

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Instituto de Ciências Biológicas

Programa de Pós-Graduação em Microbiologia

Victor Valadares Summers Albuquerque

**INVESTIGAÇÃO DE VÍRUS CAUSADORES DE INFECÇÕES NO SISTEMA  
NERVOSO CENTRAL, EM PACIENTES PEDIÁTRICOS, ATENDIDOS EM UM  
HOSPITAL DE REFERÊNCIA DE BELO HORIZONTE, MINAS GERAIS.**

Belo Horizonte  
2024

Victor Valadares Summers Albuquerque

**INVESTIGAÇÃO DE VÍRUS CAUSADORES DE INFECÇÕES NO SISTEMA  
NERVOSO CENTRAL, EM PACIENTES PEDIÁTRICOS, ATENDIDOS EM UM  
HOSPITAL DE REFERÊNCIA DE BELO HORIZONTE, MINAS GERAIS.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-  
- graduação em Microbiologia da  
Universidade Federal de Minas Gerais, como  
requisito final para obtenção do título de  
mestre.

Orientadora: Dra. Betânia Paiva Drumond.

Belo Horizonte

2024

043

Albuquerque, Victor Valadares Summers.

Investigação de vírus causadores de infecções no sistema nervoso central, em pacientes pediátricos, atendidos em um hospital de referência de Belo Horizonte, Minas Gerais [manuscrito] / Victor Valadares Summers Albuquerque. – 2024.

100 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientadora: Dra. Betânia Paiva Drumond.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia.

1. Microbiologia. 2. Meningoencefalite. 3. Viroses do Sistema Nervoso Central. 4. Líquido Cefalorraquidiano. 5. Criança. I. Drumond, Betânia Paiva. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. III. Título.

CDU: 579



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA

### ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO

ATA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE **VICTOR VALADARES SUMMERS ALBUQUERQUE**

Nº REGISTRO: 2022662223

Às 14:00 horas do dia **28 de maio de 2024**, reuniu-se, remotamente, a Comissão Examinadora composta pelas Dras. Ana Gabriella Stoffella Dutra (Pós- doutoranda do Departamento de Microbiologia/ICB/UFMG), Adriana Luchs (Instituto Adolfo Lutz) e a Profa. Dra. Betânia Piava Drumond (Orientadora), para julgar o trabalho final "**Investigação de vírus causadores de infecções no sistema nervoso central, em pacientes pediátricos, atendidos em um hospital de referência de Belo Horizonte, Minas Gerais**", do aluno **Victor Valadares Summers Albuquerque**, requisito final para a obtenção do Grau de **MESTRE EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: MICROBIOLOGIA**. Abrindo a sessão, a Presidenta da Comissão, Profa. Dra. Betânia Piava Drumond - Orientadora, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra ao candidato, para a apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos Examinadores, com a respectiva defesa do candidato. Logo após, a Comissão se reuniu, sem a presença do candidato e do público, para julgamento e expedição de resultado final. O candidato foi considerado **APROVADO**. O resultado final foi comunicado publicamente ao candidato pela Presidenta da Comissão. Nada mais havendo a tratar, a Presidenta encerrou a reunião e lavrou a presente ata, que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. O candidato tem 60 (sessenta) dias, a partir desta data, para entregar a versão final da dissertação ao Programa de Pós-graduação em Microbiologia da UFMG e requerer seu diploma.

Belo Horizonte, 28 de maio de 2024

Membros da banca:

Dra. Ana Gabriella Stoffella Dutra

Dra. Adriana Luchs

De acordo:

Profa. Dra. Betânia Piava Drumond

(Orientadora)

Prof. Dr. Daniel de Assis Santos

(Coordenador do Programa de Pós-graduação)

em Microbiologia)



Documento assinado eletronicamente por **Betania Paiva Drumond, Professora do Magistério Superior**, em 03/06/2024, às 07:48, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Daniel de Assis Santos, Coordenador(a) de curso de pós-graduação**, em 03/06/2024, às 08:33, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Adriana Luchs, Usuário Externo**, em 03/06/2024, às 09:19, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Ana Gabriella Stoffella Dutra, Usuário Externo**, em 03/06/2024, às 20:55, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [https://sei.ufmg.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador 3240425 e o código CRC 9A866D42.

## **Agradecimentos**

Começo esta seção da dissertação expressando minha gratidão à UFMG, ao Programa de Pós-graduação em Microbiologia e aos professores vinculados ao programa por proporcionarem uma formação intensa e de excelência, que estimulam o desenvolvimento dos seus estudantes. Agradeço às agências de fomento, FAPEMIG, CAPES e CNPq, por permitirem, por meio de financiamento, a realização deste estudo.

Expresso também minha gratidão a todos os estudantes do Laboratório de Vírus e aos professores que compõem o laboratório: Betânia, Erna, Giliane, Jonatas e Rodrigo. Foi uma experiência gratificante conviver e aprender tanto com pessoas que amam e são referências no que fazem. Em especial, agradeço à professora Betânia, que me acolheu em seu grupo de braços abertos e orientou este projeto, assim como a todos os estudantes que integram o ArboTeam. Vocês foram fundamentais ao longo destes 2 anos, e sou imensamente grato por todo o suporte, ensinamentos e experiências compartilhadas.

Agradeço à Dra. Aline, às acadêmicas de medicina e à equipe do HIJPII, que deram suporte com a coleta dos LCRs, dos TCLEs e dos dados dos prontuários, permitindo a realização deste trabalho. Também expresso minha gratidão a todos os pacientes e responsáveis legais que doaram as amostras utilizadas neste estudo. Aos ex-alunos que contribuíram com as pesquisas relacionadas à vigilância de vírus em LCR de crianças atendidas no HIJPII, meu sincero agradecimento.

Agradeço ao projeto de extensão Ciência pra Você - UFMG, ao professor Frederico Soriani e a todos os estudantes que compõem o projeto, pela oportunidade de desenvolver habilidades de comunicação científica e produzir conteúdo para a página.

Aos colegas do PPGM, com quem tive o prazer de conhecer e conviver durante a realização deste estudo agradeço pelos momentos de café com desabafo e pelas amizades construídas.

Aos amigos de Salvador, que mesmo longe estiveram ao meu lado durante o processo e deram apoio quando precisei.

A minha família, especialmente à Adriana, minha mãe, que mesmo sendo

mãe solteira e cuidando de duas crianças, nunca deixou de estudar e sempre estimulou seus filhos a nunca parar de buscar conhecimento. Seu empenho e determinação são fontes constantes de inspiração. Aos meus avós, que desempenharam um papel fundamental e permitiram que eu pudesse estudar e tivesse o suporte necessário.

Expresso minha gratidão também a toda comunidade de pessoas trans, pelo legado de luta e conquista, que permitiu que eu pudesse chegar a ocupar espaços dentro de ambientes acadêmicos e educacionais, conhecidos por serem tão excludentes para a nossa população. Seguiremos avançando.

## Resumo

Infecções no sistema nervoso central podem ser causadas por vírus, bactérias, fungos e parasitos. Dentre os vírus, diversos agentes podem estar associados a complicações como meningites e encefalites. Em Minas Gerais, entre os anos de 2007 e 2022, foram notificados 4.294 casos de origem viral, dos quais 2.031 (47,30%) foram reportados em crianças de zero a 14 anos. As crianças são consideradas especialmente mais afetadas e a infecção em indivíduos previamente saudáveis tende a ser autolimitada. Na maior parte dos casos o vírus não é identificado, comprometendo a geração de dados relacionados à vigilância epidemiológica. O estudo investigou a presença de Herpes humano dos tipos 1, 2 e 3; enterovírus, dengue, Zika e outros orthoflavivírus; chikungunya e coronavírus (SARS-CoV-2) em 196 amostras de LCR de origem pediátrica, coletadas no Hospital Infantil João Paulo II, entre o período de 2022 e 2023. A triagem para material genético viral aconteceu por qPCR ou por RT-qPCR. Houve 10 (5%) resultados positivos para a presença de ENTV. Não houve resultados positivos para os demais vírus. Os dados epidemiológicos e clínicos fornecidos nos prontuários dos pacientes que testaram positivo para ENTV foram analisados para o entendimento sobre a população estudada. Este trabalho se apresenta como uma continuidade de estudos anteriores e além das análises descritas acima, os pacientes que apresentaram resultados positivos para ENTV (n=23) e para DENV (n=22) entre os anos de 2014 e 2019, tiveram dados dos prontuários coletados e analisados. Entre os sinais e sintomas avaliados, foi possível observar diferença na presença de convulsão, uma vez que um paciente com ENTV apresentou a quadro, frente a 10 pacientes com DENV ( $p= 0,0039$ ). Já entre os padrões hematimétricos avaliados entre os dois grupos, os pacientes com DENV apresentaram valores menores de hemoglobina, HCM, VCM e hematócrito e maiores quantificações de RDW. Apesar das diferenças, os valores encontrados nos dois grupos estavam dentro dos padrões de referência. Este estudo ressaltou a importância dos enterovírus nas infecções do sistema nervoso central de crianças, e a comparação entre os desdobramentos de infecções por DENV e por ENTV revelou diferenças significativas nos sintomas e nos resultados de hemograma, apontando para a importância de mais pesquisas e da utilização de testes laboratoriais como fonte de ferramenta para a compreensão da patogênese.

Palavras-chave: meningoencefalite; infecção viral; líquido cefalorraquidiano; crianças; Minas Gerais.

## **Abstract**

Infections in the central nervous system can be caused by viruses, bacteria, fungi, and parasites. Among viruses, various agents can be associated with complications such as meningitis and encephalitis. In Minas Gerais, between the years 2007 and 2022, 4,294 cases of viral origin were reported, of which 2,031 (47.30%) were reported in children aged zero to 14 years. Children are considered to be particularly affected, and infections in previously healthy individuals tend to be self-limiting. In most cases, the virus is not identified, compromising the generation of data related to epidemiological surveillance. Herpes simplex virus 1 and 2, varicella-zoster virus; enterovirus, dengue, Zika and other orthoflaviviruses; chikungunya and coronavirus, in 196 pediatric-origin CSF samples collected at Hospital Infantil João Paulo II between 2022 and 2023. Viral genetic material was sought through qPCR or RT-qPCR. There were 10 positive results for the presence of ENTV. There were no positive results for the other viruses. Epidemiological and clinical data provided in the medical records of patients who tested positive for ENTV were analyzed to understand the study population. This work builds upon previous studies, and in addition to the analyses described above, patients who tested positive for ENTV (n=23) and for DENV (n=22) between 2014 and 2019 had their medical record data collected and subjected to statistical tests. Among the signs and symptoms evaluated, a difference in the presence of convulsions was observed, as one patient with ENTV presented the condition, compared to 10 patients with DENV ( $p=0.0039$ ). Regarding the hematimetric patterns evaluated between the two groups, patients with DENV showed lower values of hemoglobin, MCH, MCV, and hematocrit, and higher quantifications of RDW. Despite the differences, the values found in the two groups were within reference standards. This study emphasized the importance of enteroviruses in central nervous system infections in children, highlighting the comparison between the outcomes of infections by DENV and ENTV, which revealed significant differences in symptoms and hematogram results, pointing to the importance of further research and the use of laboratory tests as a tool for understanding pathogenesis.

**Keywords:** meningoencephalitis; viral infection; cerebrospinal fluid; children; Minas Gerais.

## Lista de figuras

Figura 1 – Representação da barreira hematoencefálica.....	13
Figura 2 - Demonstração gráfica das vias que os vírus utilizam para alcançar o SNC. .....	15
Figura 3 – Meningites virais por idade no Brasil e em MG entre os anos de 2007 a 2022 .....	21
Figura 4 - Microscopia eletrônica de cultura de células infectadas por Simplexvirus humana alpha 1.....	25
Figura 5 - Representação de partícula viral do enterovírus 71, exemplo de picornavírus.....	28
Figura 6 - Representação estrutural de partícula viral de um Orthoflavivírus.....	30
Figura 7 - Microscopia eletrônica de transmissão com registro de partícula viral de vírus pertencente à família Togaviridae .....	34
Figura 8 - Ilustração da partícula viral do SARS-CoV-2. ....	36
Figura 9 - Esquematização do fluxo de trabalho adotado ao longo do desenvolvimento do presente estudo.....	42
Figura 10 - Esquema do fluxo de coleta e tratamento dos dados obtidos nos prontuários dos pacientes que tiveram resultados positivos para DENV ou para ENTV entre os anos de 2014 até 2019. ....	56
Figura 11 - Gráficos representando presença ou ausência de sintomas relatados durante o período de internação, dos pacientes que testaram positivo para ENTV..	63
Figura 12 - Comparação da presença e ausência de sintomas entre pacientes com DENV ou com ENTV.....	68

## Lista de tabelas

Tabela 1 - Relação de microrganismos que infectam o SNC e as respectivas alterações em análise bioquímica e de celularidade do Líquor, identificadas em pacientes adultos. ....	17
Tabela 2 - Tabela apresentada em estudo de revisão de literatura sobre infecções virais em SNC no Brasil. ....	23
Tabela 3 - Relação de pesquisas prévias realizadas com pacientes pediátricos advindos do HIJPII .....	45
Tabela 4 -Relação das reações de RT-qPCR badeados em iniciadores e sondas utilizados neste estudo .....	51
Tabela 5 - Relação das reações de qPCR e RT-qPCR badeados em iniciadores uso de intercalante SYBR green utilizados neste estudo.....	51
Tabela 6 – Iniciadores utilizados na reação de PCR convencional para enterovírus.....	52
Tabela 7 - Comparação entre as metodologias para testagem de DENV .....	57
Tabela 8 - Identificadores das amostras e valores de Ct para cada uma das reações positivas.....	59
Tabela 9 - Padrões hematimétricos identificados nos pacientes que testarem positivo para ENTV.....	64
Tabela 10 - Padrões leucocitários identificados nos pacientes que testarem positivo para ENTV .....	66
Tabela 11 - Quantificações bioquímicas e celulares em LCR, identificados nos pacientes que testarem positivo para ENTV. ....	66

## Lista de siglas e abreviações

SNC - Sistema Nervoso Central;

LCR - Líquido cefalorraquidiano;

mm<sup>3</sup> - milímetros cúbicos;

SNP - Sistema Nervoso Periférico;

HSV-1 - *Simplexvirus humanalpha -1*

HSV-2 - *Simplexvirus humanalpha -2*

VZV - *Varicellovirus humanalpha-3*

°C - Graus Celsius;

mg/dL - miligramas por decilitro;

ENTV - enterovírus;

SARS-CoV-2 - *Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2*;

PCR - Reação em Cadeia da Polimerase;

qPCR - Reação em Cadeia da Polimerase quantitativa ou em tempo real;

RT-qPCR - Reação em Cadeia da Polimerase quantitativa ou em tempo real, com transcriptase reversa;

DENV - *Orthoflavivirus denguei*

ZIKV - *Orthoflavivirus zikaense*

YFV - *Orthoflavivirus flavi*

CHIKV - *Chikungunya virus*;

DNA - ácido desoxirribonucleico;

RNA - ácido ribonucleico;

dsDNA - ácido desoxirribonucleico de fita

dupla

nm – nanômetros;

mg/dL – miligramas por decilitro

g/dL – gramas por decilitro

Arbovirus - *Arthropod borne viroses*;

ssDNA - ácido desoxirribonucleico de fita simples;

COVID-19 - *Coronavirus Disease-2019*;

µL – microlitros;

mL – mililitros;

CO<sup>2</sup> - Gás carbônico;

VCM – Volume Corpuscular Médio;

HCM – Hemoglobina Corpuscular Média;

CHCM – Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média;

RDW – *Red cell distribution width*;

fL – femtolitros;

b – bases;

pb – pares de bases;

Ct – *cycle threshold*;

## Sumário

1. Introdução.....	12
1.1. Sistema nervoso central e mecanismos de invasão por vírus.....	12
1.2. Inflamações e infecção no SNC .....	16
1.3. Diagnóstico .....	17
1.4. Panorama geral das meningites e meningites virais .....	19
1.5. <i>Orthoherpesviridae</i> .....	24
1.5.1. <i>Simplexvirus humanalpha 1</i> (HSV-1) e <i>Simplexvirus humanalpha 2</i> (HSV-2) .....	26
1.5.2. <i>Varicellovirus humanalpha 3</i> (VZV).....	27
1.6. <i>Picornaviridae</i> .....	27
1.6.1. <i>Enterovirus</i> .....	28
1.7. <i>Orthoflaviviridae</i> .....	30
1.7.1. <i>Orthoflavivirus denguei</i> .....	32
1.7.2. <i>Orthoflavivirus zikaense</i> .....	32
1.8. <i>Alphavirus chikungunya</i> .....	33
1.9. Coronavírus da síndrome respiratória aguda grave 2 (SARS-CoV-2).....	35
2. Justificativa .....	38
3. Objetivos.....	40
3.1. Objetivo geral .....	40
3.2. Objetivos específicos.....	40
4. Materiais e métodos.....	41
4.1. Ética na pesquisa .....	41
4.2. Delineamento do Estudo .....	41
4.3. Coleta, transporte e armazenamento das amostras .....	42
4.4. Coleta de dados epidemiológicos e clínicos .....	43
4.5. Extração de ácidos nucleicos .....	43
4.5.1. Extração de RNA .....	43
4.5.2. Extração de DNA .....	43
4.6. Controle das extrações.....	44
4.7. Determinação do método para testagem de DENV, a partir da Investigação da sensibilidade de diferentes testes de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) .....	44
4.8. Amplificação do material genético .....	49
4.9. Eletroforese em gel de poliacrilamida e purificação das bandas de Gel .....	53
4.10. Sequenciamento do material genético amplificado.....	54

4.11. Caracterização dos pacientes .....	54
4.12. Análise retrospectiva dos dados de prontuário de crianças com casos confirmados de ENTV e de DENV .....	54
5. Resultados.....	57
5.1. Avaliação para determinação da metodologia para testagem de PCR em DENV.....	57
5.2. Investigação molecular dos agentes etiológicos virais em LCR .....	58
5.3. Caracterização dos pacientes que testaram positivo para ENTV .....	60
5.4. Análise retrospectiva de dados dos prontuários dos pacientes diagnosticados com ENTV e com DENV entre 2014 e 2019 .....	66
6. Discussão .....	71
7. Conclusões.....	77
8. Referência bibliográfica .....	78
9. Material suplementar .....	90
.....	91
.....	92
.....	93
10. Participação e organização em eventos científicos e atividade de extensão.....	94

## 1. Introdução

### 1.1. Sistema nervoso central e mecanismos de invasão por vírus

O sistema nervoso central (SNC) compreende o encéfalo e a medula espinhal, que são revestidos pelas meninges e pelo líquido cefalorraquidiano (LCR) ou líquor. O LCR exerce funções importantes como a proteção contra choques mecânicos, fornece suporte para as estruturas presentes na região e espaço para artérias e veias (GHANNAM; AL KHARAZI, 2019). As meninges são subdivididas em três camadas membranosas, compostas por tecido conjuntivo: dura-máter; aracnoide e pia-máter (AMIDEI; TRESE, 2019).

