Microbiologia Medica*. 2011; 26 (2), 108-11.
69. Marangoni A, Moroni A, Tridapalli E, Capretti MG, Farneti G, Faldella G, D'Antuono A, Cevenini R. Antenatal syphilis serology in pregnant women and follow-up of their infants in northern Italy. *Clinical microbiology and infection*. 2008; 14 (11): 1065-8.
70. Michelow IC, Wendel GD, Norgard MV, Zeray F, Leos NK, Alsaadi R, Sánchez PJ. Central nervous system infection in congenital syphilis. *N England J Med*. 2002; 346 (23): 1792-8.
71. Kidd S, Bowen VB, Torrone EA, Bolan G. Use of National Syphilis Surveillance Data to Develop a Congenital Syphilis Prevention Cascade and Estimate the Number of Potential Congenital Syphilis Cases Averted. *Sex. Transm Dis*. 2018 September; 45(9): S23–S28. doi:10.1097/OLQ.0000000000000838
72. Arrieta AC; Kaplan SL, Armsby C. Congenital syphilis: Clinical manifestations, evaluation, and diagnosis. Disponível em: <https://www.uptodate.com/contents/congenital-syphilis-clinical->

[manifestations-evaluation-and-diagnosis](#) (acesso em 17 de outubro de 2023).

73. Vanhaecke C, Grange P, Benhaddou N, Blanche P, Salmon D, Parize P, *et al.* Clinical and Biological Characteristics of 40 patients with neurosyphilis and evaluation of *Treponema pallidum* Nested Polymerase Chain Reaction in cerebrospinal fluid samples. *Clinical Infectious Diseases* 2016; 63: 1180-6.
74. Mussi-Pinhata MM, Yamamoto AY. Infecções Congênitas e perinatais. *Jornal de Pediatria*; 1999; 75 (1): 15-27.
75. Leon LL, Lima RG, Boffi LC, Bindilatti RN, Garlipp CR, Costa SCB, Bonon SHA. Arbovirus, herpesvirus, and enterovirus associated with neurological syndromes in adult patients of a university hospital, 2017-2018. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 2021; 54: 1-10.
76. Camilo L.M.; Pereira-Chioccolaa V.L.; Gavaa, R.; Meira-Strejevitcha C.S.; Vidal, J.E.; de Mattos C.C.S; *et al.* Molecular diagnosis of symptomatic toxoplasmosis: a 9-year retrospective and prospective study in a referral laboratory in São Paulo, Brazil. *braz j. infect dis*. 2017; 21(6):638–647.
77. Cho KU, You SJ. Characteristics of Meningitis in Febrile Infants aged < 90 days. *Annals of Child Neurol*. 2021; 29 (2): 83-90.
78. Ishaque S, Yakoob MY, Imdad A; Goldenberg RL, Eisele TP, Bhutta ZA. Effectiveness of interventions to screen and manage infections during pregnancy on reducing stillbirths: a review. *BMC Public Health* 2011, 11 (Suppl3): S3.

79. Shet A. Congenital and Perinatal Infections: throwing new light with na old TORCH. *Indian J Pediatr.* 2011; 78: 88-95.
80. Kishore J, Misra R, Paisal A, Pradeep Y. Adverse reproductive outcome induced by Parvovirus B19 and TORCH infections in women with high-risk pregnancy. *J Infectious Dev Ctris* 2011; 5 (12): 868-73.
81. Zhao J, Chen Y, Xu Y, Pi G. Effect of intrauterine infection on brain development and injury. *Internaional Journal of Developmental Neuroscience.* 2013; 31: 543-9.
82. Maia MMM, Lage EM, Moreira BCB, Deus EAB, Faria JG, Pinto JA, Melo VH. Prevalência de infecções congênitas e perinatais em gestantes HIV positivas da região metropolitana de Belo Horizonte. *Rev. Bras. Ginecol. Obstet.* 2015; 37 (9): 421-7.
83. Read SJ, Kurtz JB. Laboratory diagnosis of commom viral infections of the Central Nervous System by using a single Multiplex PCR Screening Assay. *Jornal of Clinical Microbiology.* 1999: 1352-5.
84. Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Gerência de Vigilância e Monitoramento em Serviços de Saúde (GVIMS) Gerência Geral de Tecnologia em Serviços de Saúde (GGTES). Critérios Diagnósticos de Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde Neonatologia: Transplacentárias, Infecções relacionadas à Assistência à Saúde (IRAS) precoce de provável origem materna. 2013: 11; 19.
85. Parisi SG, Basso M, Del Vecchio C, Andreis S, Franchin E, Bello FD, Pagni S, Biasolo MA, Manganelli R, Barzon L, Palù G. Virological testing of cerebrospinal fluid in children aged less than 14 years with a suspected central nervous system infection: A retrospective study on 304 consecutive children from January 2012 to May 2015. *Eur J Paediatr Neurol.* 2016; 20 (4): 588-96.