A dura-máter, parte mais externa das meninges, é densa, fibrosa, pouco elástica e é compreendida em duas partes, a porção periosteal, que está aderida à parte interna do neurocrânio (calvária) e que é rica em fibroblastos, osteoblastos e colágeno. A porção meníngea, também fibrosa e que se localiza de maneira proximal ao tecido do encéfalo e apenas essa lâmina da dura-máter se estende para a medula espinhal. A aracnoide é uma membrana avascularizada que se localiza entre a dura-máter e a pia-máter. É na aracnoide que são formados os seios venosos, alongamentos da aracnoide que se estendem até a porção meníngea da dura-máter e são responsáveis por mediar o transporte do LCR que está presente no espaço subaracnóideo até o sistema venoso. A aracnoide também forma projeções fibrosas e semelhantes a teias de aranha, em direção a pia-máter, chamadas de trabéculas aracnoideas, que ligam o tecido da aracnoide com a pia-máter, juntas consideradas como leptomeninge. A pia-máter é a camada diretamente aderida ao encéfalo, que segue o contorno dos giros e sulcos cerebrais e apresenta duas subcamadas, a mais externa e rica em fibras colágenas e a mais interna, contendo fibras elásticas e reticulares (GHANNAM; AL KHARAZI, 2019).

Entre a aracnoide e a pia-máter é encontrado o espaço subaracnóideo, que é preenchido pelo LCR e atravessado por veias e artérias cerebrais. O LCR é produzido nos plexos coróides, contidos nos ventrículos cerebrais. O líquor é um fluido claro que circula no espaço subaracnóideo, é encontrado em volta de todo o SNC. Por estar em comunicação com os neurônios e ser drenado para o sangue, o LCR exerce papel fundamental na troca de nutrientes e metabólitos (MAHADEVAN,

2018).

A barreira hematoencefálica e a barreira sangue-líquido cefalorraquidiano regulam o ambiente cerebral e fazem com que moléculas grandes como proteínas, glicose e células, em geral, tenham dificuldade para transpassar e estejam presentes no LCR (Figura 1). Já a passagem de moléculas menores como vitaminas, nutrientes e íons são permitidas com facilidade (DAMKIER; BROWN; PRAETORIUS, 2013). Sob condições fisiológicas é possível encontrar traços de proteínas, imunoglobulinas e células do sistema imune no LCR. Nesses casos, a contagem normal de leucócitos apresenta tendência a não ser maior do que cinco células/mm<sup>3</sup> (SAKKA; COLL; CHAZAL, 2011).

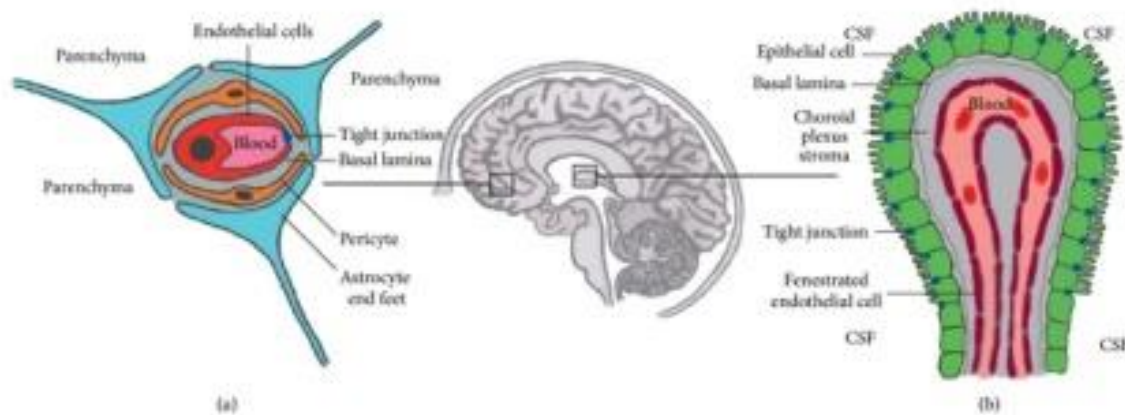


Figura 1 – Representação da barreira hematoencefálica (a), presente ao longo de todo o parênquima cerebral e composta por células endoteliais, circundadas por pericitos e astrócitos. Representação da barreira sangue-líquido cefalorraquidiano (b), encontrada nos plexos coróides. As células epiteliais e as células fenestradas realizam função de barreira, mas somente as fenestradas realizam a síntese de LCR. Tanto em (a) quanto em (b) as células são fortemente aderidas com o auxílio das junções de oclusão. Fonte: Dahm e colaboradores (2016).

No caso de doenças infecciosas, para chegar ao SNC o patógeno deve ser capaz de transpor a barreira hematoencefálica ou a barreira sangue-líquido cefalorraquidiano. Estas barreiras têm sua permeabilidade regulada pelas junções de oclusão em suas células endoteliais e epiteliais que utilizam, por exemplo, proteínas e moléculas de adesão que possuem características estruturais diversas (WOLBURG; LIPPOLDT, 2002). Em decorrência dessas características, patógenos apresentam variadas estratégias para acessar o SNC (KIM, 2008; RACANIELLO, 2006). A quebra das ligações das junções de oclusão ou a própria presença de algum agente infeccioso, são capazes de desencadear eventos de sinalização celular e intensa resposta inflamatória, que facilitam a migração de leucócitos e de

moléculas mediadoras da inflamação (DAHM *et al.*, 2016).

Os vírus podem utilizar estratégias para invadir o SNC que envolvem a invasão das células endoteliais presentes nas barreiras, como no caso dos enterovirus C (PV), Measles morbillivirus (MV) e alguns vírus pertencentes ao gênero *Orthoflavivirus*. Há também a possibilidade de que próprio quadro inflamatório facilite a chegada do vírus ao SNC como exemplificado nas infecções pelo vírus do Nilo ocidental (WNV) (Figura 1). A estratégia conhecida como “cavalo de Troia”, usada como rota de penetração por agentes como o vírus da imunodeficiência humana 1 (HIV-1), pode se beneficiar do aumento da permeabilidade descrito anteriormente (Figura 2 a) (MCGAVERN; KANG, 2011; MILLER; SCHNELL; RALL, 2016). Há também a possibilidade de que os vírus alcancem o SNC por meio dos vasos linfáticos que atuam na região das meninges, estruturas recentemente descobertas, e que levantam novas hipóteses sobre a atuação do sistema imunológico na região (LOUVEAU *et al.*, 2015)

Alguns vírus podem chegar até o SNC através de invasão dos neurônios do sistema nervoso periférico (SNP), como nos casos do vírus da raiva (RABV) do enterovirus C (PV) e do vírus da estomatite vesicular (VSV), que tem a capacidade de, após infectar as células da musculatura esquelética, alcançar os neurônios periféricos adjacentes. Há também a possibilidade de alguns vírus, como o Simplexvirus humano alpha 1 e 2 (HHV-1/2) e o Varicellovirus humano alpha 3 (VZV), que atuam infectando neurônios do SNP e estabelecerem latência no núcleo destas células. Posteriormente podem ser reativados, com subsequente multiplicação em células epiteliais e endoteliais ou do SNC (Figura 2 b) (MCGAVERN; KANG, 2011; MILLER; SCHNELL; RALL, 2016).

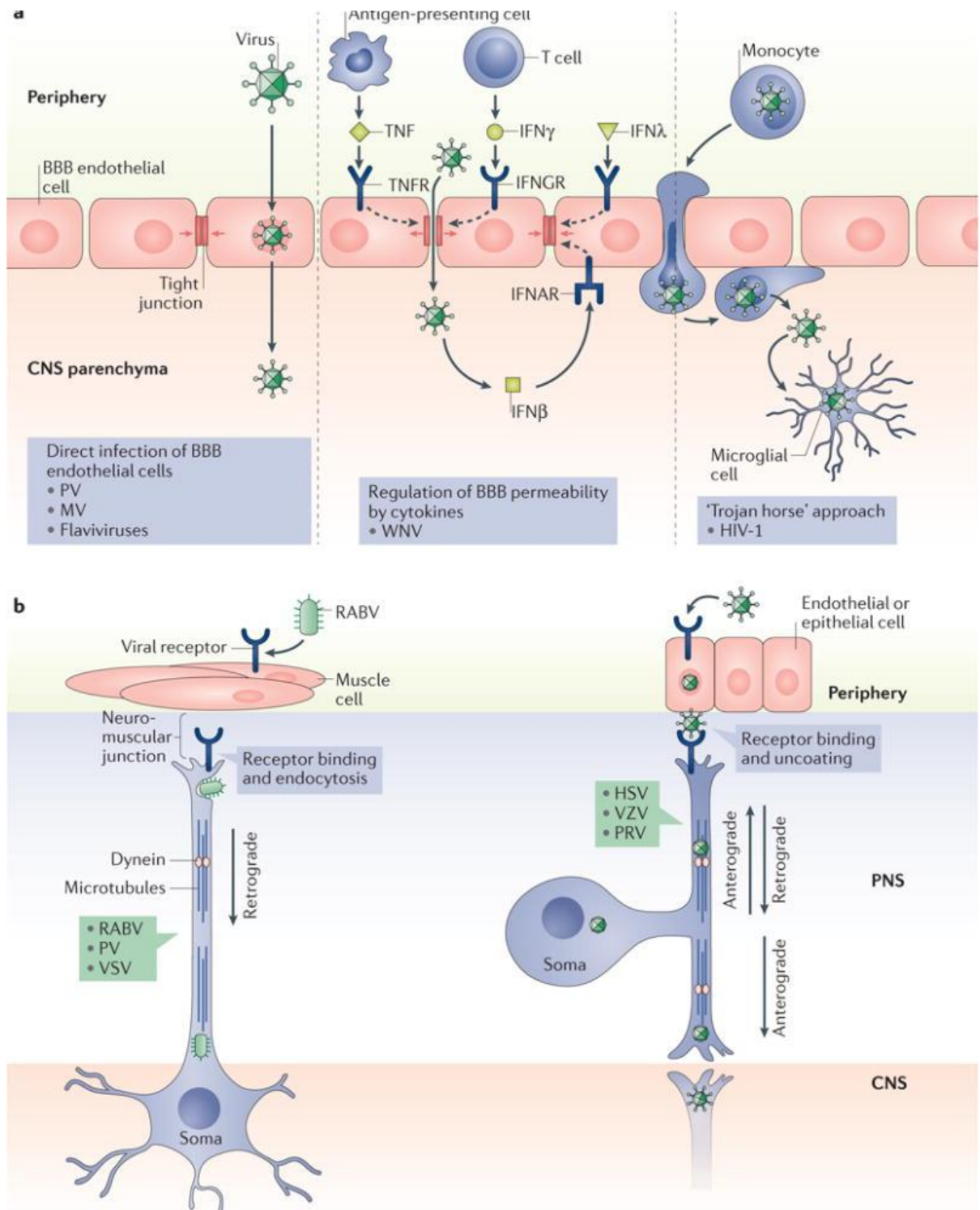


Figura 2 - Demonstração gráfica das vias que os vírus utilizam para alcançar o SNC. Por infecção direta das células endoteliais que estão presentes nas barreiras locais da região, e a partir disso alcançar o parênquima encefálico por afastamento das junções de oclusão, que levam à depleção da permeabilidade, em decorrência da inflamação e sinalização por citocinas como Fator de Necrose Tumoral e Interferons; infectando células do sistema imune que podem eventualmente transportar as barreiras locais e levar consigo o patógeno ao parênquima (estratégia conhecida como “cavalo de

Tróia”) (a) ou ainda por acometer nervos periféricos e migrar através das sinapses até o SNC (b)  
Fonte: Miller, Schnell e Rall, 2016.

## 1.2. Inflamações e infecção no SNC

Inflamações no SNC podem estar localizadas no parênquima encefálico (encefalites), nas meninges (meningites) e na medula espinal (mielite) (SWANSON; MCGAVERN, 2015). A inflamação pode ainda ser observada em mais de uma destas regiões de forma simultânea, como as meningoencefalites e encefalomiélites (ELIAS; NARULA; CHU, 2014).

As encefalites são diagnosticadas a partir da observação de alteração do estado da consciência, como diminuição do nível de consciência, letargia ou mudança na personalidade, todas sem causa definida e por tempo superior a 24 horas. Estes sinais devem estar em conjunto com pelo menos três sintomas, que podem ser: anormalidades no parênquima cerebral (observadas por exames de imagem e concordantes com a suspeita) e no eletroencefalograma; febre acima de 38 °C nas últimas 72 horas; convulsões (sem relato prévio) e alterações neurológicas focais (COSTA; SATO, 2020).

Nos quadros de meningites são observados sinais clássicos de irritação meníngea, como fotofobia, rigidez de nuca, cefaleia, muitas vezes em conjunto com febre, náusea, vômito e crianças pequenas podem ainda apresentar abaulamento da fontanela (HERSI *et al.*, 2021; MEYDING-LAMADÉ; CRAEMER, 2020). As miélites se desenvolvem com sintomas como déficit neurológico que podem afetar as capacidades sensoriais e motoras do sistema nervoso autônomo e podem estar associadas a presença de quadro febril (ASUNDI *et al.*, 2019).

Doenças autoimunes podem ser responsáveis por complicações que levam a encefalites e meningite. As meningites podem também ser causadas por medicamentos e metástase de células cancerígenas (ELLUL; SOLOMON, 2018; HOPKINS; JOLLES, 2005; ROTH; WELLER, 2015). Em caráter infeccioso, bactérias, micobactérias, vírus, fungos e parasitos podem acometer o SNC. Todos estes patógenos apresentam risco de infecção grave e podem estar diretamente associados a sequelas que impactam na qualidade de vida dos pacientes (GIOVANE; LAVENDER, 2018; HERSI *et al.*, 2021).

### 1.3. Diagnóstico

Apesar de o diagnóstico de inflamações em SNC ser majoritariamente baseado em sinais e sintomas clínicos, quando há a suspeita de que a etiologia do quadro patológico no SNC seja infecciosa, exames de imagem, eletroencefalografia e testes laboratoriais podem ser solicitados. Nesses casos, após a coleta, o líquido tem sua composição bioquímica, celular e microbiológica analisadas (SARRAZIN, J.-L.; BONNEVILLE, F.; MARTIN-BLONDEL G., 2012). Os exames realizados a partir da coleta de LCR são considerados como ponto importante para o correto diagnóstico, e caso não haja contraindicação clínica, a amostra deve ser coletada o mais breve possível, sendo obtida a partir de punção lombar (BRITTON *et al.*, 2015).

Pacientes com meningite, ao serem admitidos em hospitais, geralmente são encaminhados para tratamento empírico intravenoso com antibióticos, enquanto esperam o resultado laboratorial da hemocultura e a cultura de LCR, que pode levar até 48 horas (PIRES *et al.*, 2017). Ao contrário dos casos de meningite causados por bactérias, fungos ou parasitos, a maior parte das infecções virais apresenta falta de tratamento que seja capaz de combater o patógeno em específico (MERCORELLI; PALÙ; LOREGIAN, 2018).

Nos casos de meningites, as análises físicas e bioquímicas do líquido não tendem a apresentar padrões que sejam capazes de diferenciar entre a origem viral e as demais possibilidades de microrganismos patogênicos (GNUTZMANN L.V. *et al.*, 2016). Em adultos, meningites causadas por micobactérias, fungos ou vírus apresentam infiltrado de leucócitos com maior presença de linfócitos (Tabela 1). Apenas as infecções bacterianas são capazes de eliciar alterações que as distinguem das infecções virais, micobacterianas ou fúngicas, especialmente pela presença de infiltrado celular com predominância de neutrófilos segmentados e glicose abaixo de 40 mg/dL (Tabela 1). Adicionalmente, nas meningites virais é comum identificar pleocitose, no entanto, a ausência deste achado não exclui a possibilidade de infecção viral (BRITTON *et al.*, 2015).

Tabela 1 - Relação de microrganismos que infectam o SNC e as respectivas alterações em análise bioquímica e de celularidade do Líquor, identificadas em pacientes adultos.

Patógeno	Celularidade	Células (mm <sup>3</sup> )	Proteínas (mg/dL)	Glicose (mg/dL)	Aparência
Padrão saudável	NA*	0 a 5	15 a 50	45 a 100	Translúcido
Vírus	Linfócitos	5 a 500	30 a 150	30 a 70	Translúcido
Bactéria	Neutrófilos	100 a 20.000	100 a 500	<40	Turvo
Micobactéria	Linfócitos	5 a 2000	>50	<40	Turvo
Fungo	Linfócitos	20 a 2000	40 a 150	30 a 70	Translúcido

NA\* Não se aplica. As informações utilizadas nesta tabela foram obtidas a partir das análises feitas por Koski & Van Loo (2010), Hrishu & Sethuraman (2019) e Hoyer et al., (2016).

A determinação de valores de referência para um perfil saudável, para as análises de LCR, é algo desafiador em crianças e recém-nascidos, uma vez que há implicações éticas relacionadas ao procedimento doloroso e invasivo de coleta de LCR. Desta forma, as determinações dos valores de referência adotadas tendem a ser calculados com base em crianças e bebês que foram submetidos a punção lombar por recomendação médica (GNUTZMANN L.V. *et al.*, 2016).

Neonatos tendem a apresentar concentração de proteínas em LCR mais elevados do que crianças e adultos, no entanto estes valores tendem a diminuir gradativamente ao longo dos primeiros 12 meses de vida. Faria e Farhat (1999) sugerem que o intervalo de confiança a ser adotado para neonatos seria de 20-170 mg/dL, com uma média de 90 mg/dL (FARIA S.M.; FARHAT, C. K., 1999).

Para a contagem de leucócitos em LCR, é possível classificar os valores de referência de acordo com a idade. Bebês e crianças de até um ano de vida podem apresentar 0-30 leucócitos/mm<sup>3</sup>, já em crianças de um a quatro anos de idade, podem ser encontrados até 20 leucócitos/mm<sup>3</sup>. A partir dos cinco anos de idade até a puberdade, são considerados como normais valores de até 10 leucócitos/mm<sup>3</sup> (COMAR S.R.; MACHADO N.A.; DOZZA T.G.; HAAS P., 2009). Crianças sem infecção ou inflamação, tendem a apresentar, em análise de LCR, maior proporção de monócitos (até 80%) em comparação com os demais leucócitos. Este parâmetro difere dos achados em adultos, em que são observados linfócitos (60%-70%) e

monócitos em menor quantidade (30%-50%) (MCPHERSON R.A.; PINCUS M. R., 2011).

Em hospitais, no âmbito microbiológico, a pesquisa laboratorial é em geral baseada em testes capazes de identificar patógenos bacterianos ou fúngicos, uma vez que estes agentes apresentam maior letalidade quando comparados aos vírus em geral e pelo tipo de teste empregado para identificar o microorganismo causador da doença (LUKŠIĆ, I. *et al.*, 2013). Para suspeitas de infecções no SNC causadas por fungos ou bactérias, é possível realizar cultivos em meios enriquecidos e seletivos ou ainda colorações em lâminas, para observação em microscopia óptica (MILLER J.M. *et al.*, 2018).

Já nos casos de infecções em SNC causadas por vírus, as análises laboratoriais para diagnóstico podem envolver testes moleculares como Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e testes imunológicos. Estes métodos laboratoriais são análises que necessitam de marcadores específicos relacionados ao vírus pesquisado, sejam eles fragmentos de material genético viral, antígeno ou anticorpo. Tanto a PCR quanto os testes imunológicos apresentam limitações quanto às suas aplicações, como por exemplo: equipamentos; a carga viral; a janela de detecção e a sensibilidade e especificidade do teste empregado (BURRELL, C. J.; HOWARD, C. R.; MURPHY, F. A., 2017).

A identificação exata de um vírus em LCR é complexa e pouco empregada na rotina hospitalar. Apesar disto, a identificação correta de microrganismos capazes de causar doenças em seres humanos é de fundamental importância para o desenvolvimento eficaz de tratamentos e direcionamento de medidas de controle e prevenção.

#### **1.4. Panorama geral das meningites e meningites virais**

As meningites virais possuem incidência em todo o mundo e em geral acometem majoritariamente neonatos e crianças, decrescendo com o avançar da idade. As infecções por vírus são consideradas como a causa mais comum de meningite, e ganharam destaque após o início das vacinações em crianças contra as principais bactérias responsáveis por causar meningites (CANTUS; DAS, 2023). Com a vacinação disponível para *Haemophilus influenzae* do tipo B, *Streptococcus*

*pneumoniae*, e *Neisseria meningitidis*, muitos países reportaram diminuição dos casos de meningite bacteriana entre crianças (MCINTYRE *et al.*, 2012). No Brasil, a vacinação disponível no Sistema Único de Saúde contra *Haemophilus influenzae* do tipo B teve início no ano de 1999. A vacina conjugada 10-valente contra *Streptococcus pneumoniae* e *Neisseria meningitidis*, foi introduzida no ano de 2010 (AZEVEDO; TOSCANO; BIERRENBACH, 2013). Estas duas vacinas fazem parte do Programa Nacional de Imunização, disponível para crianças em todo o território brasileiro (ANDRADE *et al.*, 2020). No entanto, as meningites bacterianas permanecem tendo importância clínica (BLANCO *et al.*, 2020) e para esses casos, os tratamentos contra meningites bacterianas são baseados na administração de antibióticos combinados (TREISTER; KOERNER, 2019).

No Brasil, entre os anos de 2007 e 2022, foram notificados 286.511 casos de meningite, destes, 130.563 (45,57%) casos foram considerados como sendo de origem viral e 47.036 (16,41%) casos como de origem não identificada. Crianças de até 14 anos corresponderam por 69,59% (N= 90.862) dos casos de meningite viral (Figura 3 A). No mesmo período, no estado de Minas Gerais, foram notificados um total de 16.629 casos de meningite, com 4.294 dos casos de origem viral, dos quais 2.031 (47,30%) foram reportados em crianças de zero a 14 anos (Figura 3 B). A distribuição por meses, das notificações de meningites virais no estado de Minas Gerais, entre os anos de 2007 a 2022, demonstram a presença de casos ao longo de todo o ano, além de tendência de crescimento nas notificações entre os meses de agosto e dezembro e de decréscimo nas notificações entre os meses de março a junho (Figura 3 C).

A ocorrência de meningites virais também é impactada pelo clima, uma vez que, em regiões tropicais e subtropicais, os casos de meningite viral tendem a ocorrer ao longo de todo o ano. Em regiões de clima temperado, as meningites virais apresentam maior ocorrência nos períodos de verão e outono (WRIGHT; PINTO; PALISOC; BAGHLI, 2019).

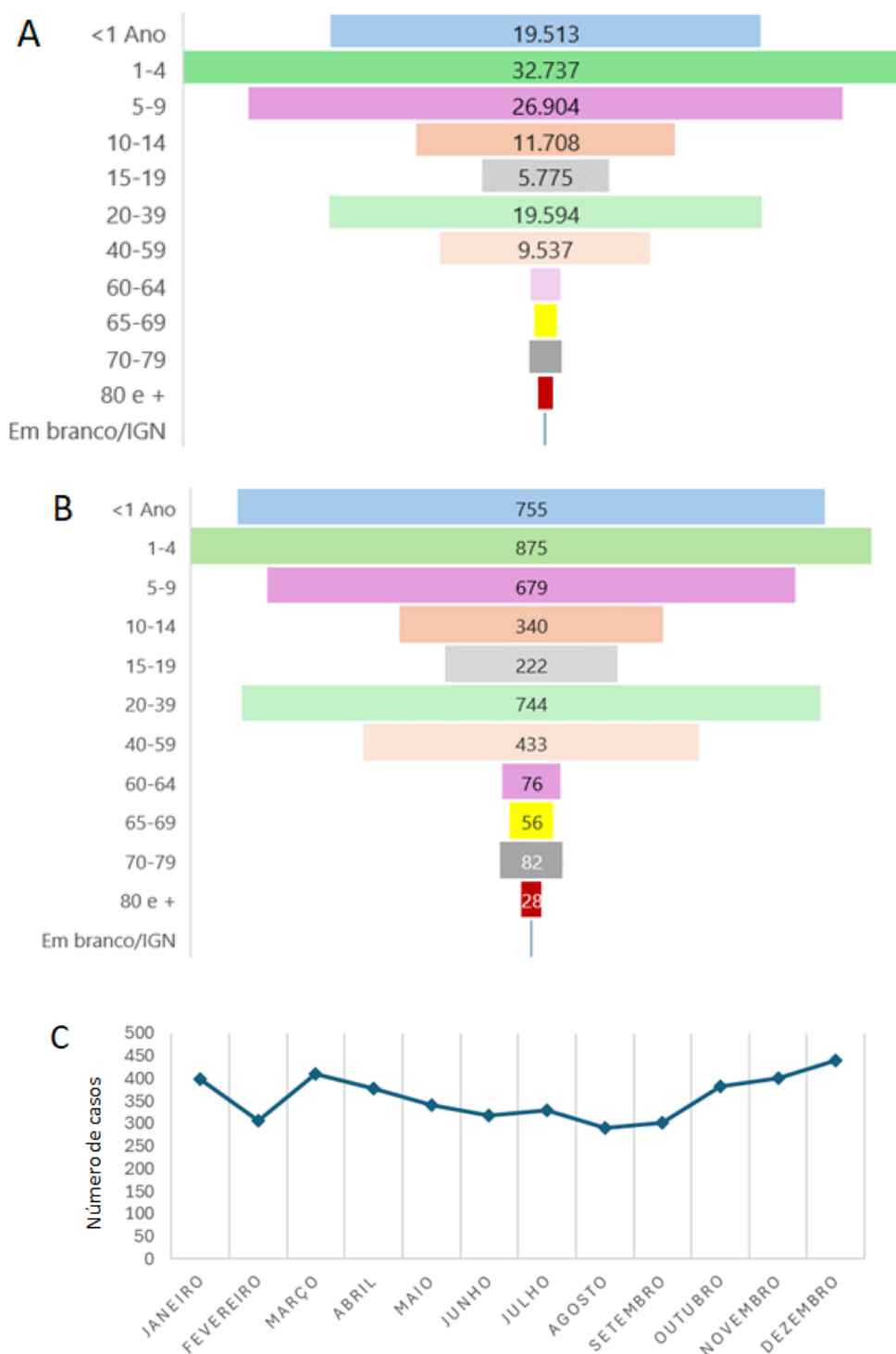


Figura 3 – Meningites virais por idade no Brasil e em MG entre os anos de 2007 a 2022 - Dados obtidos no portal virtual do Ministério da Saúde/SVS - Sistema de Informação de Agravos de Notificação - Sinan Net. (A) Distribuição das meningites virais por idade no Brasil, entre os anos de 2007 a 2022. (B) Distribuição das meningites virais por idade em Minas Gerais, entre os anos de 2007 a 2022). (C) Casos de meningite ao longo dos meses do ano, entre o período de 2007 a 2022).

Uma vasta gama de vírus é conhecida por causar meningites e encefalites e os enterovírus são responsáveis por 50% a 80% dos casos, especialmente durante

o verão, período em que as pessoas tendem a estar em maior contato com a água, especialmente durante momentos de lazer (ALMEIDA; NOGUEIRA; RABONI; VIDAL, 2007). Estes momentos de maior contato com a água facilitam a disseminação de partículas virais eliminadas em fezes e a principal rota de infecção destes vírus é fecal-oral (tabela 2).

Além dos enterovírus, destacam-se como responsáveis por causar infecções em SNC os arbovírus e orthoherpesvirus (FERREIRA *et al.*, 2019) (tabela 2). Os arbovírus relacionados a infecções com manifestações clínicas em SNC variam de acordo com a localização geográfica e a presença do vetor na região.

Os herpesvírus têm especial importância clínica em casos de infecções em SNC por vírus, já que estes, quando comparados a outros com tropismo por células do SNC, podem levar a quadros patológicos de maior gravidade. Há também o fato destes vírus serem ubíquos e estarem presentes na maior parte da população humana adulta (LAN; LOU, 2017). Desta forma, bebês tendem a ser expostos a estes vírus por meio do contato com os adultos que os cercam e sua transmissão está diretamente associada ao contato (BROWN, 2004). Além destes aspectos, os herpesvírus estabelecem latência em diversas células humanas, como neurônios e células presentes no sistema imunológico (COHEN, 2020).

Para este estudo, foram selecionados os herpesvírus associados a infecções em SNC que estabelecem latência em células neuronais, uma vez que a presença de inflamação no SNC recruta células do sistema imune que podem já estar infectadas por estes vírus, mas não seriam a causa do problema investigado. Dos vírus a serem explorados neste trabalho, apenas os herpesvírus apresentam terapia antiviral bem estabelecida e comercializada, apesar de casos de resistência terem sido reportados (RAZONABLE, 2011). Além destes vírus, classicamente associados à capacidade de infectar células do SNC, há outros vírus apontados na literatura como sendo de potencial neuroinvasivo, como os adenovírus, influenza, HIV, rubéola, sarampo e poliomavírus (KARCIOGLU; YILMAZ, 2019). Adicionalmente, foram reportados casos de manifestações clínicas em SNC por SARS-CoV-2 ou detecção da presença do vírus na região, a partir da pandemia iniciada em 2019 (MCQUAID *et al.*; 2021).

Tabela 2 - Tabela apresentada em estudo de revisão de literatura sobre infecções virais em SNC no Brasil.

Gêneros dos agentes virais	Material genético e estrutura	Transmissão	Rota de invasão ao SNC	Distúrbio neurológico associado
Enterovirus	RNA de fita simples, não envelopado. Simetria icosaédrica	Fecal-oral; respiratória	Células endoteliais infectadas; transporte axonal retrógrado; Cavalos de Tróia por monócitos infectados	Meningite, paralisia flácida aguda, mielite, encefalite/meningoencefalite
Flavivirus	RNA de fita simples, envelopado. Simetria icosaédrica	Via vetor artrópode	Hematogênico; transporte axonal; Cavalos de Tróia dentro de leucócitos infectados	Encefalite, microcefalia
Alphavirus	RNA de fita simples, envelopado. Simetria icosaédrica	Via vetor artrópode	Transporte axonal anterógrado	Encefalite
Simplexvirus	DNA dupla fita, Envelopado. Simetria icosaédrica	Oral-oral; oral-genital; contanto com lesão	Infecções primárias: transporte olfatório; hematogênico e genital; axonal retrógrado. Reativação: de neurônios gânglios trigêmeos ou sacrais; transporte anterógrado.	encefalite, meningoencefalite
Varicellovirus	DNA dupla fita, Envelopado. Simetria icosaédrica	respiratória; contato com lesão	Disseminação periférica, reativação dos gânglios sensoriais – disseminação central para o cérebro ou para a medula espinhal	meningoencefalite, mielite, neuropatias craniais
Cytomegalovirus	DNA dupla fita, Envelopado. Simetria icosaédrica	Contato com saliva ou urina; via sexual; via aleitamento humano; transplante de órgãos; transfusão sanguínea	Células hematopoiéticas monócitos - disseminação sistêmica - cérebro, medula espinhal, meninges, raízes nervosas	Encefalite, mielite, poliradiculopatia, neuropatia multifocal

Tradução e livre adaptação de Sousa *et al*, 2021.

Um estudo publicado no ano de 2021, analisou 140 amostras de LCR de crianças com idade entre 24 dias de vida a 14 anos de idade, com manifestações no SNC e suspeita de infecção viral. Estas crianças eram oriundas da cidade de Belo Horizonte (Minas Gerais) ou da região metropolitana de Belo Horizonte. 75% das crianças tinham menos de cinco anos de idade e do total contemplado pelo estudo,

10 óbitos foram observados. Nas amostras de LCR, o patógeno foi identificado por análise molecular em 26,5% dos casos, em que o material genético de enterovírus (ENTV (5,7%)), Herpes Simplex 1 e 2 (HSV-1/2 (4,3%)), Dengue vírus (DENV(8,6%)); Febre Amarela vírus (YFV (3,6%)); e Zika vírus (ZIKV (4,3%)) foram identificados (MARINHO, PAULA EILLANNY SILVA *et al.*, 2021).

Por fim, é importante salientar que este trabalho é a continuação de estudo que já vem sendo desenvolvido desde 2011. Os resultados obtidos nesses trabalhos (Oliveira., 2015; Marinho., 2019; Crispim., 2020; Rebuite., 2021) foram de grande importância, uma vez que demonstraram a presença de vírus que não eram classicamente considerados como neurotrópicos, causando infecções com manifestações em SNC de neonatos e crianças, como no caso dos orthoflavivírus (DENV, ZIKV e YFV).

### **1.5. Orthoherpesviridae**

A família *Orthoherpesviridae* compreende vírus de DNA e possui oito espécies de herpesvírus humanos, categorizados em três subfamílias: *Alfaherpesvirinae*; *Betaherpesvirinae* e *Gammaherpesvirinae* (DE MELLO; BLOOM; PAIXÃO, 2016). *Varicellovirus* e *Simplexvirus*, são gêneros pertencentes à subfamília *Alfaherpesvirinae* (Davison, 2010; Mello, De, Bloom e Paixão, 2016).

Os membros da família *Orthoherpesviridae*, apresentam DNA dupla fita (dsDNA) linearizado, que varia de 125 mil – 241 mil bases, contendo entre 70 e 170 genes. A partícula viral tem tamanho entre 150 e 200 nanômetros (nm), com simetria icosaédrica e envelope viral (GATHERER *et al.*, 2021). Entre o envelope e o capsídeo é encontrado um tegumento proteico (figura 4) (GUO *et al.*, 2010).

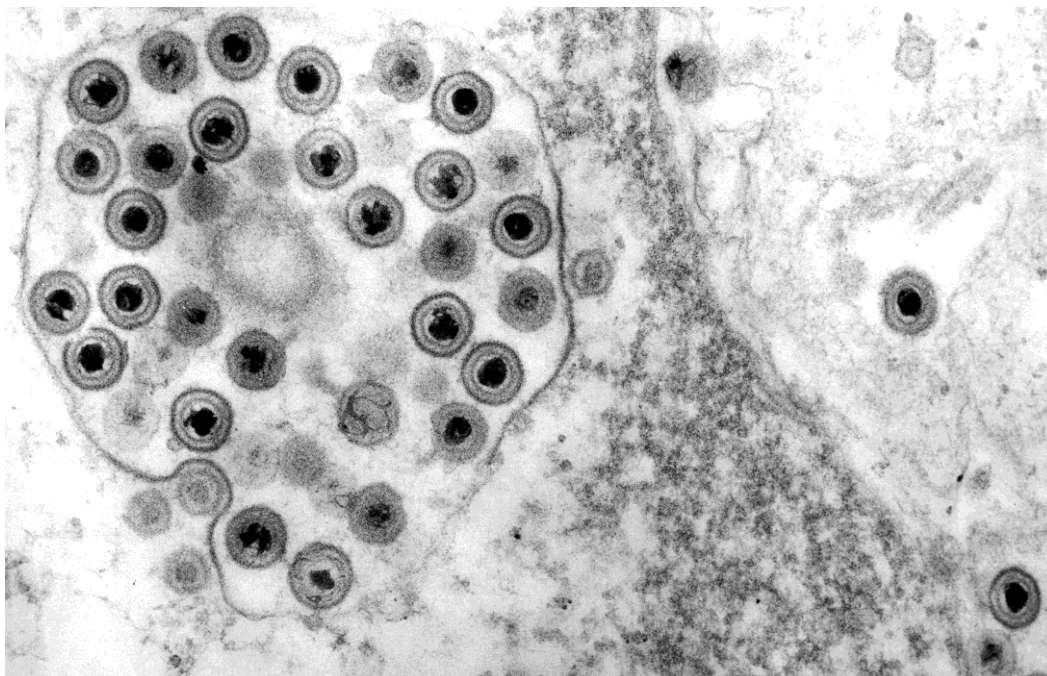


Figura 4 - Microscopia eletrônica de cultura de células infectadas por Simplexvirus humanalpha 1. Fonte: University of Texas Medical Branch. Disponível em: <https://www.utmb.edu/virusimages/VI/herpes-simplex-virus>

A infecção por vírus da família *Orthoherpesviridae* apresenta fase lítica, em que há multiplicação viral, e a fase latente, que faz com que o vírus se estabeleça no hospedeiro de forma definitiva. A infecção no sítio primário (fase lítica), compreende o período de manifestações clínicas. É somente na fase lítica que o hospedeiro é capaz de transmitir o vírus (GRINDE, 2013). Após a disseminação do vírion, é iniciado o período de latência, (nos neurônios, em linfócitos, monócitos ou células CD34+ a depender do vírus) (COHEN, 2020), em que o material genético viral permanece no núcleo das células hospedeiras em forma de epissoma (DE LEO; CALDERON; LIEBERMAN, 2020). Na fase de latência a expressão de genes relacionados com o ciclo lítico são silenciados. Sinalizações celulares do hospedeiro, como por exemplo: resposta ao dano no DNA por radiação ultravioleta, febre, trauma em nervos, hipóxia ou estresse metabólico, podem levar a reativação da multiplicação viral (COHEN, 2020).

Segundo a Organização Mundial da Saúde, aproximadamente 90% da população mundial é infectada por algum membro da família *Orthoherpesviridae* ao longo da vida. Essas infecções estão relacionadas com lesões genitais e orais,

conjuntivite, erupções cutâneas e outras manifestações não tão típicas, como encefalites (KUKHANOVA; KOROVINA; KOCHETKOV, 2014). Serão analisados neste trabalho, os vírus HSV-1, HSV-2 e VZV, por possuírem relação com infecções em crianças, serem ubíquos e por vezes estarem associados a manifestações no SNC.

### **1.5.1. *Simplexvirus humanalpha 1 (HSV-1) e Simplexvirus humanalpha 2 (HSV-2)***

O HSV-1 é historicamente mais associado ao desenvolvimento de lesão orolabial e o HSV-2 a infecções genitais. Contudo, há relatos crescentes de HSV-1 causando lesões genitais e HSV-2 causando manifestações orolabiais (LIMA, LYANA RODRIGUES PINTO *et al.*, 2017). A infecção por HSV-1 ou HSV-2 tem início nas células epiteliais da mucosa, e ao se disseminar no corpo do hospedeiro, o vírus tem a capacidade de penetrar no axônio terminal de neurônios sensoriais e ali estabelecer infecção latente (KNIFE; CLIFFE, 2008). Os HSV-1 e HSV-2 são considerados como vírus com potencial neurotrópico e foram caracterizado como os herpesvírus mais frequentemente encontrados causando encefalites, sendo responsável por 5% a 15% das encefalites infecciosas em adultos e crianças (FISAHN *et al.*, 2016; ROZENBERG, 2020), possuindo sítio primário de infecção próximo ao nervo trigêmeo e ao nervo facial (PTASZYNSKA-SAROSIEK *et al.*, 2019). A encefalite por HSV-1 ou 2 pode apresentar riscos para a vida, com taxa de mortalidade em 70% dentre às pessoas que não recebem a terapia antiviral, e mesmo os que recebem o medicamento antiviral, podem desenvolver sequelas neurológicas (PIRET; BOIVIN, 2020).