86. McGuire R. Sorologia das Doenças Infecciosas: os agentes TORCH. Newslab- edição 35. 1999: 231-8.
87. De Jong EP, Vossen ACTM, Walther FJ, Lopriore E. How to use... neonatal TORCH testing. Arch Dis Child Educ Pract Ed. 2013; 98:93-8.
88. Greenough A. The TORCH screen and intrauterine infections. Fetoplacental circulation in health and disease. Arch Dis Fetal Neonatal. 1994; 70: F163-5.
89. Thomson J, Sucharew H, Cruz AT, Nigrovic LE, Freedman SB, Garro AC, *et al*, for the Pediatric Emergency Medicine Collaborative Research Committee (PEM CRC) HSV Study Group. Cerebrospinal Fluid Reference Values for Young Infants Undergoing Lumbar Puncture. Pediatrics Mar 2018, 141 (3) e20173405. Pediatrics. 2018; 141 (3): e2017405. <https://doi.org/10.1542/peds.2017-3405>

APÊNDICES

Apêndice 1- Descrição dos quadros clínico- laboratoriais dos pacientes com infecção congênita detectada pela realização de testes moleculares no LCR dos recém-nascidos incluídos no estudo

- 1) Paciente do sexo masculino, no primeiro dia de vida, foi submetido à coleta de LCR por ter sido exposto à Sífilis na gestação. Apresentava LCR (amostra número 1) com pleocitose e hiperproteínoorraquia. A N-PCR apresentou identificação de genoma de **VZV**. Porém, não apresentou quaisquer sinais ou sintomas associados a esta infecção.
- 2) Paciente do sexo feminino, no primeiro dia de vida apresentou desconforto respiratório. Por esse motivo, foi submetido à triagem infecciosa, incluindo coleta de LCR (com Hipótese diagnóstica inicial de Sepsis). O LCR (amostra número 3) tinha hiperproteínoorraquia, mas com celularidade normal. Quanto à N-PCR realizada, a identificação de **VZV** foi positiva, embora o paciente não tivesse outros sinais além da taquipnéia.
- 3) Paciente de 17 dias de vida, sexo feminino, apresentava diagnóstico inicial de sepsis. Por esse motivo, foi coletado LCR (amostra número 8), que demonstrava hiperproteínoorraquia, hipoglicorraquia e pleocitose. Além disso, a PCR em tempo real identificou o genoma do vírus **Zika**. Ainda assim, esta paciente não tinha qualquer malformação aparente em SNC, nem diagnóstico de microcefalia.
- 4) Paciente com dois dias de vida, sexo feminino. Apresentava hidrocefalia desde o nascimento e, por isso, foi colhido LCR (amostra de número 20) com hiperproteínoorraquia, hipoglicorraquia e celularidade normal. Além disso, a PCR em tempo real identificou o genoma do vírus **Zika**.
- 5) RN com 24 horas de vida, sexo masculino, apresentava quadro clínico sugestivo de Sepsis e, por esse motivo, teve seu LCR coletado (amostra número 37), com hiperproteínoorraquia e celularidade normal. Na N-PCR, foi identificado o genoma do **Parvovírus B-19**.