Neonatos podem ser expostos ao HSV-1 ou 2 durante o parto natural quando parturientes apresentam herpes genital em manifestação (JAMES; KIMBERLIN, 2015). O HSV-1 em neonatos está associado à alta morbidade e mortalidade (PINNINTI; KIMBERLIN, 2013). Análises feitas no Canadá e na Austrália identificaram que a apresentação de HSV em neonatos foi em maioria causada por HSV-1. O crescimento de casos deste vírus levando ao aparecimento de lesões genitais pode ser reforçado por esses achados (JONES; RAYNES-GREENOW; ISAACS, 2014; KROPP *et al.*, 2006).

### 1.5.2. *Varicellovirus humanalpha 3 (VZV)*

O VZV é um vírus considerado como neurotrópico (BAIRD *et al.*, 2013), mas também já foi demonstrado o tropismo viral por linfócitos T CD4+ e CD8+, além de células dendríticas (HUCH *et al.*, 2010; KU *et al.*, 2002).

A varicela, conhecida como catapora, é a manifestação clínica da infecção primária, e após o desaparecimento dos sintomas (processo autolimitado), o vírus estabelece latência nos neurônios ganglionares. A reativação do vírus após período de latência leva ao herpes-zoster (NAGEL; GILDEN, 2014). A catapora é transmitida por contato com secreções respiratórias ou com o líquido contido nas lesões. A doença está associada a manifestação leve na infância, representada pelas erupções vesiculares disseminadas. No entanto, podem ocorrer complicações que levam à hospitalização e óbito, como encefalites e pneumonia (VARELA; PINTO; SCOTTA, 2019). Manifestações no SNC em decorrência da infecção por VZV, com maior associação com a reativação do vírus, podem se apresentar como vasculopatia, meningite, encefalite, cerebelite e mielopatia (NAGEL; NIEMEYER; BUBAK, 2020).

Uma pesquisa conduzida nas capitais dos estados de São Paulo e Goiás, observou 86% de sucesso da vacina contra todas as manifestações da infecção por VZV e 93% de proteção contra desdobramentos moderados e severos. Do total de indivíduos contemplados pelo estudo (168 pacientes pediátricos), 22% eram vacinados e apresentaram sintomas leves (ANDRADE, ANA LUCIA *et al.*, 2018). Apesar de porcentagens promissoras para a proteção contra complicações causadas pelo VZV, esses dados sugerem que parcela da população infantil segue sem vacinação ou que o contato com o agente viral pode acontecer antes da vacinação.

Crianças podem apresentar reativação do vírus após contato primário com o VZV ou complicações após administração da vacina para este mesmo vírus, que é baseada no agente atenuado. Nesses casos, meningites foram associadas com crianças que tinham em média três anos de idade (AMARAL *et al.*, 2021).

### 1.6. *Picornaviridae*

A família *Picornaviridae* é compreendida por vírus não envelopados, de estrutura icosaédrica, sua partícula viral tem aproximadamente 30nm, com genoma que varia entre 6,7 mil e 10,1 mil bases e composto por fita simples de RNA (ssRNA) de polaridade positiva. O genoma dos picornavírus dá origem a poliproteína, que após processo de clivagem, culmina em três ou quatro proteínas estruturais e pelo menos sete proteínas não estruturais (ZELL, R. *et al.*, 2017). Três das suas proteínas estruturais estão localizadas na parte externa do capsídeo (VP1, VP2 E VP3) e a VP4 é encontrada na porção interna do capsídeo (Figura 5). Estas proteínas constitutivas do capsídeo são encontradas na maioria destes vírus (WEN *et al.*, 2019).

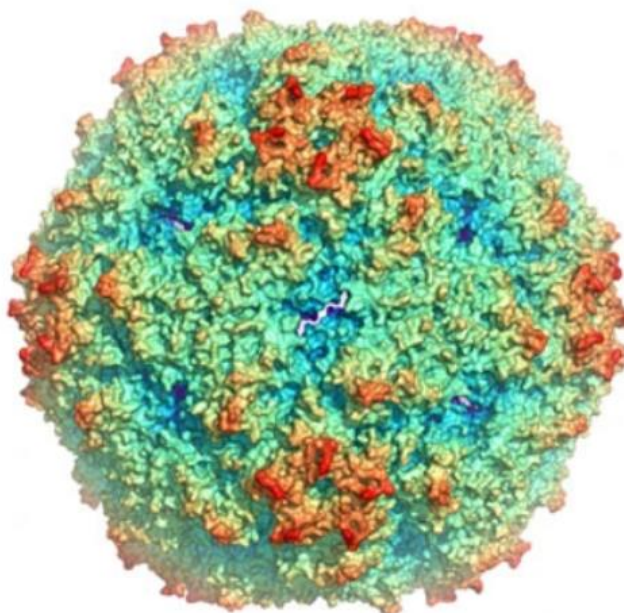


Figura 5 - Representação de partícula viral do enterovírus 71, exemplo de picornavírus. (REN, 2013)

A infecção por picornavírus pode ser assintomática, mas em muitos casos, os picornavírus estão relacionados com o desenvolvimento de sintomas afetando o SNC, coração, trato gastrointestinal, trato respiratório, pele, olhos, pâncreas e fígado (ZELL, ROLAND, 2018).

#### 1.6.1. *Enterovirus*

O gênero *Enterovirus* (ENTV) pertence à família *Picornaviridae* (DE CROM,

S. C.M. *et al.*, 2016). A identificação de infecções por ENTV tem sido relevante entre crianças e neonatos apresentando meningite e encefalites. Algumas vezes, essas infecções no SNC são observadas sem pleocitose ou sinais neurológicos focais (DE CROM, STEPHANIE C.M. *et al.*, 2012; HARVALA *et al.*, 2014)

A transmissão dos ENTV acontece majoritariamente via fecal-oral, frequentemente por consumo de água contaminada. É possível também haver transmissão por gotículas eliminadas pelo sistema respiratório (KHEDIRI *et al.*, 2018). O sítio primário de replicação pode ser no epitélio da orofaringe, na nasofaringe ou da mucosa intestinal. Apesar dessas possibilidades, a maior parte do processo de infecção primária acontece após o vírus penetrar nos enterócitos e alcançar as placas de Peyer. Em seguida, observa-se a viremia culminando na disseminação das partículas virais para outros tecidos do hospedeiro, incluindo potencialmente o SNC (DE CROM, S. C.M. *et al.*, 2016). A maioria dos enterovírus causa sintomas como doença mão-pé-boca, pleurodinia, erupções cutâneas, herpangina, febre, rinorreia e sintomas semelhantes a quadro gripal (PUENPA *et al.*, 2014; RYU *et al.*, 2010).

Quando os enterovírus infectam o SNC, podem levar a sérias complicações neurológicas, como encefalite, meningite, paralisia e ataxia (perda de coordenação e equilíbrio). ENTV são comumente identificados em neonatos com meningites e tendem a ter desfecho benigno (GHABOULI SHAHROODI *et al.*, 2016). Esses sintomas podem variar em gravidade e podem ter efeitos duradouros, especialmente em casos de infecção grave. Os enterovírus possuem importância histórica quando se trata de infecções virais em SNC, representados especialmente por poliovírus, que leva à poliomielite em crianças e causava grande impacto na saúde pública, até o início das campanhas de vacinação (HUANG; SHIH, 2015).

A poliomielite provocou considerável morbidade e mortalidade infantil durante diversas epidemias que se estenderam de 1900 a 1950. Muitas crianças afetadas desenvolvem paralisia em múltiplas musculaturas, inclusive respiratória ou sequelas motoras que podem se estender para o resto das suas vidas. No entanto, esforços de entidades de saúde e governamentais de todo o mundo iniciaram processos de campanhas de vacinação a partir da década de 1980 (MEHNDIRATTA *et al.*, 2014). O Brasil fez parte desta iniciativa, e foi considerado livre da doença na década de 1990 (RISI, 2019). Ainda que as campanhas de vacinação tenham sido bem sucedidas, nos últimos anos, foi observada tendência de redução na cobertura

vacinal (MACIEL *et al.*, 2023)

### 1.7. *Orthoflaviviridae*

A Família *Flaviviridae* é composta por vírus de estrutura envelopada, com o capsídeo em simetria icosaédrica, e material genético tendo entre 9.000 e 13.000 bases, formado por RNA fita simples de polaridade positiva (ssRNA). Parte considerável dos flavivírus infectam aves e mamíferos, e diversos vírus pertencentes a esta família tem importância médica (SIMMONDS *et al.*, 2017). A tradução dos genes ocorre na forma de poliproteína. Ao ser clivada, a poliproteína origina as proteína E, proteína M e proteína C (figura 6), que possuem função estrutural, além das proteínas não estruturais NS1, NS2A e B, NS3, NS4A e B e NS5 (ZANG *et al.*, 2023).

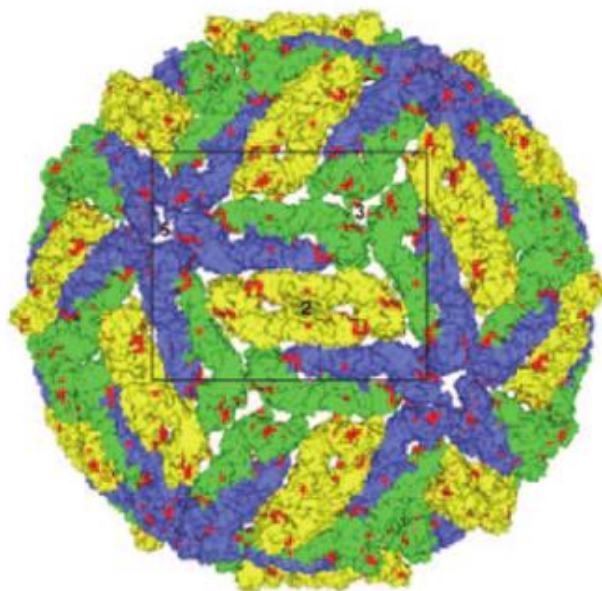


Figura 6 - Representação estrutural de partícula viral de um Orthoflavivírus (STIASNY, 2006).

São exemplos de vírus da família *laviviridae*, o *Hepacivirus hominis* (pertencentes ao gênero *Hepacivirus*), e vírus do gênero *Orthoflavivirus* como o *Orthoflavivirus denguei* (DENV); *Orthoflavivirus flavi* (YFV); o *Orthoflavivirus zikaense* (ZIKV); *Orthoflavivirus louisense* (SLEV); *Orthoflavivirus nilense* (WNV); *Orthoflavivirus ilheusense* e o *Orthoflavivirus japonicum* (POSTLER, 2023; GALLARDO FLORES; COLPITTS, 2021; MOURA REIS; NUNES NETO, 2021; SHARMA; VRATI; KALIA, 2021; ZHAO *et al.*, 2021).

Os arbovírus (acrônimo vindo do termo em inglês para *Arthropod Borne Virus*), de maior importância para a saúde humana do gênero *Orthoflavivirus*, são os transmitidos por mosquitos da família *Culicidae*, com destaque para os gêneros *Aedes* e *Culex*. As infecções causadas por flavivírus, podem ser assintomáticas ou apresentar sintomas como febre, mialgia e exantema, que são autolimitados. Alguns casos podem levar a complicações como febre hemorrágica (TEALE *et al.*, 2016; THOMAS; MARTINEZ; ENDY, 2014). Sintomas no SNC se desenvolvem em pequena parte dos doentes (MAXIMOVA; PLETNEV, 2018). As manifestações clínicas ligadas ao SNC consideradas como mais comuns nas infecções por DENV, ZIKV e YFV incluem encefalite, meningite, mielite, convulsões, encefalopatia, encefalomielite e síndrome de Guillain-Barré (ALMEIDA BENTES; KROON; ROMANELLI, 2019; CAOLORMEAU *et al.*, 2016).

De forma geral, estes vírus são inoculados no tecido cutâneo, a partir da picada do vetor artrópode. As células dendríticas, mastócitos, monócitos, fibroblastos e queratinócitos são exemplos de alvos da replicação inicial dos flavivírus. A partir da chegada aos linfonodos é iniciado um estado de viremia, facilitando a disseminação viral e induzindo infecção e inflamação sistêmica, fazendo com que o vírus consiga alcançar diversas regiões anatômicas e potencialmente o SNC (MAXIMOVA; PLETNEV, 2018; NEAL, 2014). A replicação viral que ocorre no parênquima encefálico após a invasão na região induz inflamação no tecido, intensificando o comprometimento da barreira hematoencefálica e a entrada de mais partículas virais no SNC (LI, HONGDA *et al.*, 2016). Diversos ortoflavivírus foram relatados como capazes de causar infecção no SNC (SIPS; WILSCHUT; SMIT, 2012). No Brasil, já foram diagnosticados, entre crianças, desdobramentos neurológicos em quadro infecciosos causados por DENV, SLEV, YFV e ZIKV (MARINHO, P. E.S.; KROON, 2019; MARINHO, 2019; CRISPIM, 2020; JUNIOR; 2021). Apesar deste fato, no projeto aqui apresentado, serão pesquisados com ênfase especial os DENV e o ZIKV. Esta seleção foi realizada a partir de critérios epidemiológicos, uma vez que o YFV atualmente tem sido reportado em baixa circulação em Minas Gerais a presença de casos de infecção por SLEV são pouco reportados (VEDOVELLO *et al.*, 2015).

### **1.7.1. *Orthoflavivirus denguei***

O DENV é um arbovírus transmitido principalmente por *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus*. No entanto, já foram reportados casos de transmissão perinatal, por transfusão de sangue, aleitamento humano e transplante de órgãos. Existem quatro sorotipos de DENV: DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4, que por sua vez, subdividem-se em diferentes linhagens ou genótipos (SALLES *et al.*, 2018).

O DENV é considerado como um agente de importância para a saúde pública e é o mais comum entre os arbovírus a causar infecções em humanos, especialmente em regiões tropicais e subtropicais. São estimados, todos os anos, uma média de 300 milhões de casos de infecções por DENV em todo o mundo. Os sintomas podem variar e causar febre típica, febre hemorrágica e falhas em múltiplos órgãos, que podem até mesmo evoluir para óbito. Cardiomiopatia e encefalopatia também são complicações relatadas, relacionadas a dengue (BEGUM *et al.*, 2019).

Encefalites e sintomas neurológicos associados à infecção por DENV tem sido reportados, mas são considerados não usuais (LI, GUO HONG *et al.*, 2017; PHU LY *et al.*, 2015). Em crianças, o DENV foi relacionado a manifestações neurológicas como encefalites, meningites e mielites, com tendência a leve pleocitose (ALMEIDA BENTES; KROON; ROMANELLI, 2019). 56 crianças com sintomas neurológicos e que testaram positivo para dengue por análises moleculares foram acompanhadas por mais de um ano e meio após a alta hospitalar. Do total, 39% apresentavam sintomas neurológicos, 10,7% desenvolveram algum comprometimento motor, 5,4% apresentavam cefaleia e 14,3% com distúrbios do sono (BENTES *et al.*, 2021).

### **1.7.2. *Orthoflavivirus zikaense***

O ZIKV é transmitido principalmente por meio do seu vetor, que pode ser o *Aedes aegypti* ou o *Aedes albopictus*, e por transmissão vertical ou sexual (DUARTE *et al.*, 2017; PLOURDE; BLOCH, 2016). O ZIKV pode causar infecção tanto em primatas não humanos quanto em humanos (SADEGHIEH *et al.*, 2021). O ZIKV pode ser separado em duas linhagens, a africana e a asiática (FERRARIS; YSSEL; MISSÉ, 2019). O ZIKV foi descrito pela primeira vez no continente africano, na década de 50 do século passado (DICK, 1952). Casos foram associados com sintomas leves, até ocorrer um surto na Polinésia Francesa nos anos de 2013 e

2014, neste período complicações neurológicas foram descritas. Houve um surto de ZIKV no Brasil no ano de 2015, após a entrada do agente viral no país (SADEGHIEH *et al.*, 2021). Durante o período do surto de ZIKV em território nacional, foram relatadas associações entre a infecção pelo vírus e malformações no SNC, microcefalia em crianças e síndrome de Guillain–Barré em adultos (BRADY *et al.*, 2019; SÁFADI; ALMEIDA; DE ÁVILA KFOURI, 2021).

### **1.8. *Alphavirus chikungunya***

O *Alphavirus chikungunya* (CHIKV) é um arbovírus transmitido pelos vetores *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* (VEGA-RÚA *et al.*, 2020). Há o histórico de transmissão congênita e perinatal de CHIKV em casos de pessoas gestantes infectadas (BARR; VAIDHYANATHAN, 2019). O CHIKV pertence à família *Togaviridae*, gênero *Alphavirus*. Os vírus da família *Togaviridae* são envelopados (Figura 7), com 60 a 70 nm de diâmetro e genoma formado por ssRNA de polaridade positiva, contendo aproximadamente 12 mil bases (CAGLIOTI *et al.*, 2013; KÜMMERER *et al.*, 2012).

O genoma possui duas *open reading frames* (ORFs). A ORF-1 codifica a poliproteína P1234, que é clivada para produzir quatro proteínas não estruturais (nsP1-4). A segunda ORF (ORF-2), é processada para formar as proteínas estruturais do capsídeo (CP), E3, E2, 6K e E1 (MULLER *et al.*, 2019).

O CHIKV foi isolado em 1952, na Tanzânia, e por aproximadamente 50 anos após este primeiro isolamento, o vírus foi identificado causando surtos esporádicos isolados entre os continentes africano e asiático (DE LIMA CAVALCANTI *et al.*, 2022).

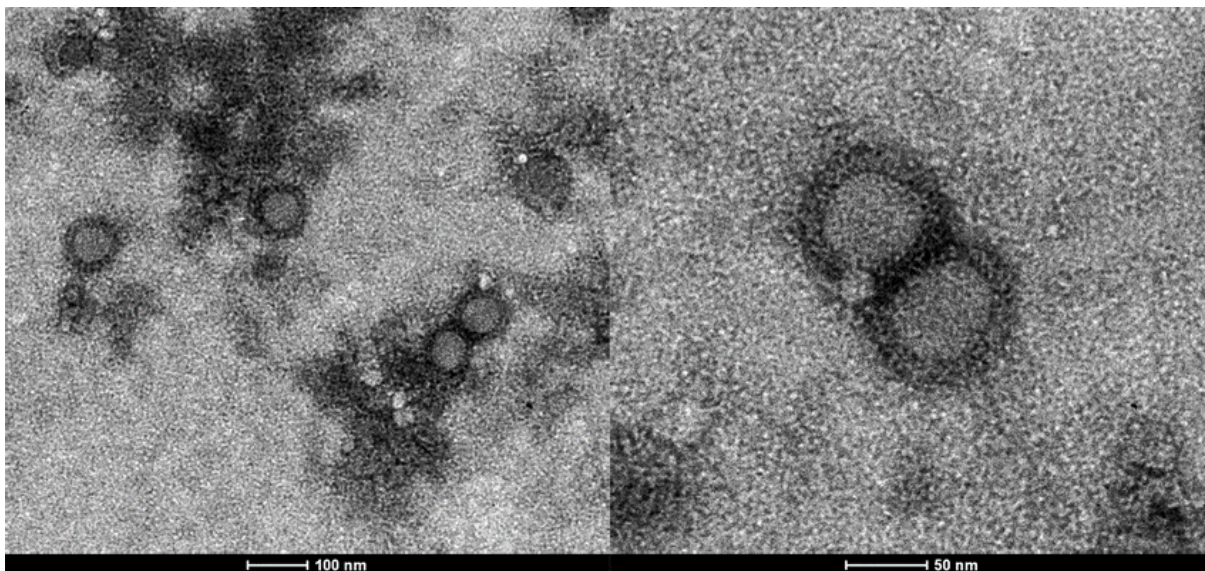


Figura 7 - Microscopia eletrônica de transmissão com registro de partícula viral de vírus pertencente à família Togaviridae (ZAMPERIN et al., 2020)

Em 2014, foram registradas duas incursões distintas do CHIKV no território brasileiro, uma no Amapá e outra na Bahia. No Amapá, constatou-se a presença do vírus do genótipo Asiático. Já na Bahia, identificou-se o genótipo East-Central-South-African (NUNES et al., 2015). Poucos meses após essa identificação, ocorreu o primeiro surto em território nacional, na cidade de Feira de Santana, Bahia (AZEVEDO, RAIMUNDA DO SOCORRO DA SILVA; OLIVEIRA; VASCONCELOS, 2015). Após a inoculação do patógeno pelo inseto vetor, o CHIKV se replica nos fibroblastos da derme e se dissemina por via hematogênica para vários tecidos, incluindo músculos, articulações e fígado. As infecções clássicas por CHIKV tem como principais sintomas: febre; dor; mialgia; fotofobia; cefaleia; dispneia e artralgia incapacitante (COUDERC; LECUIT, 2015; PETERSEN; POWERS, 2016). Diferentes características relacionadas a invasão e dano gerado pelo CHIKV no SNC apontam tanto para a possibilidade de o próprio processo de invasão por infecção das células dos plexos coroides levar ao comprometimento da barreira, como para o fato de que a resposta inflamatória exacerbada no local, pode ser prejudicial às células ali presentes (BENGUE et al., 2021).