- 6) Paciente do sexo feminino, com 18 dias de vida, foi submetido à punção líquórica (amostra número 43) por um diagnóstico inicial de infecção sem causa definida até então. Apresentou detecção positiva para dois patógenos (coinfecção): **VZV e Parvovírus B-19**. Além disso, apresentava hiperproteinorraquia, hipoglicorraquia e pleocitose.
- 7) Neonato do sexo feminino teve, aos dois dias de vida, diagnóstico inicial de sepse, por isso, foi coletado LCR (amostra número 48), com as seguintes características: a PCR em tempo real com detecção positiva para o vírus **Zika**, sem alterações de celularidade e bioquímica.
- 8) Paciente do sexo masculino, com 16 dias de vida, com suspeita de meningite. Por esse motivo, foi coletado LCR (amostra número 53): apresentou identificação positiva para **CMV**, além de sintomas típicos dessa afecção: crise convulsiva, hemissíndrome deficitária à esquerda, síndrome hipotônica axial, síndrome hipertônica apendicular, posteriormente retardo do desenvolvimento neuro-psico-motor (RDNPM).
- 9) Paciente do sexo masculino, com quatro dias de vida, teve seu LCR (amostra número 57) coletado, por apresentar microcefalia ao nascer. Além de hiperproteinorraquia e pleocitose, a N-PCR veio positiva para **Toxoplasmose** (mãe era suscetível, segundo sorologias coletadas durante a gestação). No ultrassom transfontanela, apresentava “golf Ball”, redução da espessura do parênquima cerebral, aumento do espaço subaracnoideo, redução de sulcos e giros; disgenesia do corpo caloso.
- 10) Paciente do sexo masculino, com exposição à Sífilis na gestação, teve seu LCR coletado (amostra 58) aos dois dias de vida, demonstrando hiperproteinorraquia, celularidade normal, VDRL negativo e detecção positiva para **Toxoplasmose**. Ultrassom morfológico sem alterações. Mãe tinha tido TVP durante a gestação e, por isso, recebeu, além da Benzetacil, Enoxiparina. Este paciente era assintomático ao nascer.
- 11) Paciente do sexo masculino, nasceu com Espinha Bífida/ Mielomeningocele lombosacra rota/ Síndrome de Arnold Chiari Tipo II e Hidrocefalia. Foi submetido à punção líquórica (amostra número 61) aos

- 13 dias de vida e apresentou detecção positiva para o vírus **Zika** (PCR tempo real), hiperproteínoorraquia e pleocitose.
- 12) Paciente do sexo feminino, com 17 dias de vida, teve seu LCR colhido (amostra de número 64) devido a Malformação de Arnold Chiari tipo II / Espinha Bífida lombar com Hidrocefalia, teve detecção positiva para **Parvovírus B-19**. Apresentou bioquímica líquórica normal, porém com celularidade aumentada. Teve paraparesia flácida predominante à direita e dilatação ventricular leve no ultrassom transfontanela (USTF) e Tomografia computadorizada (CT) de crânio.
- 13) Paciente do sexo feminino, com diagnóstico de Encefalocele occipital e Microcefalia desde o pré-natal (ultrassom gestacional), cujo LCR (amostra 66) colhido aos 14 dias de vida, apresentava pleocitose e hiperproteínoorraquia, também teve detecção positiva de DNA de **Parvovírus B-19** pela N-PCR.
- 14) RN do sexo masculino teve coleta de LCR (amostra 116) no primeiro dia de vida devido a exposição a Sífilis na Gestação. A N-PCR veio positiva para **HSV-1**, com celularidade normal e hiperproteínoorraquia. Fez ultrassom transfontanela, que teve resultado normal.
- 15) Neonato do sexo masculino em que foi colhido o LCR (amostra 117) no segundo dia de vida devido a exposição a Sífilis na Gestação. A N-PCR veio positiva para **HSV-1**, com a presença de pleocitose e hiperproteínoorraquia no LCR.
- 16) Paciente do sexo masculino, que foi exposto a Sífilis durante a gestação, teve seu LCR colhido aos três dias de vida (amostra número 124), em que houve detecção positiva de DNA de **VZV** pela N-PCR, além da presença de hiperproteínoorraquia e pleocitose. Realizados quatro USTF (devido ao extremo baixo peso ao nascer- P=1140g; e prematuridade- IG=31 semanas + 2 dias): todos sem alterações.