Foram relatadas infecções por CHIKV causando sintomas neurológicos como encefalite, encefalopatia, encefalomielite, meningoencefalite, convulsões e síndrome de Guillain-Barré. Estes sintomas, especialmente quando encontrados em crianças ou pessoas idosas, podem levar a óbito (LEMANT et al., 2008; BENGUE et al., 2021; VAIRO et al., 2019). Crianças, especialmente neonatos, são consideradas

mais suscetíveis a complicações no SNC frente a infecção por CHIKV (COUDERC; LECUIT, 2015).

Apesar das taxas de mortalidade associadas ao CHIKV serem baixas, a infecção por este vírus acarreta uma morbidade substancial, exercendo um impacto profundo na qualidade de vida dos indivíduos afetados (JOSSERAN *et al.*, 2006). Os indivíduos acometidos podem permanecer com sequelas crônicas relacionadas a artralgia e dor, que podem perdurar por meses ou até mesmo anos, e resultar em prejuízos econômicos (MARIMOUTOU *et al.*, 2012; DE LIMA CAVALCANTI *et al.*, 2022)

### **1.9. Coronavírus da síndrome respiratória aguda grave 2 (SARS-CoV-2)**

O coronavírus da síndrome respiratória aguda grave 2 (SARS-CoV-2) é um vírus pertencente à família *Coronaviridae*, subfamília *Coronavirinae*, gênero *Betacoronavirus*. Os membros da família *Coronaviridae* possuem genoma formado por ssRNA, que podem chegar a aproximadamente 30mil bases. São vírus esféricos, envelopados, com 80 a 120 nm de diâmetro (GORBALENYA *et al.*, 2020; MADHUGIRI *et al.*, 2016). Os coronavírus apresentam em sua estrutura a proteína spike (S), a proteína do envelope (E), a proteína de membrana (M) e a nucleoproteína (N), associada ao genoma viral (Figura 8) (JACKSON *et al.*, 2022).

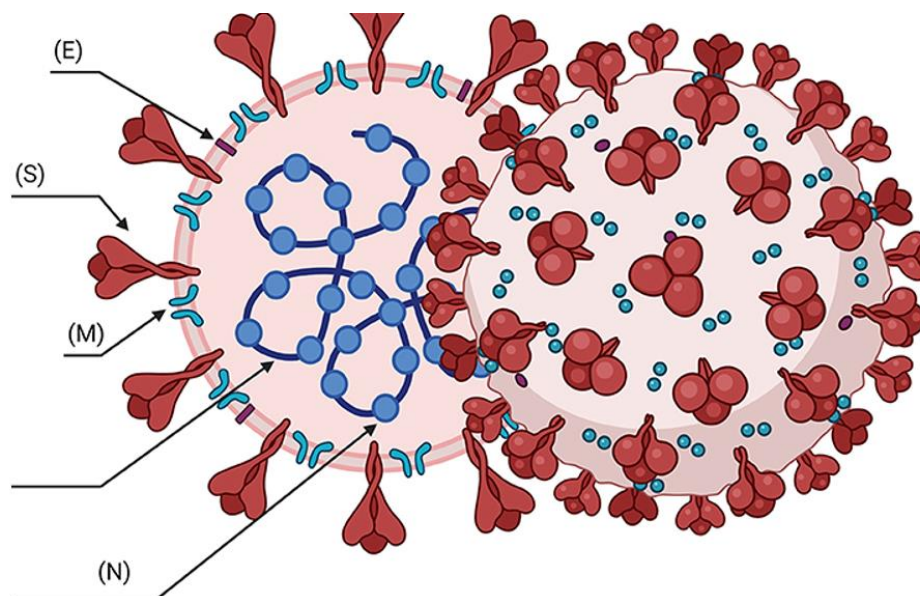


Figura 8 - Ilustração da partícula viral do SARS-CoV-2. (PIZZATO *et al.*, 2022).

No final do ano de 2019, o SARS-CoV-2 surgiu na China e rapidamente se espalhou para o resto do mundo, levando a pandemia iniciada em 2020, que gerou drásticos impactos na saúde pública e na economia. Os primeiros casos foram reportados na província de Wuhan, como quadros clínicos semelhantes a pneumonia viral (HUANG *et al.*, 2020). A doença causada pelo SARS-CoV-2 foi nomeada como *Coronavirus Disease-2019* (COVID-19) (WU; CHEN; CHAN, 2020).

A transmissão de SARS-CoV-2 ocorre principalmente por meio de gotículas expelidas pelo sistema respiratório (MEYEROWITZ *et al.*, 2021). A infecção pode ser assintomática ou ainda apresentar sintomas mais brandos como febre, tosse, dispneia, diarreia, mialgia e fadiga, por exemplo. Em casos mais graves o paciente pode apresentar hipóxia, frente a síndrome respiratória aguda grave. Estas complicações requerem hospitalização e por vezes o uso de ventilação mecânica (OCHANI *et al.*, 2021).

Até abril de 2024, 775,379,864 milhões casos de COVID-19 foram notificados em todo o mundo, com 7,047,396 milhões de óbitos associados (OMS, 2024). No mesmo período no Brasil, foram confirmados 38.743.918 casos, com 711.380 óbitos (Brasil, 2024).

Crianças de todas as idades podem se infectar com o SARS-CoV-2, e os sintomas podem ser amplamente variados (CUI *et al.*, 2021). Foi relatada síndrome inflamatória multissistêmica em crianças com COVID-19, com sintomas como febre,

vômito e diarreia, dor abdominal e erupções cutâneas. Além disso, pacientes com síndrome inflamatória multissistêmica precisam, com frequência, de cuidados em Unidade de Terapia Intensiva (UTI) (MARTINS; PRATA-BARBOSA; DA CUNHA, 2021; RADIA *et al.*, 2021). Um estudo multicêntrico, realizado no continente europeu, observou a evolução de 582 crianças com *COVID-19*, a média de idade era de cinco anos. Destes, 62% foram internados e 8% precisaram de cuidados intensivos e quatro foram a óbito (YAMAMOTO *et al.*, 2020).

Sintomas no SNC relacionados à *COVID-19* foram encontrados em até 73% dos casos em que o paciente foi hospitalizado. Cefaleia, mialgia e comprometimento na consciência são os sintomas mais relatados, mas foram reportados outros desdobramentos como encefalopatias, encefalomielite, meningoencefalite, encefalite, mielite, derrames e trombose (MAURY *et al.*, 2021; ZAMANI; POUREMAMALI; REZAEI, 2022).

## 2. Justificativa

Crianças, especialmente neonatos estão vulneráveis a infecções que podem acometer o SNC. Esses quadros ganharam maior relevância uma vez que foram introduzidas vacinas para prevenção de meningites bacterianas. As meningites, meningoencefalites e encefalites virais podem ser causadas por uma vasta gama de agentes etiológicos, que em geral também estão associados com outras complicações e manifestações clínicas.

Em geral, as infecções virais que afetam o SNC não possuem sinais e sintomas patognomônicos, exigindo exames complementares para a identificação do agente etiológico. Estes exames podem ser realizados a partir de imunoenaios e de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), considerada padrão ouro. Apesar da existência destas técnicas, no Brasil os hospitais em geral não estendem as investigações quando a origem bacteriana ou fúngica é eliminada, tendendo a tratar as infecções do SNC classificadas como virais com antivirais para herpesvírus. Isto acontece, pois, além das limitações quanto à realização dos testes moleculares na rotina da maioria dos hospitais, o desfecho das infecções virais no SNC tende a ser benigno e autolimitado.

Ainda que exista a tendência em infecções virais no SNC terem desfecho benigno, a correta identificação do agente é de fundamental importância para vigilância epidemiológica e para o melhor entendimento dos quadros patológicos associados aos respectivos vírus. Somente a partir da produção de dados robustos relativos a estas infecções em crianças, é que podem ser desenvolvidos ou aperfeiçoados, programas de promoção e prevenção em saúde, avaliação da situação epidemiológica e identificação de possíveis surtos, e medicações como antivirais, que sejam capazes de atuar no SNC.

Em trabalhos anteriores realizados com pacientes pediátricos atendidos no mesmo hospital, a importância de vírus como responsáveis por alterações no SNC foi evidenciada, especialmente no caso dos orthoflavivírus. No presente estudo, houve continuidade dos testes para os principais vírus relacionados com infecção em SNC, identificados anteriormente. Estas análises contribuem para a geração de conhecimento de cunho epidemiológico e permitem a vigilância de diversos vírus em circulação na região, que estão relacionados tanto a quadros como encefalites e

meningites, como a surtos ocasionais com manifestações clínicas diversas.

Ainda, a análise dos aspectos clínicos, relacionados aos processos infecciosos virais em pacientes pediátricos, a partir dos exames realizados e sintomas relatados, contribui para a geração de conhecimento fundamentado sobre a patogênese. Isto pode direcionar intervenções terapêuticas mais eficazes e continuidade do acompanhamento do paciente de forma mais assertiva. Essa abordagem pode permitir o aprimoramento da qualidade do cuidado prestado aos pacientes pediátricos afetados.

### **3. Objetivos**

#### **3.1. Objetivo geral**

Investigar vírus causadores de infecções no sistema nervoso central (HSV-1, HSV-2, VZV, ENTV, DENV, ZIKV, CHIKV e outros flavivírus e SARS-CoV-2) em pacientes pediátricos, atendidos no Hospital Infantil João Paulo II, em Belo Horizonte, Minas Gerais entre dezembro de 2021 e setembro de 2023.

#### **3.2. Objetivos específicos**

2- Investigar o material genético de HSV-1, HSV-2, VZV, ENTV, DENV, ZIKV, CHIKV e outros flavivírus e SARS-CoV-2 em amostras de LCR de crianças atendidas no Hospital Infantil João Paulo II, entre , dezembro de 2021 e setembro de 2023, com alterações no SNC.

1- Descrever o perfil socioepidemiológico e clínico dos pacientes que tiveram infecção viral confirmada, através dos dados obtidos nos prontuários.

3- Analisar e comparar os dados relacionados a sintomas e exames laboratoriais realizados, dos pediátricos com infecção por DENV e ENTV, detectados durante os anos de 2014 a 2019.

## **4. Materiais e métodos**

### **4.1. Ética na pesquisa**

O projeto foi previamente submetido e aprovado em comitê de ética em pesquisa com seres humanos (Comitê de ética: Fhemig CAAE 66691617.2.3002.5119; UFMG CAAE: 09273012.9.0000.5149). Este projeto recebeu o apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG).

Todas as amostras a serem utilizadas no projeto, foram obrigatoriamente oriundas de pacientes em que seus pais ou responsáveis legais estiveram de acordo, por meio de assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).

### **4.2. Delineamento do Estudo**

Este foi um estudo retrospectivo e descritivo, feito a partir de amostras de LCR de conveniência, obtidas de pacientes pediátricos atendidos no Hospital Infantil João Paulo II entre dezembro de 2021 e setembro de 2023. As amostras foram obtidas por profissionais do próprio hospital, a partir de punção lombar. Amostras de pacientes com suspeita de infecção no sistema nervoso central com idades de até 16 anos foram coletadas. Pacientes com tempo de vida inferior a 2 meses e que apresentavam febre sem causa aparente, também foram englobadas no estudo. Estes mesmos pacientes tiveram os dados dos prontuários médicos coletados (Figura 9). Adicionalmente, dados dos prontuários relacionados a diagnósticos de vírus identificados em estudos prévios, com pacientes do mesmo hospital em maior frequência (ENTV e DENV), foram consultados e analisados comparativamente.

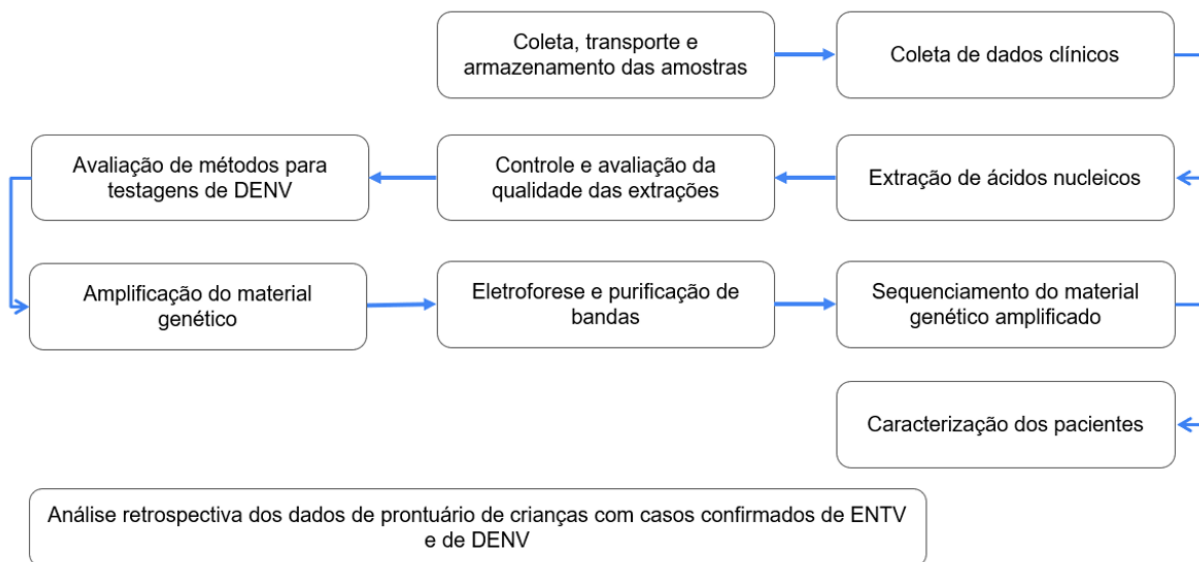


Figura 9 - Esquemática do fluxo de trabalho adotado ao longo do desenvolvimento do presente estudo.

### 4.3. Coleta, transporte e armazenamento das amostras

Foram coletadas 196 amostras de LCR de neonatos, bebês e crianças de até 16 anos de idade, atendidas no Hospital Infantil João Paulo II, com suspeita de doença com alteração em SNC, entre dezembro de 2021 e setembro de 2023. O hospital Infantil João Paulo II é um hospital de referência em pediatria infectocontagiosa e acolhe pacientes encaminhados de diversas regiões de Minas Gerais. A coleta do líquido destinou-se para outras análises no próprio hospital. A partir deste material foram feitas alíquotas em criotubos, que foram armazenadas em tanque de nitrogênio líquido até que fossem transportadas em caixas para transporte de material biológico, com gelo seco em seu interior, até o Laboratório de Vírus (ICB/UFMG). Assim que recepcionadas no laboratório de pesquisa, as amostras foram verificadas quanto a sua identificação (numeração do prontuário) e integridade do congelamento, e imediatamente armazenadas a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

Ao descongelar as amostras de LCR para extração de material genético pela primeira vez, alíquotas de aproximadamente 600  $\mu\text{L}$  foram retiradas do conteúdo original e armazenadas em criotubos à parte. Estas alíquotas foram identificadas como “alíquotas de trabalho”, uma vez que foi a partir destas alíquotas que todas as extrações foram realizadas. Armazenar parte do material biológico como estoque e outra parte como material para trabalho contribui para melhor preservação do

espécime biológico de interesse e ainda permite que sejam armazenados em freezers diferentes, buscando proteger o material de estudo contra problemas mecânicos e elétricos que os freezers ou às instalações elétricas pudessem apresentar.

#### **4.4. Coleta de dados epidemiológicos e clínicos**

A partir da numeração do prontuário, às informações epidemiológicas e clínicas dos pacientes que tiveram o LCR coletado, foram obtidas com o Hospital Infantil João Paulo II. Dados como o sexo, idade, local de residência, sinais e sintomas, exames realizados e desfecho clínico foram coletados e transferidos para uma planilha, onde as informações de nomes dos pacientes foram substituídas por códigos de identificação, de forma a preservar a identidade do paciente.

#### **4.5. Extração de ácidos nucleicos**

##### **4.5.1. Extração de RNA**

Após descongelamento mediante exposição das amostras de LCR a temperatura ambiente, o RNA total presente nas amostras biológicas foi obtido com o auxílio do kit de extração QIAamp® Viral RNA Mini Kit (QIAGEN, EUA), de acordo com o protocolo descrito pelo fabricante. Após a extração, com o objetivo de descongelar menos e preservar o RNA para que ele fosse usado com bom aproveitamento em todos os testes programados, o volume final (aproximadamente 60 µL) foi dividido entre dois tubos, que foram igualmente identificados e armazenados em freezer a -80°C.

##### **4.5.2. Extração de DNA**

As primeiras 20 amostras de LCR que tiveram o DNA extraído, foram submetidas a protocolo de extração com o Kit Roche - High Pure Viral Nucleic Acid (Roche, EUA), conforme descrito pelo fabricante. No entanto, após observação relacionada volume escasso de líquido presente nas amostras biológicas, além do volume de LCR necessário para a extração de DNA (200 µL), em conjunto com o volume necessário para a extração de RNA (140 µL), foi possível observar que para parcela das amostras, não haveria material biológico o suficiente. Desta forma, para obtenção de DNA total das demais amostras, foi utilizado protocolo de extração por aquecimento, descrito por Oliveira *et al.* (2017), em que um volume de 10 µL de LCR foi diluído em 90 µL de água livre de nucleases, que foi então aquecida durante 10 minutos a 90°C. Após a extração de DNA por aquecimento, o material foi armazenado em freezers a -20°C até o momento dos testes.

#### **4.6. Controle das extrações**

Todas as extrações realizadas foram acompanhadas por um controle negativo da reação, que seguiu às amostras da etapa de extração até o final das reações de amplificação do material genético. Esta medida buscou garantir a ausência de contaminação cruzada entre as amostras no processo de extração. Outra medida que buscou avaliar a viabilidade do material genético após a extração foi a submissão das amostras à qPCR ou a RT-qPCR, tendo como alvo o gene da  $\beta$ -actina humana.

#### **4.7. Determinação do método para testagem de DENV, a partir da Investigação da sensibilidade de diferentes testes de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)**

O projeto de pesquisa que resultou neste estudo vem sendo conduzido de forma contínua, por estudantes de mestrado ou de doutorado desde o ano de 2011, e até o momento, as últimas amostras incluídas no projeto são datadas de 2023.