ANEXOS

ANEXO 1: TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

PESQUISA: “DIAGNÓSTICO DE INFECÇÕES CONGÊNTAS E NEONATAIS UTILIZANDO O TESTE TORCH POR BIOLOGIA MOLECULAR EM LÍQUIDO CEFALORRAQUIDIANO”

RESPONSÁVEL PELA PESQUISA: Suzana Ferreira Zimmerman

ORIENTADOR: Prof Dr Sérgio Tadeu Martins Marba

CO- ORIENTADORA: Profa. Dra. Sandra Helena Alves Bonon

NÚMERO DO CAAE: 86760218.3.0000.5404

Seu filho (a) / familiar / dependente está sendo convidado (a) a participar como voluntário (a) de uma pesquisa. Este documento, chamado Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, visa assegurar os direitos e deveres dele como participante e é elaborado em duas vias, uma que deverá ficar com você e outra com o pesquisador.

Por favor, leia com atenção e calma, aproveitando para esclarecer as dúvidas. Se houver perguntas antes ou mesmo depois de assiná-lo, você poderá esclarecê-las com o pesquisador. Se preferir, pode levar para casa e consultar seus familiares ou outras pessoas antes de decidir participar. Não haverá nenhum tipo de penalização ou prejuízo se não aceitar participar ou retirar a autorização em qualquer momento.

PROCEDIMENTO:

Para participar do estudo, você está sendo convidado a autorizar que a sobra de amostra de líquido coletado de seu filho (a) / familiar / dependente, que seria descartada, possa ser testada para outros exames. Esta amostra já foi colhida e gostaríamos de utilizá-la para fazer estes exames. Estes exames são chamados de biologia molecular e eles podem testar se na amostra existe a presença de vírus que podem ou não ser prejudiciais à saúde de seu filho (a) / familiar / dependente. Este consentimento inclui também a autorização para o uso de dados do prontuário médico do participante.

Esclarecemos que a participação de seu familiar / dependente é totalmente voluntária, podendo você recusar a participação dele (a), ou mesmo desistir a qualquer momento, sem que isto acarrete quaisquer gastos ou prejuízo a você ou ao participante.

Deixamos claro também que caso não autorize a participação de seu filho (a) / familiar / dependente, sua amostra será destruída.

Esclarecemos ainda, que as informações serão utilizadas somente para os fins desta pesquisa e se for utilizada para outros estudos em pesquisas futuras, somente

ocorrerá através do seu consentimento em outro projeto e com assinatura de um novo Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. Mas para isso você deverá deixar assinalada essa opção neste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido e serão tratados com o mais absoluto sigilo.

JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS:

Alguns microrganismos podem ser transmitidos da mãe para o bebê durante a gestação ou após o nascimento, e podem causar diversos problemas à saúde. Por este motivo, este estudo poderá auxiliá-lo e também a outros pacientes.

Assim, os objetivos desta pesquisa são: Através da técnica de Reação em Cadeia da Polimerase, detectar a presença de microrganismos chamados TORCH: Toxoplasmose, Sífilis, Rubéola, Sarampo, Varicela Zoster, Parvovírus B19, Herpes Simplex 1 e 2, Citomegalovírus e Vírus Zika em amostras de líquido de pacientes com até 28 dias de vida atendidos no Hospital da Mulher Dr. José Aristodemo Pinotti – Centro de Atenção Integral à Saúde da mulher (CAISM), em Campinas/SP. Com os resultados será possível avaliar a ocorrência destas infecções na população alvo deste estudo.

As amostras somente serão utilizadas após a assinatura do familiar/responsável no Termo de Consentimento. Esta colaboração em muito auxiliará o tratamento dos pacientes que apresentam resultados dos exames positivos para algum dos microrganismos em estudo, evitando o agravamento da doença e complicações que possam vir a ocorrer.

DESCONFORTO E RISCOS:

O projeto não oferecerá riscos previsíveis para os participantes, pois será utilizada uma alíquota da amostra de líquido já coletada para a realização dos exames de rotina. Não será realizada nenhuma coleta somente para esta pesquisa.

BENEFÍCIOS:

O diagnóstico molecular proposto pelo estudo não modificará em tempo hábil o protocolo de tratamento da instituição de modo a beneficiar o participante do estudo.

ACOMPANHAMENTO E ASSISTÊNCIA:

A Instituição fará todo o acompanhamento caso necessário e, todos os resultados obtidos com esta pesquisa serão transmitidos para a equipe médica e serão registrados em seu prontuário médico, pois se necessário, condutas serão tomadas, caso os exames sejam positivos.