Ao longo destes anos, a quantidade de casos detectados como positivos para DENV apresentou variação e a metodologia utilizada para investigação destes vírus foi modificada (tabela 3). Nos anos em que a reação utilizada foi a publicada por Santiago *et al.* (2013), houve um total de 5 casos identificados como positivos para DENV. Nos anos em que o método estabelecido por Bronzoni *et al.* (2005) foi performado, houve um total de 70 casos identificados como positivos para DENV (tabela 3).

Tabela 3 - Relação de pesquisas prévias realizadas com pacientes pediátricos advindos do HIJPII

<b>Autor</b>	<b>Vírus testados</b>	<b>Amostras positivas (%)</b>	<b>Vírus identificados (n)</b>	<b>Método utilizado para pesquisa de DENV</b>
Danilo Bretas de Oliveira	DENV, ZIKV, YFV, SLEV, WNV, JEV, CHIKV, ENTV, HHV-1/2 e HHV-3, HHV-5	62.9%	ENTV (31), HHV-3 (6), DENVs (5), HSV-1/2 (1), HHV-5 (1)	Santiago <i>et al.</i> , (2013)
Paula Eillanny Silva Marinho	DENV, ZIKV, YFV, SLEV, WNV, CHIKV, ENTV, HHV-1/2 e HHV-3	18%	DENV (17), ENTV (12), HHV-1/2 (9), ZIKV (10), YFV (6)	Bronzoni <i>et al.</i> , (2005)
Ana Paula Correia Crispim	DENV, ZIKV, YFV, SLEV, WNV, CHIKV, ENTV, HHV-1/2 e HHV-3	36%	DENV (53), ZIKV (10), ENTV (5), YFV (1)	Bronzoni <i>et al.</i> , (2005)
Walter Rebuite dos Santos Junior	DENV, ZIKV, YFV, SLEV, WNV, CHIKV, MAYV, OROV, HHV-1, HHV-3, ENTV e SARS-CoV-2	5,30%	ENTV (8) e ZIKV (1)	Santiago <i>et al.</i> , (2013)

São demonstrados os autores, assim como os respectivos achados em cada estudo, além do autor relacionado com a metodologia de escolha para as pesquisas para o metirral genético de DENV.

Desta forma, visando comparar a sensibilidade de ambos os métodos para que o mais adequado fosse incorporado ao presente estudo, às reações de SANTIAGO *et al.* (2013) e de DE MORAIS BRONZONI *et al.* (2005) foram

analisadas. Para isto, controles positivos de DENV 1 e 2 (Obtidos a partir de experimentos de multiplicação viral em células, feitas por estudantes que desenvolveram seus projetos de pesquisa anteriormente no mesmo laboratório, e que estavam conservadas em freezer -80 °C) após a extração do material genético, foram submetidos a cinco diluições seriadas e então estas diluições foram utilizadas para a realização das respectivas reações.

A metodologia elaborada por DE MORAIS BRONZONI *et al.* (2005) trata-se de uma *semi-nested* PCR, em que na primeira reação são utilizados o iniciador *Forward* FG1 (TCAAGGAACTCCACACATGAGATGTACT) e o iniciador *Reverse* FG2 (GTGTCCCATCCTGCTGTGTCATCAGCATAACA), gerando amplicons de aproximadamente 958 pb da região NS5 do genoma viral. Na segunda reação, o iniciador FG1 é novamente utilizado, em conjunto com um iniciador *Reverse* específico para cada um dos vírus contemplados na reação. Para investigar a presença de DENV 1, é utilizado o iniciador *Reverse* nDEN1 (CGTTTTGCTCTTGTGTGCGC), gerando amplicon de 472 pb. Para a pesquisa de DENV 2, é utilizado o iniciador *Reverse* nDEN2 (GAACCAGTTTGTTTDRTTTCATAGCTGCC), com amplicon de 316 pb. DE MORAIS BRONZONI *et al.* (2005) desenharam a primeira reação da *semi-nested* PCR, como um processo “*two step*”, com síntese de cDNA separada da primeira amplificação. Neste estudo, foram testadas a metodologia one step e two step para a transcrição reversa e primeira reação de amplificação (primers externos)

Para a *semi-nested* PCR “*two step*”, cada reação de cDNA foi feita a partir de 8 µL de RNA, e 1 µL do iniciador *Reverse* FG2, que foram incubados em termobloco 65 °C por 5 minutos, e em seguida levados a imersão em gelo por 1 minuto. Após a incubação em gelo, 8 µL do líquido contendo o RNA e o FG2 foram adicionados em um tubo contendo 4 µL de *buffer* 5x, 1 uL da enzima transcriptase reversa *SuperScript* III™ ((Invitrogen, EUA), 1 uL de dNTP's (desoxirribonucleótidos fosfatados), 1 µL de DTT (dithiothreitol) a 0,1 µM e 3 µL de água livre de nucleases. Para produção final do cDNA, este tubo então foi incubado a 50 °C por 50 minutos e então a 70 °C por 15 minutos.

A primeira reação da *semi-nested* PCR “*two step*” foi feita com 3,2 µL do cDNA por tubo como *template*, assim como 10 µL de *Buffer* 1 x, 5,8 µL de água livre de nucleases, 0,5 µL do iniciador FG1 e 0,5 µL do iniciador FG2. Para amplificação do material genético, este material foi então submetido ao seguinte ciclo em um

termociclador para reação de PCR convencional: 94 °C por 3 minutos, seguido de 35 repetições de 94 °C por 30 segundos, 42 °C por 30 segundos e 72 °C por 30 segundos, finalizando uma vez de com 5 minutos a 72 °C.

A primeira reação da *semi-nested* PCR “*one step*” foi realizada com 8 µL de RNA por tubo, em conjunto com 10 µL buffer 1 x, 0,4 µL de enzima transcriptase reversa *GoScript™* (promega, EUA) , 0,5 µL do iniciador FG1 e 1 µL do iniciador FG2. Para esta reação, o ciclo adotado foi: 45 °C por 15 minutos, 94 °C por 3 minutos, seguidos de 35 repetições de 94 °C por 30 segundos, 42 °C por 30 segundos e 72 °C por 30 segundos, finalizando com uma vez de 72 °C por 5 minutos.

A segunda reação da *semi-nested* PCR, tanto para o processo feito com a primeira PCR como “*two step*”, quanto com a primeira PCR performada como “*one step*” foram feitas da mesma maneira, descrita logo abaixo. As diluições dos controles de DENV 1 e controles de DENV 2, foram testadas com 1 µL ou com 0,5 µL do amplificado da primeira reação, com o objetivo de analisar a sensibilidade do teste. Para as reações com 1 µL ou com 0,5 µL do material amplificado na primeira reação, o mix utilizado na segunda reação foi o mesmo, variando apenas no volume de água livre de nucleases (8 µL para reações com 1 µL de amplificado e 8,5 µL para reações com 0,5 µL de amplificado), a saber: 9 µL de *master mix* para PCR convencional; 1 µL de iniciador FG1 e 1 µL de iniciador nDEN1 ou nDEN2. Nesta etapa, o ciclo utilizado foi: 25 repetições de 94 °C por 1 minuto, 53 °C por 1 minuto e 72 °C por 2 minutos, finalizando com uma vez de 72 °C por 5 minutos.

A reação descrita por SANTIAGO *et al.* (2013) trata de uma RT-qPCR que faz uso de tecnologia de sonda com fluoróforos, além dos iniciadores *Forward* e *Reverse* específicos para detectar cada um dos 4 sorotipos de DENV. Esta metodologia foi desenhada para funcionar como PCR *multiplex*, tendo a capacidade de detectar os quatro sorotipos de DENV numa mesma reação. Para este estudo, as reações de SANTIAGO *et al.* (2013) foram feitas separadamente para cada um dos quatro sorotipos de DENV. Este ensaio foi desenvolvido e validado para o *Center For Disease Control* (CDC), agência do departamento de saúde e serviços humanos, do governo dos Estados Unidos da América.

Para fazer a comparação com a PCR convencional, , foram utilizados 0,2 µL de sonda a 10 µM, 0,5 µL de iniciador *Forward* e 0,5 µL do iniciador *Reverse* a 10 µM, 1,6 uL de água livre de nucleases, 0,2 µL de enzima transcriptase reversa

*GoScript*<sup>TM</sup> (promega, EUA), 5,0 µL de *master mix* do kit GoTaq 1-step RT-qPCR (Promega, EUA) além de 2 µL do RNA de cada uma das diluições seriadas feitas com o material genético adotado como controle positivo para DENV 1 e DENV 2. As reações de DENV 1 tem como alvo a região NS5 do genoma viral, detectada com a sonda *D1-Probe* (FAM-CATGTGGTTGGGAGCACGC-TAMRA), em conjunto com o iniciador *Forward* D1-F (CAAAAGGAAGTCGTGCAATA) e o iniciador *Reverse* D1-R (CTGAGTGAATTCTCTCTACTGAAC). Às reações de DENV 2 amplificam a região E do genoma viral, detectada com a sonda *D2-Probe* (FAM-CTCTCCGAGAACAGGCCTCGACTTCAA-TAMRA), em conjunto com o iniciador *Forward* D2-F (CAGGTTATGGCACTGTCACGAT) e o iniciador *Reverse* D2-R (CCATCTGCAGCAACACCATCTC). Foram utilizados ciclos de 45°C por 15 minutos, 95°C por 2 minutos; seguidos de 40 repetições de 95°C por 15 segundos e 60°C por 60 segundos.

Além dos dois testes anteriormente adotados para pesquisa de DENV em LCR, outros dois testes foram incluídos nestas comparações. A reação descrita por PATEL *et al.* (2013) sendo uma técnica de PCR pan-orthoflavivirus. A reação descrita por PATEL *et al.* (2013) foi realizada como RT-qPCR com corante *SYBR green*. É capaz de amplificar a região NS5 dos flavivírus, desta forma esta é uma reação que tem como capacidade detectar diversos vírus, para além do próprio DENV. Para isto, a reação foi feita a partir de 0,5 µL do iniciador *Forward* (TACAACATGATGGGGAARAGAGARAA) e 0,5 µL do iniciador *Reverse* (GTGTCCCAGCCNGCKGTGTCATCWGC), ambos em uma concentração de 10 µM, 1,8 µL de água livre de nucleases, 0,2 µL de enzima transcriptase reversa *GoScript*<sup>TM</sup> (promega, EUA), além de 5 µL de *master mix* do kit GoTaq 1-step RT-qPCR (Promega, EUA) contendo o intercalante de DNA dupla fita *SYBR green* e 2 µL de material genético viral. Para esta reação, 37 °C por 45 minutos, 95 °C por 10 minutos, seguidos de 40 repetições de 95 °C por 10 segundos, 60 °C por 30 segundos e 72 °C por 30 segundos, além da curva de dissociação (ou curva de *melting*) ao final da corrida. A temperatura identificada na curva de dissociação, chamada de temperatura de *melting*, é fundamental para a correta discriminação do alvo amplificado, uma vez que a amplificação detectada pelo *SYBR green* pode não ter especificidade para o alvo de interesse na reação.

O último teste aqui avaliado foi desenhado por ALM *et al.* (2014) e consiste em duas reações diferentes e simultâneas de RT-qPCR com a finalidade de

amplificar a região UTR 3' dos DENV 1, 2, 3 e 4. Esta reação foi desenhada para ser realizada com uma sonda, no entanto, por indisponibilidade da sonda em laboratório, esta análise foi feita com tecnologia *SYBR green*. Foram utilizados um iniciador *Forward* (DENV\_F- GCATATTGACGCTGGGARAGAC) e dois iniciadores *Reverse*. Um destes iniciadores *Reverse* (DENV\_R1-3- TTCTGTGCCTGGAATGATGCTG) possui afinidade por se anelar em fragmento do material genético de DENV 1, 2 E 3 e o outro iniciador *Reverse* (DENV\_R4- YTCTGTGCCTGGATWGATGTTG) foi desenhado para se anelar a um fragmento do material genético de DENV 4. O preparo das reações se deu da seguinte forma: 0,5 µL do iniciador *Forward* e 0,5 µL do iniciador *Reverse* em concentração de 10 µM, 1,8 µL de água livre de nucleases, 0,2 µL de enzima transcriptase reversa *GoScript™* (promega, EUA), 5 µL de *master mix* do kit GoTaq 1-step RT-qPCR (Promega, EUA) contendo o intercalante de DNA dupla fita *sybr green* e 2 µL de material genético viral. Para este teste, o ciclo adotado foi de 45°C por 15 minutos, 95°C por 2 minutos; seguidos de 40 repetições de 95°C por 15 segundos e 60°C por 60 segundos, seguido da curva de *melting*.

#### 4.8. Amplificação do material genético

Após a extração do material genético, foram realizadas as Reação em Cadeia da Polimerase em tempo real (qPCR) ou a RT-qPCR (qPCR precedida de transcrição reversa), a depender do material genético que foi pesquisado. As reações RT-qPCR foram feitas pela metodologia “*One Step*”.

As reações de amplificação foram feitas em duplicata e foram consideradas positivas apenas aquelas em que a amplificação foi observada para as duas réplicas. Foram utilizados os aparelhos StepOne Real-Time PCR Systems (Applied Biosystems, EUA), QuantStudio 3 (Applied Biosystems, EUA) e QuantStudio 6 Pro (Applied Biosystems, EUA). Para todos os casos, foram empregados os reagentes do kit GoTaq 1-step RT-qPCR (Promega, EUA)

Em todas as reações de amplificação do material genético, além dos poços contendo os reagentes e o RNA ou DNA a ser investigado, havia poços em duplicata de controles positivos para cada vírus testado na reação em questão, assim como

os controles negativos obtidos em cada processo de extração e controles negativos contendo apenas os reagentes utilizados na PCR.

As amostras foram submetidas a pesquisa dos seguintes vírus: ENTV; ZIKV; CHIKV; DENV 1, 2, 3 e 4; SARS-CoV-2; HSV-1; HSV-2 e VZV. Adicionalmente, iniciadores pan-flavivírus (PATEL *et al.*, 2013) foram adotados na testagem das amostras de LCR. Às reações de RT-qPCR para ENTV, ZIKV, CHIKV, DENV 1, 2, 3 e 4 e SARS-CoV-2 foram realizadas com sondas Taqman (tabela 4) Os demais alvos foram testados com fluorescência *SYBR green* (tabela 5). As condições adotadas nas corridas, para o caso das PCRs com transcrição reversa, foram: 45°C por 15 minutos, 95°C por 2 minutos; seguidos de 40 repetições de 95°C por 15 segundos e 60°C por 60 segundos. Caso a reação tenha sido realizada com *SYBR green*, foi adicionada uma etapa de curva de *melting*. Quando a reação performada não buscava por RNA e sim por DNA, e, portanto, não necessitando da etapa de transcrição reversa, o ciclo adotado foi: 95°C por 2 minutos; 95°C por 15 segundos e 60°C por 60 segundos, seguida de curva de melting.

Tabela 4 -Relação das reações de RT-qPCR badeados em iniciadores e sondas utilizados neste estudo

Iniciadores e sondas	Sequência	Gene	Referência
CHIKV-F	5'-AAGCTYCGCGTCCTTTACCAAG-'3	E	Pastorino <i>et al.</i> (2005)
CHIKV-R	5'-CCAAATTGTCCYGGTCTTCCT-'3		
CHIKV-P	CCAATGTCYTCMGCCTGGACACCTTT-TAMRA-'3		
ZIKV-F	5'-CCGCTGCCCAACACAAG-'3	E	Lanciotti <i>et al.</i> (2008)
ZIKV-R	5'- CCACTAACGTTCTTTTGACAGACAT-'3		
ZIKV-P	AGCCTACCTTGACAAGCAGTCAGACACTCAA-TAMRA-'3		
DENV1-F	5'-CAAAAGGAAGTCGYGCAATA-'3	NS5	
DENV1-R	5'-CTGAGTGAATTCTCTCTGCTRAAC-'3		
DENV1-P	5'-6FAM-CATGTGGYTGGGAGCRCGC-TAMRA-'3		
DENV2-F	5'-CAGGCTATGGCACTGTCACGAT-'3	E	
DENV2-R	5'-CCATYTGACAGCACCACCATCTC-'3		
DENV2-P	CTCYCCRAGAACGGGCCTCGACTTCAA-TAMRA-'3		
DENV3-F	5'-GGACTRGACACACGCACCCA-'3	prM	Santiago <i>et al.</i> (2013)
DENV3-R	5'-CATGTCTCTACCTTCTCGACTTGYCT-'3		
DENV3-P	ACCTGGATGTCGGCTGAAGGAGCTTG-TAMRA-'3		
DENV4-F	5'-TTGTCCTAATGATGCTRGTCG-'3	prM	
DENV4-R	5'-TCCACCYGAGACTCCTTCCA-'3		
DENV4-P	TYCCTACYCCTACGCATCGCATTCCG-TAMRA-'3		
ENTV-F	5'-ACATGGTGTGAAGAGTCTATTGAGCT-'3	UTR 5'	Dierssen <i>et al.</i> (2008)
ENTV-R	5'-CCAAAGTAGTCGGTTCCGC-'3		
ENTV-P	TCCGGCCCCTGAATGCGGCTAAT-TAMRA-'3		

. F: iniciador senso (forward), R: iniciador antissenso (reverse), P: Sonda.

Tabela 5 - Relação das reações de qPCR e RT-qPCR badeados em iniciadores uso de intercalante SYBR green utilizados neste estudo

Iniciadores	Sequência	Gene	Referência
HSV1/2-F	5'-TTGTCTCCTTCCGTGTTTCAGT- '3	TK	WILSON et al., 2006
HSV1/2-R	5'-GGCTCCATACCGACGATCTG-'3		
VZV-F	5'-CATCTGCAATTATGCGTCCAA-'3	DNA pol	OLIVEIRA, 2015
VZV-R	5'-GTTTCCATTGCTGAAT-'3		
Pan-orthoflavivirus-F	5'- TACAACATGATGGGGAARAGAGAR AA-'3	NS5	PATEL et al., 2013
Pan-orthoflavivirus-R	5'- GTGTCCCAGCCNGCKGTGTCATCW GC-'3		

. F: iniciador senso (forward), R: iniciador antissenso (reverse).

Os iniciadores para amplificação de cada fragmento de interesse foram obtidos de acordo com literatura que descreve as sequências e os detalhes necessários para cada ciclo. Para detecção do material genético de SARS-CoV-2, foi utilizado o kit de iniciadores e sondas “SARS-CoV-2 (2019-nCoV) CDC qPCR Probe Assay” (IDT, EUA). As amostras consideradas positivas em RT-qPCR para ENTV, foram submetidas a PCR convencional, com iniciadores capazes de gerar fragmentos de maior tamanho, visando o sequenciamento do material genético para classificação. No caso deste estudo, foram utilizados iniciadores com afinidade para o gene VP1 dos ENTV. Esta reação foi realizada como um procedimento de PCR one step, em que uma etapa adicional, de transcrição reversa, é incluída no começo da reação, não sendo necessário realizar uma reação a parte para obter cDNA. Esta reação teve como objetivo, diante de uma amostra positiva, gerar fragmento de 357 bases (tabela 6).

Tabela 6 – Iniciadores utilizados na reação de PCR convencional para enterovírus.