INDENIZAÇÃO E ASSISTÊNCIA GRATUITA:

Você terá garantia ao direito a indenização diante de eventuais danos decorrentes da pesquisa.

LOCAL DE ATENDIMENTO:

Unidade de Emergência Referenciada/Hospital de Clínicas/Universidade Estadual de Campinas (UER/HC/UNICAMP) – Rua: Carlos Chagas, 18 - Cidade Universitária, Campinas – SP – Pronto Socorro/HC – fones: 19 3521-8770 | 3521-8771 | 3521-8772 (24 horas por dia, 7 dias por semana).

SIGILO E PRIVACIDADE:

Você tem a garantia de que a identidade do seu filho (a) / familiar / dependente será mantida em sigilo e que nenhuma informação será dada a outras pessoas que não façam parte da equipe de pesquisadores. Na divulgação dos resultados desse estudo, os nomes dos voluntários não serão citados.

Os resultados dos testes poderão ser arquivados em no prontuário médico. Após a realização dos testes nas amostras coletadas, os frascos serão desprezados.

RESSARCIMENTO:

Não haverá pagamento de despesas e nenhuma forma de reembolso de dinheiro, já que com a participação na pesquisa você não vai ter nenhum gasto como, por exemplo, transporte, alimentação, diárias etc.

O COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA (CEP):

O papel do CEP é avaliar e acompanhar os aspectos éticos de todas as pesquisas envolvendo seres humanos. A Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP) tem

por objetivo desenvolver a regulamentação sobre proteção dos seres humanos envolvidos nas pesquisas. Desempenha um papel coordenador da rede de Comitês de Ética em Pesquisa (CEPs) das instituições, além de assumir a função de órgão consultor na área de ética em pesquisas.

Em caso de denúncias ou reclamações sobre sua participação e sobre questões éticas do estudo, você poderá entrar em contato com a secretaria do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da UNICAMP das 08:30hs às 11:30hs e das 13:00hs às 17:00hs na Rua: Tessália Vieira de Camargo, 126; CEP 13083-887 Campinas – SP; telefone (19) 3521-8936 ou (19) 3521-7187; e-mail: cep@fcm.unicamp.br.

ARMAZENAMENTO DO MATERIAL BIOLÓGICO:

As amostras poderão ou não ser armazenadas em biorrepositório após o estudo, se eu optar por uma das alternativas abaixo relacionadas:

(☐) Autorizo a participação de meu filho (a) / familiar / dependente no estudo, porém **NÃO AUTORIZO** o armazenamento de seu material biológico devendo o mesmo ser destruído ao final desta pesquisa;

(☐) Autorizo a participação de meu filho (a) / familiar / dependente no estudo, e **AUTORIZO** o armazenamento de seu material biológico sendo necessário **UM NOVO** consentimento a cada nova pesquisa, que deverá ser aprovada pelo CEP institucional e, se for o caso, pelo CONEP.

Você a qualquer tempo e sem quaisquer gastos ou prejuízos, no caso de desistência, poderá retirar o consentimento da guarda e utilização do material biológico armazenado. Neste caso, o material será destruído.

Em caso de falecimento ou condição incapacitante do responsável pelo participante, os direitos sobre o material armazenado deverão ser dados a:

_____.

(Favor indicar o nome de uma pessoa a ser contatada).

Caso aceite a participação do seu filho (a) / familiar / dependente no estudo, iremos consultar o prontuário médico do mesmo para obtenção de dados, garantimos que será guardado sigilo sobre os dados coletados no prontuário.

CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO:

Após ter sido esclarecimento sobre a natureza da pesquisa, seus objetivos, métodos, benefícios previstos, potenciais riscos e o incômodo que esta possa acarretar, aceito participar:

Nome _____ do _____ (a) _____ participante:

_____.

Data: ____/____/____

(Assinatura do responsável pelo participante)

RESPONSABILIDADE DO PESQUISADOR:

Asseguro ter cumprido as exigências da resolução 466/2012 CNS/MS e complementares na elaboração do protocolo e na obtenção deste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. Asseguro, também, ter explicado e fornecido uma cópia deste documento ao participante. Informo que o estudo foi aprovado pelo CEP perante o qual o projeto foi apresentado e pela CONEP, quando pertinente. Comprometo-me a utilizar o material e os dados obtidos nesta pesquisa exclusivamente para as finalidades previstas neste documento ou conforme o consentimento dado pelo participante.

(Assinatura do pesquisador). Data ____/____/____

CONTATO: Caso o (a) senhor (a) tenha dúvidas ou necessite de maiores esclarecimentos poderá contatar: Dra. Suzana Ferreira Zimmerman, Rua Tessália Vieira de Camargo, 126, Cidade Universitária “Zeferino Vaz” – Faculdade de Ciências Médicas – Prédio do Centro de Pesquisa Clínica – CPC/FCM/UNICAMP, telefone (19) 3521-7734, suzanafz@unicamp.br.

ANEXO 2: LAUDO

UNICAMP


**LABORATÓRIO
DE VIROLOGIA**
FCM / UNICAMP
RESULTADOS DE TESTES MOLECULARES**INFECÇÕES CONGÊNITAS E NEONATAIS**

DADOS DO PACIENTE		
NOME RN de -----		
IDADE: -- dias		HC: -----
ESPECIALIDADE: Neonatologia	HOSPITAL: CAISM/UNICAMP	AMOSTRA: LÍQUOR

Painel Molecular para Infecções Congênitas e Neonatais

DATA DA COLETA	VÍRUS	RESULTADO
	HSV-1	
	HSV-2	
	VZV	
	EBV	
	CMV	
	Parvovírus B-19	
	Toxoplasmose	
	Vírus Zika	

VALOR DO ÍNDICE DE REFERÊNCIA:**NEGATIVO:** ausência do DNA/ RNA do patógeno pesquisado**POSITIVO:** presença do DNA/ RNA do patógeno pesquisado**O USO DE ANTIVIRAIS PODERÁ REDUZIR A SENSIBILIDADE DA DETECÇÃO**

- RESULTADOS FALSOS NEGATIVOS PODEM OCORRER EM PACIENTES EM USO DE ANTIVIRAIS OU OUTRAS MEDICAÇÕES.
- RESULTADOS FALSOS POSITIVOS PODEM OCORRER EM PACIENTES QUE TIVERAM ACIDENTE DE PUNÇÃO DURANTE A COLETA DO LCR – OS LEUCÓCITOS CONTAMINANTES PODEM CONTER VÍRUS LATENTES E O RESULTADO PODE NÃO SER INDICATIVO DE INFECÇÃO ATIVA (REPLICAÇÃO VIRAL)
- RESULTADO NEGATIVO NÃO EXCLUI A INFECÇÃO/DOENÇA. PACIENTES DEVEM SER MONITORIZADOS.

Data:-- /--/20--

Laboratório de Virologia/FCM/UNICAMP Centro de Pesquisa Clínica/FCM / ramal: 17734

Responsável: Dra. Sandra Helena Alves Bonon

E-mail: sbonon@unicamp.br / CRBio: 18.675/01-D - Matr. 22976-8

ANEXO 3 – Sequência de oligonucleotídeos usados para detectar os patógenos com genomas de DNA conforme metodologias de PCR e N-PCR

Patógeno	Primer Senso e Antisenso (5'-3')	Referências	Amplicom
TOXO	TGGGAGAAAAAGAGGAAGAGA	VIDIGAL <i>et al</i> , 2002	690
	TTCACTCCATCTCTCGTCTTC		178
	AAAGGAACTGCATCCGTTTCAT		
	GACCACGAACGCTTTAAAGAA		
HSV-1	ATCACGGTAGCCCGGCCGTGTGACA	SCHMUTZHARD <i>et al</i> , 2004	221
	CATACCGGAACGCACACACAC		
	CCATACCGACCACACCGACGA		138
	GGTAGTTGGTCGTTTCGCGCTG		
HSV-2	TCAGCCCATCCTCCTTCGGCAGTA	SCHMUTZHARD <i>et al</i> , 2004	184
	GATCTGGTACTCGAATGTCTCCG		
	AGACGTGCGGGTCGTACACG		100
	CGCGCGGTCCCAGATCGGCA		
CMV	ATGGAGTCCTCTGCCAAGAG	EHRNST <i>et al</i> , 1995	
	CAATACACTTCATCTCCTCG		
	GTGACCAAGGCCACGACGTT		167
	TCTGCCAGCACATCTTTCTC		
VZV	ACGGGTCTTGCCGGAGCTGGT	KURTZ, 1999	
	AATGCCGTGACCACCAAGTATAAT		
	ACCTTAAACTCACTACCAGT		280
	CTAATCCAAGGCGGGTGCAT		
B-19	CATWCAGACTTTGAGCAGGTTA	SANABANI <i>et al</i> , 2005	610
	TTATTGCCAGTTTTTCATAGTG		
	GTAATGTCA CCATTGCTGGTTAT		425
	CATWCAGACTTTGAGCAGGTTA		
EBV	AGACAATGGACTCCCTTA	EHRNST <i>et al</i> , 1995	
	ATCGTGGTCAAGGAGGTTCC		106
	ACTCAATGGTGTAAGACGAC		