Iniciadores	Sequência	Gene	Amplicon (bp)	Referência
ENTV	5'-CICCIGGIGGIAYRWACAT-'3 5'-MIGCIGYIGARACNGG-'3	VP1	357	OBERSTE et al., 2006

#### 4.9. Eletroforese em gel de poliacrilamida e purificação das bandas de Gel

Os produtos obtidos em PCR convencional foram visualizados em gel de poliacrilamida, contendo solução com 8% de acrilamida (tampão tris-borato/EDTA, persulfato de amônio, tetrametiletenodiamina e água ultrapura tipo I (Milli-Q, Merck, Alemanha). Foram adicionados 18 microlitros ( $\mu\text{L}$ ) do produto amplificado e 2  $\mu\text{L}$  de *loading dye* em cada poço. Com géis em cubas verticais, os eletrodos de polaridades opostas incidiram uma tensão de 100 volts por uma hora. Ao terminar este período, os géis foram acondicionados em recipientes contendo água ultrapura tipo I e 1  $\mu\text{L}$  de corante SYBR Gold (Invitrogen – Thermo Fisher Scientific, EUA) para cada 10 mL de água. Estes recipientes foram completamente cobertos por papel alumínio. Em seguida, o material descrito acima foi levado a um agitador (Compact ROCKER – CR300, FINEPCR/Coréia do Sul), e seguindo às recomendações do fabricante, o recipiente com os géis permaneceu por 30 minutos no agitador. Encerrando o tempo do agitador, um transiluminador de luz azul (Safe Imager 2.0 - Invitrogen – Thermo Fisher Scientific, EUA) permitiu a visualização das bandas. As bandas que apresentaram tamanho esperado, determinado previamente pelo tamanho do amplicon.

As amostras que tiveram as bandas separadas dentro do tamanho esperado na etapa de eletroforese, foram submetidas à purificação do material genético. Após retirar com bisturi a banda de interesse, este material foi levado a microtubos de 0,6 mL, previamente furados no fundo com uma agulha. Este microtubo foi inserido em outro, desta vez de 1,5 mL, e foi então submetido a processo de centrifugação durante 1 minuto a 10.000 xg em temperatura de 4°C. Durante a centrifugação, o material que estava contido no tubo de 0,6 mL, foi transferido para o tubo de 1,5 mL. Ao terminar a centrifugação o tubo de 0,6 mL foi descartado e 70  $\mu\text{L}$  de água livre de nucleases foram adicionados ao tubo de 1,5 mL. O conteúdo presente no tubo foi homogeneizado e guardado em temperatura de 4°C por 12 horas. Ao fim deste período, o tubo foi homogeneizado e centrifugado por 1 minuto a 10000 xg em 4°C. O sobrenadante foi coletado, transferido para outro tubo, este tubo foi armazenado em temperatura de -20°C, permanecendo sob esta condição até o uso para sequenciamento.

#### **4.10. Sequenciamento do material genético amplificado**

Os sobrenadantes obtidos como produto da purificação das bandas de gel foram submetidos a processo de sequenciamento por eletroforese capilar pelo método dideoxi (Sanger *et al*, 1977), performado em sequenciador automático ABI3130 (Life Technologies, EUA). Os dados obtidos em sequenciamento foram analisados com o auxílio do programa Sequence Scanner Software 2 (Applied Biosystems, 2012) e os fragmentos sequenciados foram submetidos a comparação com outras sequências depositadas em banco de dados do *National Center for Biotechnology Information*, por meio de ferramenta de alinhamento de sequências *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) (ALTSCHUL *et al.*, 1990).

#### **4.11. Caracterização dos pacientes**

Todas as crianças que tiveram amostras de LCR analisadas pelo estudo, também tiveram informações dos prontuários consultados e coletados para sua caracterização e identificação. Foram coletados dados como sexo, município de origem, idade, sintomas, data do surgimento dos sintomas, exames realizados e demais observações clínicas. Os pacientes que tiveram a confirmação laboratorial qPCR ou RT-qPCR, tiveram os dados consultados e analisados.

#### **4.12. Análise retrospectiva dos dados de prontuário de crianças com casos confirmados de ENTV e de DENV**

Ao longo dos anos anteriores em que o projeto de pesquisa esteve em desenvolvimento, houve a detecção de diferentes vírus em LCR (tabela 3). Os casos positivos identificados por PCR ao longo do período de 2014 a 2019 pelos estudos anteriores foram consultados e foi observado que dos 132 casos positivos, 55 foram positivos para DENV e 25 foram positivos para ENTV. Às crianças que tiveram amostras com amplificação positiva para DENV ou para ENTV tiveram informações coletadas dos prontuários, como: sexo; idade; sintomas; tempo de internação; desfecho; hemograma; leucograma e diagnóstico final.

Após a coleta dos prontuários, para dar continuidade as análises, as informações foram tabuladas e somente os pacientes que haviam sido diagnosticados com infecção viral em SNC, tanto no hospital quanto nas análises realizadas nas pesquisas prévias foram incluídos no estudo. Destas crianças, as que apresentavam complicações de saúde para além da infecção viral em SNC também foram eliminadas das análises. Esta seleção teve por fim, evitar que outras condições de saúde ou patologias alterassem os resultados obtidos, já que o objetivo foi observar apenas as duas infecções virais de forma isolada. Desta forma, restaram 23 crianças diagnosticadas com ENTV e 25 casos de crianças diagnosticadas com DENV. Os dados coletados foram analisadas por meio do *Software* GraphPad Prism versão 9.0 (Dotmatics, EUA) e foram considerados dois grupos a serem comparados: as crianças com ENTV (n=23) e as crianças com DENV (n=25). Estes grupos tiveram cada uma das variáveis submetidas à análise da distribuição dos dados a partir do teste de Shapiro-wilk. Para os dados que seguiram um padrão de distribuição dentro de uma curva de Gauss, e portanto foram consideradas como tendo distribuição normal, o teste estatístico para avaliar a diferença entre os 2 grupos foi o de Mann-whitney. Os dados que não tiveram a distribuição considerada como normal foram submetidos ao teste t de Welch. Para os dados categóricos, foi utilizado o teste exato de Fisher. Foram considerados como diferenças estatisticamente significativas, os valores de  $p \leq 0,05$ . Houve quantidade limitada de dados nos prontuários que permitiam comparação estatística, uma vez que as informações coletadas e exames solicitados variaram entre os pacientes.

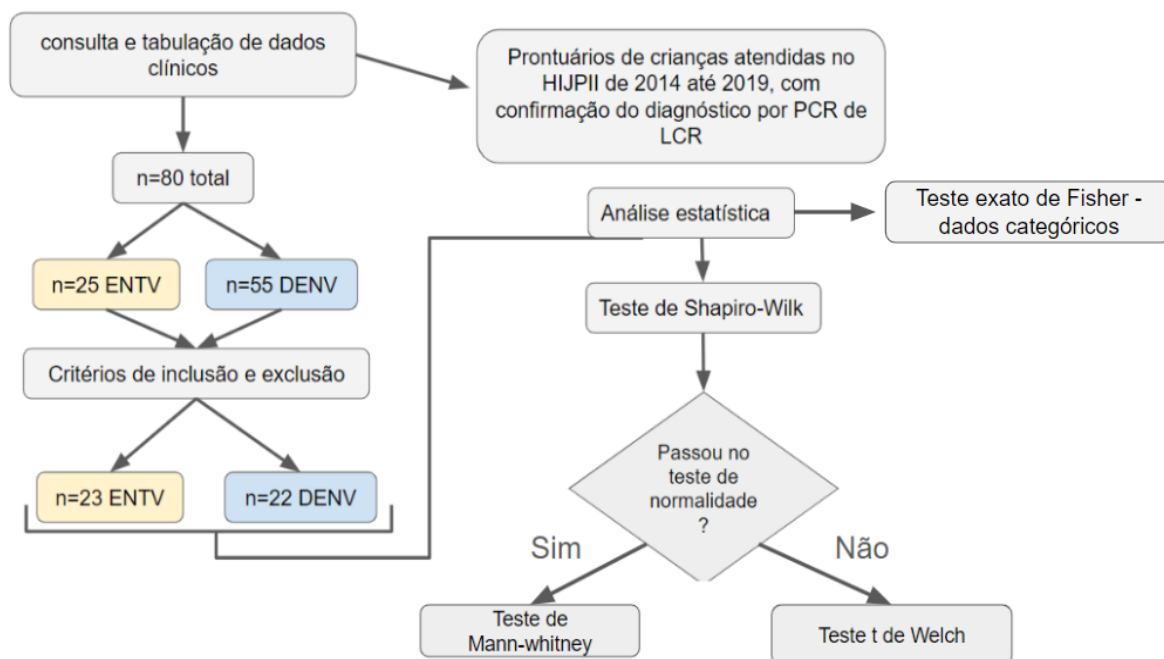


Figura 10 - Esquema do fluxo de coleta e tratamento dos dados obtidos nos prontuários dos pacientes que tiveram resultados positivos para DENV ou para ENTV entre os anos de 2014 até 2019.

## 5. Resultados

### 5.1. Avaliação para determinação da metodologia para testagem de PCR em DENV

Com objetivo de identificar a metodologia mais adequada para a realização das investigações para DENV realizadas no presente trabalho, foram comparadas diferentes metodologias baseadas em PCR (DE MORAIS BRONZONI, *et al.*, 2005 SANTIAGO *et al.*, 2013, ALM *et al.*, 2014, PATEL *et al.*, 2013) foram comparadas. O material genético foi extraído a partir de multiplicação viral feita em cultivo celular. O mesmo lote de extração de RNA para ambos os vírus foi utilizado em todas as metodologias aqui comparadas, nas diluições  $10^2$ ,  $10^3$ ,  $10^4$ ,  $10^5$  e  $10^6$ .

Após a comparação entre os quatro métodos (tabela 11), foi possível observar que a reação de RTq-PCR desenhada por ALM *et al.* (2014) foi a que apresentou menor sensibilidade, uma vez que houve detecção do genoma de DENV 1, até a diluição de  $10^3$  e para o genoma de DENV 2, a diluição de  $10^2$  (tabela 11).

Tabela 7 - Comparação entre as metodologias para testagem de DENV

Autor	Metodologia	Diluições do RNA de DENV 1					Diluições do RNA de DENV 2				
		$10^2$ (Ct)	$10^3$ (Ct)	$10^4$ (Ct)	$10^5$ (Ct)	$10^6$ (Ct)	$10^2$ (Ct)	$10^3$ (Ct)	$10^4$ (Ct)	$10^5$ (Ct)	$10^6$ (Ct)
ALM <i>et al.</i> , 2014	RT-qPCR (SYBR green)	P (23,35)	P (30,62)	N	N	N	P (25,52)	N	N	N	N
PATEL <i>et al.</i> , 2013	RT-qPCR (SYBR green)	P (25,98)	P (30,8)	P (34,52)	N	N	P (25,74)	P (31,59)	P (32,98)	P (34,55)	N
SANTIAGO <i>et al.</i> , 2013	RT-qPCR (Sonda)	P (21,88)	P (30,86)	N	N	N	P (20,61)	P (28,80)	P (31,69)	N	N
DE MORAIS BRONZONI <i>et al.</i> , 2005	<i>Semi-nested</i> PCR (one step)	P *	P *	P *	N	N	P *	P *	P *	P *	N
DE MORAIS BRONZONI <i>et al.</i> , 2005	<i>Semi-nested</i> PCR (Two step)	P *	P *	N	N	N	P *	P *	P *	P *	N

P = Positivo. N = Negativo. \* Detecção a partir da visualização de banda em gel de poliacrilamida. Portanto, nestes casos não há Ct.

A reação descrita por PATEL *et al.* (2013) foi capaz de detectar a amplificação do genoma de DENV 1 até a diluição de  $10^4$ , após 34,52 ciclos do teste. Para reação com as diluições dos controles positivos de DENV 2, a metodologia foi capaz de detectar o genoma viral até a diluição de  $10^5$ , após 34,55 ciclos do teste (tabela 11).

Os testes realizados para a reação de *Semi-nested* PCR (DE MORAIS BRONZONI *et al.*, 2005), em ambos os casos (DENV 1 e DENV 2), foram realizados com duas concentrações diferentes (1 uL e 05 uL) do material amplificado na primeira reação, que foi levado até a segunda reação. Não foi observado diferença quanto a sensibilidade da amplificação do material genético, frente às duas diluições. As observações feitas em gel de poliacrilamida indicaram que a metodologia apresenta sensibilidade para detectar a amplificação do material genético até a diluição de  $10^4$ , para DENV 1 e até a diluição  $10^5$ , para o caso de DENV 2 (tabela 11).

Por fim, a metodologia apresentada por SANTIAGO *et al.* (2013) revelou apresentar capacidade de detecção da amplificação das diluições de DENV 1 até  $10^4$  (após 37,88 ciclos) e para DENV 2, houve amplificação em um dos dois poços da duplicata da diluição de  $10^4$ , após 36,66 ciclos (tabela 11).

Desta forma, as investigações para DENV feitas neste estudo, utilizaram 2 das metodologias abordadas acima: os métodos descritos por PATEL *et al.* (2013) e por SANTIAGO *et al.* (2013). Além de terem apresentado bons resultados quanto à sensibilidade de detecção, os testes utilizam técnicas diferentes para marcar a amplificação do material genético, uma vez que a primeira reação utiliza o intercalante de DNA dupla fita *SYBR green* e a reação descrita por SANTIAGO *et al.* (2013) faz uso de sondas. Há também o fato de que os iniciadores desenhados para as reações possuem afinidades por regiões diferentes do genoma dos vírus, contribuindo assim para que mais alvos fossem investigados, relacionados aos DENV.

## **5.2. Investigação molecular dos agentes etiológicos virais em LCR**

Neste estudo, foram testadas 196 amostras de LCR, para ENTV, ZIKV, CHIKV, SARS-CoV-2, DENV 1, 2, 3 e 4, HSV 1 e 2, VZV e iniciadores com afinidade pela região NS5 dos orthoflavivirus. Estas amostras foram coletadas de crianças atendidas no Hospital Infantil João Paulo II, entre dezembro de 2021 e setembro de 2023. Foram identificadas como positivas para ENTV, um total de dez amostras, correspondendo a 5% do total de LCRs testados. Foram consideradas

como positivas, as amostras que apresentaram amplificação do material genético em duplicata. 15 (8%) amostras foram consideradas como tendo resultados inconclusivos para ENTV, uma vez que apenas um dos dois poços da duplicata apresentou amplificação do material genético. Para estas amostras com resultados inconclusivos para ENTV, o Ct médio foi de 34,68. Estas amostras foram submetidas a uma nova reação com os mesmo iniciadores e sonda e seguiram apresentando amplificação em apenas um dos dois poços.

Com exceção dos ENTV, não houve resultados positivos para os demais vírus pesquisados. As amostras tiveram o DNA extraído e foram testadas em uma mesma placa para o gene de beta-actina humana, HSV 1, HSV 2 e VZV. Entre os 196 DNAs testados, 81 (41,3%) não apresentaram amplificação para de beta-actina humana.

As amostras positivas para ENTV foram detectadas por meio de RT-qPCR, tendo um Ct médio de 36,18 (tabela 7). Para tentativa de sequenciamento e análise filogenética deste material genético, 10 amostras que testaram positivo para ENTV foram submetidas a uma nova análise, desta vez feita com uma reação de PCR convencional visando amplificar o gene VP1, com fragmento de 357 pb. Após corrida do material genético amplificado na PCR convencional, em gel de poliacrilamida, duas amostras (1498 e 1466) avaliadas apresentaram bandas de tamanhos próximos ao esperado.

Tabela 8 - Identificadores das amostras e valores de Ct para cada uma das reações positivas.

Numero de identificação do paciente	Ct médio
1498	36,34
1638	36,26
1512	35,93
1515	35,12
1518	35,9
1602	36,11
1652	35,97
1470	36,8
1466	37,7
1558	36,76

Após recorte das bandas com gel com auxílio de bisturi e protocolo de purificação, o material amplificado dessas duas reações foi enviado para a FIOCRUZ-MG para tentativa de sequenciamento por método de Sanger. Apenas para uma das reações de sequenciamento apresentou dados capazes de serem comparados e analisados, já que as outras reações não apresentaram material genético o suficiente. Após submeter a sequência que obteve bom aproveitamento à ferramenta online *Basic Local Alignment Search Tool (BLAST)*, foi identificado que o fragmento sequenciado tratava-se de um pedaço do cromossomo cinco de *Homo sapiens* (gene do hospedeiro).

### 5.3. Caracterização dos pacientes que testaram positivo para ENTV

Foram submetidas à testagem dos vírus propostos neste trabalho, 196 amostras de LCR, obtidas de crianças atendidas no HIJPII. Foi possível obter os dados dos prontuários de 174 pacientes. Levando em consideração o total de pacientes estudado, a média de idade foi de 1 ano e 5 meses, 76 (43,6%) das crianças atendidas eram do sexo feminino e 56,4% (n=98) eram do sexo masculino. Do total, 101 pacientes tinham como origem, municípios da região metropolitana de Belo Horizonte e 73 pacientes eram de Belo Horizonte. Para estes 174 pacientes, o tempo médio de internação foi de 10 dias.

Foram identificados 10 casos (5%) como positivos para ENTV por RT-qPCR.. Dos 10 casos identificados como positivo para ENTV por RT-qPCR, Destes, quatro tinham Belo Horizonte como município de residência, para os outros, cada um era originário de municípios diferentes, a saber: Contagem; Ribeirão das Neves; Antônio Pereira, Itaúna e Moeda (Tabela suplementar 1). Em relação à distribuição entre os sexos, sete eram do sexo feminino e três do sexo masculino. A média de idade entre estes pacientes foi de um ano e oito meses (variando de três meses a nove anos de idade) (Tabela suplementar 1).

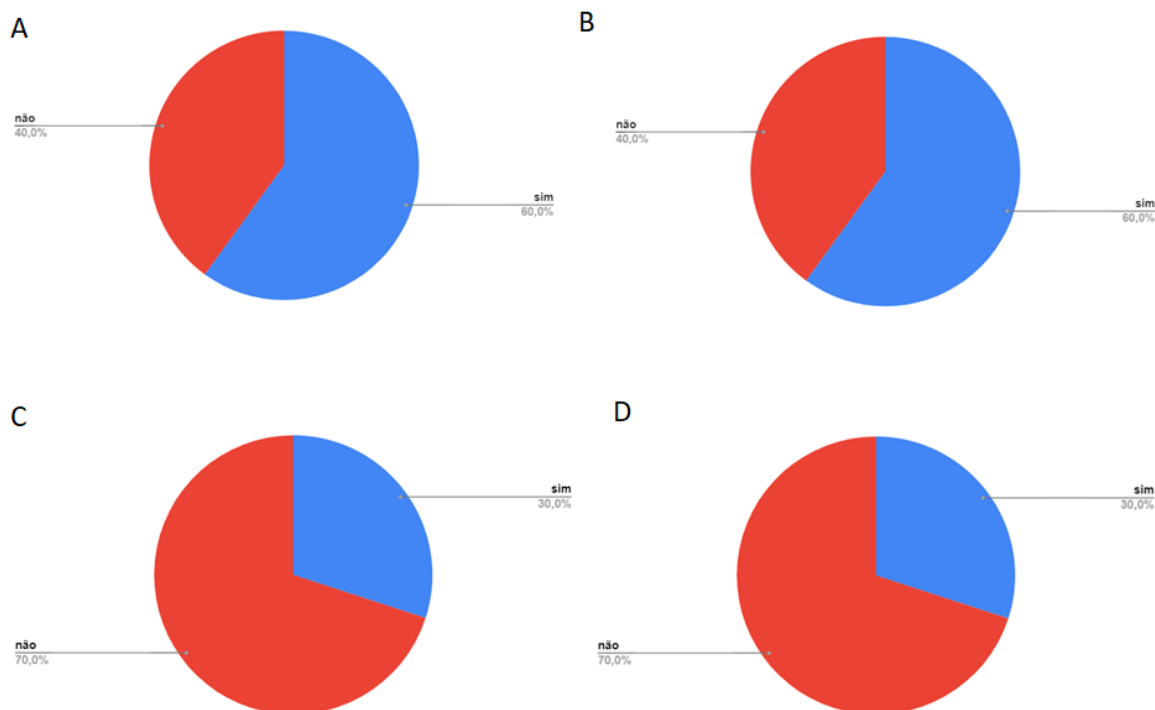
Os pacientes 1498, 1638, 1515 e 1518, receberam diagnóstico clínico de encefalite viral e ambos apresentavam outras condições que foram identificadas no processo de atendimento: o paciente 1498 foi diagnosticado como portador de Diabetes Mellitus insulino-dependente em processo de acidose metabólica e SARS e o paciente 1638 com gastroenterite/colite. O indivíduo 1515 também foi diagnosticado com COVID-19 e hérnia inguinal. Para criança identificada por 1518, houve o diagnóstico clínico de infecção por Herpesvírus. O paciente 1652 foi diagnosticado no hospital com meningite viral não especificada. O paciente com identificação 1512 apresentava quadro identificado como síndrome de Guillain barré e acidose (Tabela suplementar 1).