ANEXO 4 – Sequência de oligonucleotídeos dos primers usados conforme metodologia de PCR em tempo real para detecção do vírus Zika

Para o vírus da **Zika** serão utilizados **os Primers**:

F: CCGCTGCCCCAACACAAG; R: CCACTAACGTTCTTTTGCAGACAT;

Sonda: FAM - AGCCTACCTTGACAAGCAGTCAGACACTCAA (Lanciotti, 2005)

Vírus Zika por PCR em Tempo Real

ANEXO 5 - Folha de Direitos de reprodução do artigo submetido à Revista Paulista de Pediatria

Copyright transfer form: Revista Paulista de Pediatria

Manuscript title: (SYSTEMATIC REVIEW ON MOLECULAR
DETECTION ON CONGENITAL AND NEONATAL INFECTIONS CAUSED BY TORCH AND SARS-COV
AGENTS IN NEWBORN'S CEREBROSPINAL FLUID)

Author(s):
SUZANA FERREIRA ZIMMERMAN
SANDRA HELENA ALVES BONON
SERGIO TADEU MARTINS MARA

To: Associação de Pediatria de São Paulo (SPSP)

1. Considering the fact that SPSP has agreed to publish the above mentioned manuscript, the authors transfer the copyright of the above mentioned manuscript to SPSP, granting an exclusive, royalty-free, perpetual license to publish, reproduce, and distribute the manuscript in all the forms and formats available or to be developed, including print, digital and electronic media; except for the conditions described in item

2. The authors may reproduce the manuscript, totally or in part, provided that they declare and refer to its publication in Revista Paulista de Pediatria. The authors retain the following rights:

- a) Reproduce the manuscript, totally or in part, in books or dissertations of their own authorship.
- b) Reproduce the manuscript, totally or in part, in classes or courses of educational institutions.
- c) Reuse figures or tables created for the above mentioned manuscript in others studies of their own authorship, provided that it is approved by the coauthors of the original manuscript.

3. The authors ensure that:

- a) They are the only authors and owners of copyright. If the manuscript contains material from third parties, the authors obtained previous permission to reproduce it.
- b) All the information described in the above mentioned manuscript is accurate and true.
- c) No part of the manuscript violate any right of intellectual property or any other personal or institutional right.

ANEXO 6 – Parecer Consubstanciado do Comitê de Ética em Pesquisa



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DA EMENDA

Título da Pesquisa: DIAGNÓSTICO DE INFECÇÕES CONGÊNITAS E NEONATAIS UTILIZANDO O TESTE TORCH POR BIOLOGIA MOLECULAR EM LÍQUIDO CEFALORRAQUIDIANO

Pesquisador: SANDRA HELENA ALVES BONON

Área Temática:

Versão: 3

CAAE: 86760218.3.0000.5404

Instituição Proponente: Hospital da Mulher Prof. Dr. José Aristodemo Pinotti - CAISM

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.412.322

Apresentação do Projeto:

As informações contidas nos campos "Apresentação do Projeto", "Objetivo da Pesquisa" e "Avaliação dos Riscos e Benefícios" foram obtidas dos documentos apresentados para apreciação ética e das informações inseridas pelo Pesquisador Responsável do estudo na Plataforma Brasil.

Resumo: As infecções na gravidez e o risco de infecção fetal dependem principalmente do tipo de infecção e do tempo de gestação no momento da infecção. Geralmente, os quadros mais graves são as adquiridas no primeiro trimestre da gravidez, pois é prejudicial à formação do bebê, mas os outros períodos também podem ser perigosos. Algumas infecções na gravidez que podem causar risco aos bebês são as chamadas infecções de TORCH, devido às iniciais de seus nomes: Toxoplasmose, Rubéola, Citomegalovírus, Herpes simplex tipos 1 e 2 e Outras, como a Sífilis, Varicela zoster (VZV), Parvovírus B19 e o Sarampo, que são causas conhecidas de incapacidades de desenvolvimento neurológico a longo prazo, dentre outras manifestações, e a mais recente, a infecção pelo vírus Zika, pelas alterações fetais observadas em decorrência de gestantes infectadas por esse patógeno, em qualquer idade gestacional. As consequências das infecções congênitas são natimortos, problemas de desenvolvimento físico e neurológico, malformações congênitas, crianças prematuras, retardo do crescimento uterino, danos cerebrais graves, deficiência visual e defeitos congênitos como a microcefalia. O diagnóstico das infecções congênitas com base apenas em dados sorológicos, alguns deles não disponíveis na rotina laboratorial, e sorologia positiva (IgM e IgG) não constitui prova inequívoca da transmissão vertical. A detecção do DNA/RNA 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

Página 01 de 06



Continuação do Parecer: 3.412.322

partir de líquido cefalorraquidiano (LCR) por métodos moleculares constitui um marcador do envolvimento da infecção congênita no sistema nervoso, mas seu valor prognóstico é desconhecido. Diante do exposto, pretendemos identificar a frequência dos patógenos propostos neste estudo em amostras de LCR de recém-nascidos de 1 a 28 dias com suspeita de infecção congênita atendidos no Hospital da Mulher Prof. Dr. José Aristodemo Pinotti – Centro de Atenção Integral à Saúde da mulher (CAISM), Campinas/SP, com suspeita de infecção congênita utilizando métodos moleculares. Serão estudadas a priori 100 amostras de LCR de 100 que tenham coletado esse LCR inicialmente para a realização do diagnóstico citológico e bioquímico a critério médico. Após a liberação dos resultados destes exames, a sobra deste material ficará armazenada no Laboratório de Líquidos Biológicos do Departamento de Patologia Clínica do HC/UNICAMP e, ao invés de ser descartado, será reutilizado nesta pesquisa. Os pacientes serão incluídos no estudo conforme demanda e as amostras coletadas serão encaminhadas ao Laboratório de Virologia/FCM e a metodologia será aplicada somente após assinatura do TCLE pelo familiar/responsável pelo participante do estudo. O material será submetido à extração do DNA e RNA e servirá para as análises moleculares dos patógenos TORCH. Será realizada uma análise descritiva dos pacientes e os dados com os resultados serão incluídos em uma tabela no Excel. Será realizada estatística descritiva utilizando medidas de tendência central (média, mediana e frequências) e medidas de dispersão de dados (intervalos de desvio padrão e quartis). Por sua vez, serão obtidos testes de significância estatística para as diferenças entre as médias utilizando o teste t-student para variáveis contínuas com um nível de significância.

Objetivo da Pesquisa:

OBJETIVO PRIMÁRIO:

- Identificar os principais patógenos causadores de infecção congênita e neonatal em amostras de líquido cefalorraquidiano (LCR) de recém-nascidos com suspeita destas infecções, atendidos no Hospital da Mulher Prof. Dr. José Aristodemo Pinotti – Centro de Atenção Integral à Saúde da mulher (CAISM), Campinas/SP, através da utilização de metodologia molecular.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Esta versão é emenda ao projeto aprovado pelo Parecer Consubstanciado CEP n.º 2.692.992 de 05 de junho de 2018. Com a justificativa: "Esta ementa solicita a inclusão da aluna Suzana Ferrel Zimmerman como pesquisadora e aluna de doutorado do curso de pós-graduação em saúde da criança e do adolescente. O orientador será dr. Sergio Marba e coorientadora Dra. Sandra Bonon. Ingresso em 08/2019. Foram feitas modificações no cronograma." * Início previsto para agosto/2019.

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

Página 03 de 06



Continuação do Parecer: 3.412.322

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Foi anexado o seguinte documento:

1- PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_1342200_E1.pdf

Recomendações:

Sem.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Projeto considerado aprovado.

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).