Os pacientes identificados por 1602, 1470, 1558, receberam diagnósticos clínicos distintos de condições associadas a infecções virais em SNC (Dor abdominal e pélvica, comunicação interatrial/permeabilidade do canal arterial e outras pneumonias bacterianas, respectivamente). Cinco dos seis pacientes apresentaram melhora do quadro e receberam alta hospitalar. O paciente 1602 foi transferido para outra unidade de atendimento, portanto não há dados sobre o desfecho clínico. O paciente 1466 foi identificado com pneumonite devido a alimento ou vômito e convulsões febris (Tabela suplementar 1).

Após coleta e observação dos dados clínicos, foi possível notar que o tempo médio de internação desses pacientes foi de seis dias. Com exceção do paciente 1602, que foi transferido para outro hospital após três dias, o menor tempo de internação foi de 5 dias (paciente 1466). Já o maior tempo de internação foi do paciente 1512, com 63 dias de internação e que estava sendo acompanhado frente síndrome de Guillain-barré (Tabela suplementar 1).

Os sintomas apresentados entre as crianças que tiveram resultados positivos para ENTV foram observados e foi possível notar que febre e vômito foram às

manifestações com maior prevalência, surgindo em 60% dos casos (Figura 11 A e B). Em seguida, sintomas como confusão mental e convulsão foram reportados em 30% dos casos (Figura 11 C e D). Cefaléia e rigidez de nuca foram manifestações clínicas encontradas em 20% dos casos (Figura E e F) e artralgia e sinais focais foram reportados em apenas um paciente (Figura 11 G e H). Diarréia e exantema não foram sintomas identificados entre estas crianças (Figura 11 I e J).



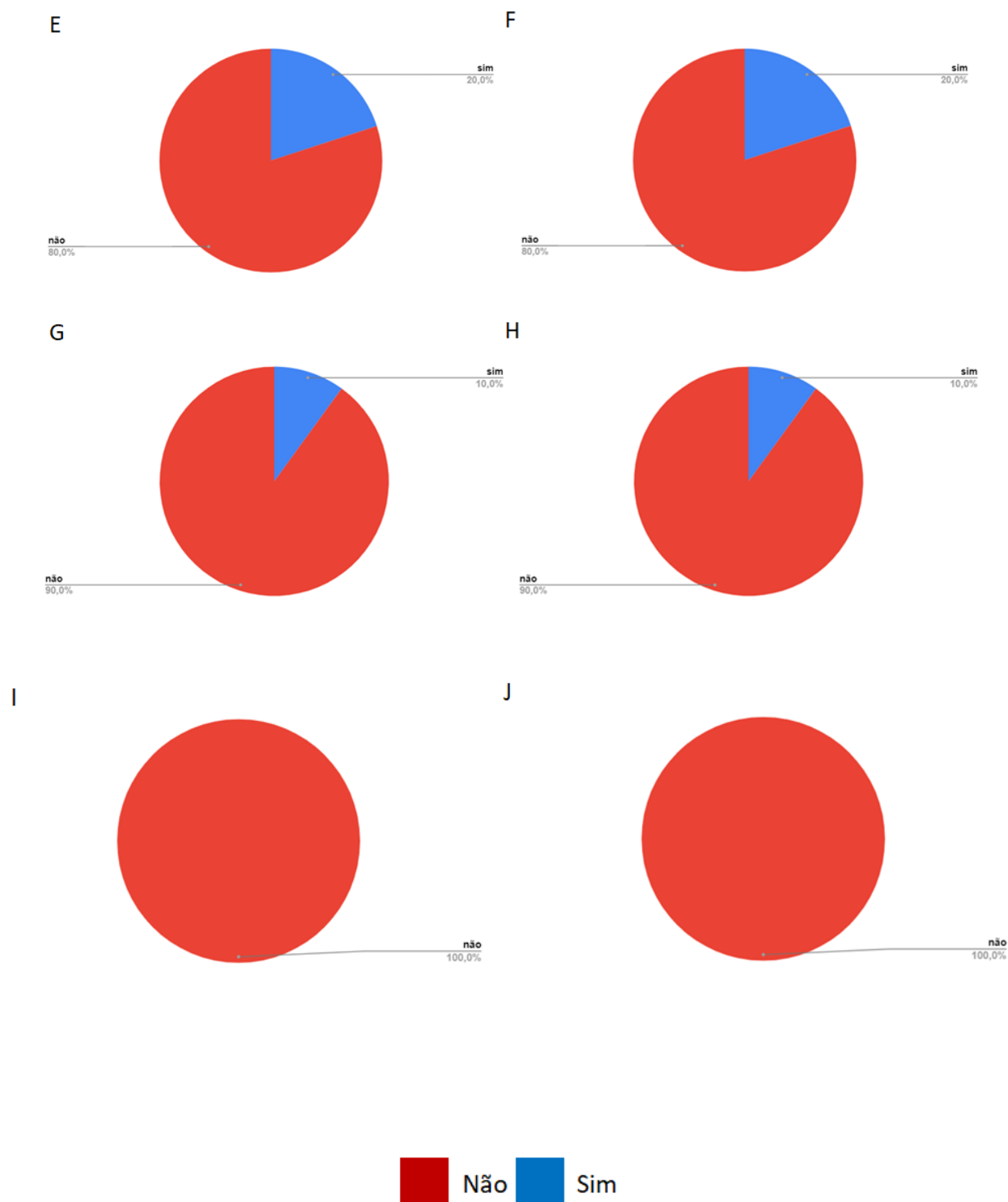


Figura 11 - Gráficos representando presença ou ausência de sintomas relatados durante o período de internação, dos pacientes que testaram positivo para ENTV. A porção vermelha do gráfico representa o conjunto de crianças que não apresentavam o sintoma. A cor azul do gráfico representa o conjunto de crianças que apresentavam o sintoma. (A) gráfico representando a porcentagem de pacientes com ou sem febre. (B) Representação da presença ou ausência de vômito. (C) Imagens demonstrativas da presença ou ausência de confusão mental e (D) de convulsão. (E) Procentagens de presença ou ausência de cefaleia e (F) rigidez de nuca. (G) gráfico representando a porcentagem de pacientes com ou sem artralgia. (H) Representação da presença ou ausência de sinais focais. (I) Procentagens de presença ou ausência de diarréia. (J) Procentagens de presença ou ausência de exantema.

Dos 10 pacientes que tiveram resultados positivos para a amplificação do material genético em RTqPCR, dados dos hemogramas de cinco crianças foram obtidos (tabela 8). Os resultados dos hemogramas indicaram médias de 4,07 milhões de hemácias/mm<sup>3</sup>, hemoglobina em 9,7 g/dL e hematócrito de 30,9%. Para os valores de Hemoglobina Corpuscular Média (HCM), a média obtida foi de 26,4 pg, CHCM com valor médio de 33,7 g/dL, e por fim, as médias de Volume Corpuscular Médio (VCM) e *Red cell distribution width* (RDW) foram de 78,4 fL e 16,3%, respectivamente (tabela 8). Uma vez que a idade dos pacientes variou de três meses de vida até os nove anos de idade e que os valores considerados como normais para os padrões hematimétricos variam de acordo com a idade da criança, para cada caso dos pacientes observados (tabela 8), valores de referência adequados foram adotados. Foi utilizado como base para os valores de referência aqui adotados, material elaborado e disponibilizado pelo Programa Nacional de Controle de Qualidade (PNCQ, 2019). A partir das comparações com estes valores de referência, foi possível notar que os pacientes com identificação 1602 e 1558 apresentavam valores das quantificações de hemácias, hemoglobina e hematócrito, abaixo dos valores considerados normais (tabela 8), estes dados sugerem presença de anemia nestes pacientes. O paciente 1558 apresentou VCM acima dos valores preconizados, uma vez que houve quantificação de 92,2 fL (tabela 8), frente aos 72-84 fL, margem adotada como referência para valores de VCM em crianças de 11 meses de idade (PNCQ, 2019) (caso do paciente 1558). Para todas as crianças que tiveram os dados aqui analisados, os valores relacionados à quantificação das plaquetas estavam dentro dos padrões de normalidade.

Tabela 9 - Padrões hematimétricos identificados nos pacientes que testarem positivo para ENTV.

Identificação do paciente	Hemácias		Hematócrito (%)	HCM (pg)	CHCM (g/dL)	VCM (fL)	RDW (%)	Plaquetas (mm <sup>3</sup> )
	(milhões/mm <sup>3</sup> )	Hemoglobina (g/dL)						
1638	4,65	12,9	37,7	27,7	34,2	81	13,7	429.000
1602	3,41	9	26,8	26,4	33,7	78,4	13,7	437.000
1652	4,7	12	35	25,5	34,3	74,5	16,3	415.000
1466	4,07	9,7	28,9	23,8	33,5	71,1	17,1	300.000
1558	3,36	9,6	30,9	28,7	31,2	92,2	17,7	231.000
Média	4,07	9,7	30,9	26,4	33,7	78,4	16,3	415.000

Estes cinco pacientes que tiveram os dados dos hemogramas obtidos, também tiveram os resultados dos leucogramas (tabela 9) e das quantificações bioquímicas e celulares do LCR coletados, analisados (tabela 10). Para estas observações, foram adotados os valores de referência fornecidos no documento de protocolo de encaminhamento para hematologia pediátrica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (TELESSAÚDERS-UFRGS, 2018).

As observações do leucograma indicaram leucocitose nos pacientes 1652 e 1558, ambos com neutrofilia (valor de referência para ambos os pacientes para leucócitos totais = 6.000-17.500 mm<sup>3</sup>. Para neutrófilos segmentados = 1.500-8.500 mm<sup>3</sup>). O paciente 1638 apresentou linfopenia, sem leucopenia (Valor de referência para linfócitos = 3.000- 9.500 e para leucócitos totais = 6.000-17.000). O paciente 1602 apresentou linfopenia, sem leucopenia e neutrofilia (Linfócitos = 1.500-6.500 mm<sup>3</sup>, leucócitos totais = 4.500-13.500 mm<sup>3</sup> e neutrófilos = 1.800-8.000 mm<sup>3</sup>). O paciente 1466 não apresentou alterações nos valores do leucograma (TELESSAÚDERS-UFRGS, 2018). Não houve pacientes apresentando leucocitose em LCR (Tabela 10) sendo valores de referência estabelecidos por Comar *et al.*, (2009)

Os resultados dos exames de LCR mostram que de forma geral, há uma predominância de linfócitos entre as células encontradas nos LCRs. Os linfócitos compõem em média, 83% (mínimo de 78% e máximo de 90%) das células identificadas nos LCRs das crianças que tiveram resultado positivo para a amplificação no material genético de ENTV (Tabela 10). Duas crianças apresentaram valores de proteína em LCR, acima do valor preconizado 1602 (40 mg/dL) e 1558 (34 mg/dL) e uma criança apresentou valores de proteínas abaixo dos valores de referência sugeridos (paciente 1466, com concentração de proteínas em LCR de em <10 mg/dL), que são de 15-30 mg/dL (BRÚ *et al.*, 2000). Entre os pacientes, a média da concentração de proteínas foi de 20,5 (mg/dL) (Mínimo em <10 mg/dL e máximo de 40 mg/dL).

Dentre os valores de lactato, os pacientes que testaram positivo para ENTV apresentaram concentrações em média de 1,4 mmol/L (Mínimo de 1,1 mmol/L e máximo de 6,1 mmol/L) (Tabela 10). De acordo com os valores de referência estabelecidos por Comar *et al.*, (2009), não houve quantificações abaixo do valor

preconizado (1,13 mmol/L -2,23 mmol/L). O paciente 1558 apresentou valores acima dos adotados como referência, com 6,1 mmol/L.

Tabela 10 - Padrões leucocitários identificados nos pacientes que testarem positivo para ENTV

Identificação do paciente	Leucócitos /mm <sup>3</sup>	linfócitos/ mm <sup>3</sup>	Neutrófilos		
			segmentados/ mm <sup>3</sup>	Eosinófilos/ mm <sup>3</sup>	Monócitos/ mm <sup>3</sup>
1638	9.670	2.168	6.156	87	347
1602	12.460	1.246	10.466	125	623
1652	20.110	7.039	11.061	603	402
1466	16.560	4.636	8.280	331	330
1558	19.220	3.652	9.033	192	403
Média	16.560	3.652	8.657	192	402

Tabela 11 - Quantificações bioquímicas e celulares em LCR, identificados nos pacientes que testarem positivo para ENTV.

Identificação do paciente	Leucócitos (mm <sup>3</sup> )	Linfócitos (%)	Monócitos (%)	Neutrófilos (%)	Lactato (mmol/L)	Glicose (mg/dL)	Proteínas (mg/dL)
1638	11	78	21	1	1,1	56	15
1602	3	80	20	0	1,4	61	40
1652	26	90	0	10	1,3	53	23
1466	8	83	16	0	1,6	77	<10
1558	2	88	10	1	6,1	69	34
Média	8	83	16	1	1,4	61	28,5

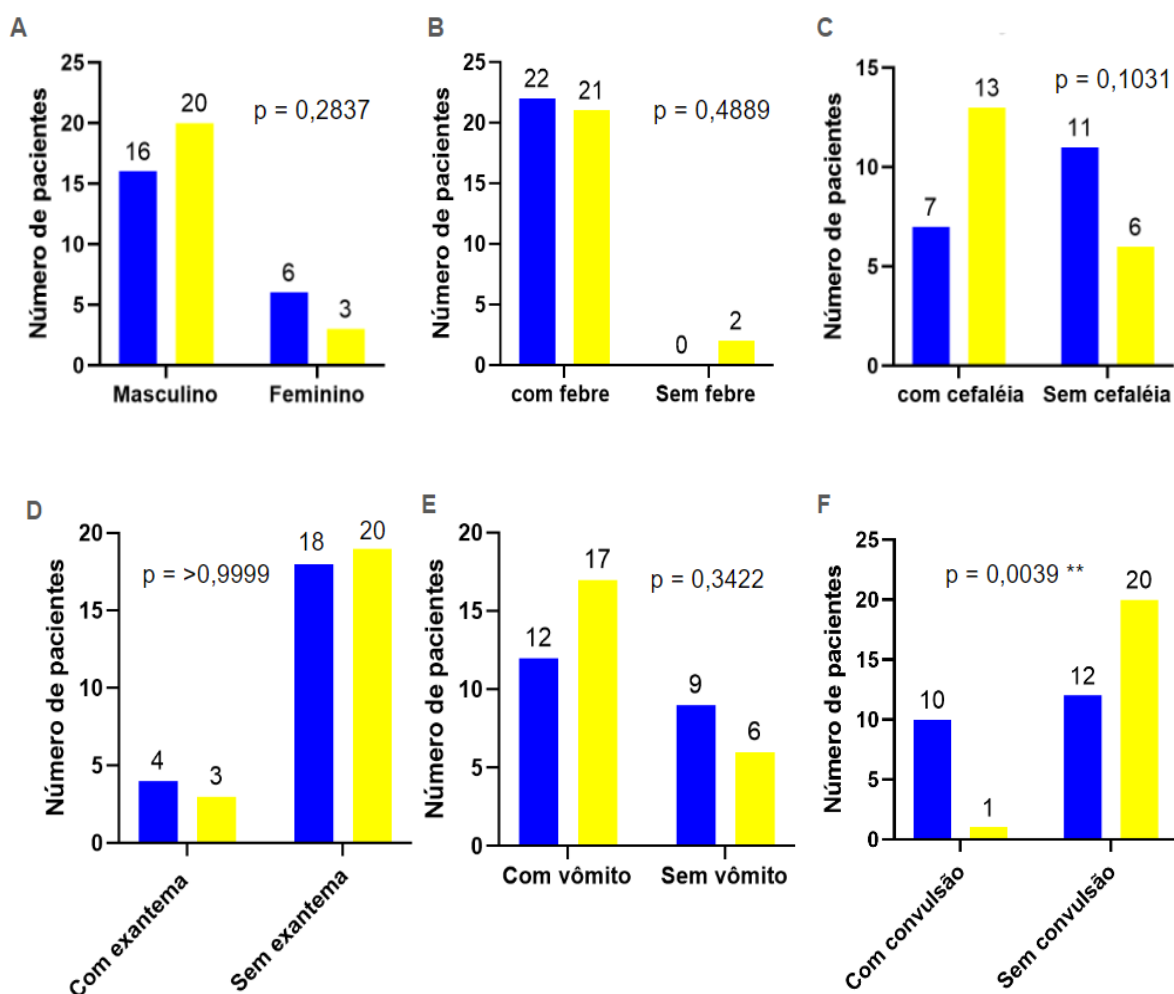
#### 5.4. Análise retrospectiva de dados dos prontuários dos pacientes diagnosticados com ENTV e com DENV entre 2014 e 2019

Foram analisados retrospectivamente, dados dos prontuários de pacientes que foram atendidos no Hospital Infantil João Paulo II, com suspeita de infecção em SNC entre os anos de 2014 e 2019, com confirmação laboratorial de infecção por. Estes pacientes tiveram o diagnóstico confirmado, tanto por via laboratorial como por observação clínica, de quadros de infecção viral em SNC.

Foram identificados 23 pacientes diagnosticados com ENTV e 22 crianças diagnosticadas com DENV, destes 80% (n=36) eram do sexo masculino (n=16 para DENV e n=20 para ENTV). A distribuição entre os sexos não variou entre os tipos de

infecção (figura 12 A). A média de idade entre os pacientes com DENV foi de 8 meses e a média de idade dos pacientes com ETV foi de 3,4 anos.

Alguns sinais e sintomas observados durante o período de internação foram coletados e comparados estatisticamente entre os dois grupos como: presença de febre; cefaleia; exantema; vômitos; convulsões e dias de internação (Figura 12 B, C, D, E, F e G). Entre as variáveis listadas acima, houve diferença estatisticamente significativa apenas quando comparada a presença de convulsões entre os dois grupos ( $p = 0,0039$ ), uma vez que houveram 10 crianças diagnosticadas com DENV e uma criança diagnosticada com ETV apresentando o quadro (Figura 12 F). É possível notar que, independente do agente etiológico, a presença de febre e vômito e a ausência de exantema são fatores em comum na maioria dos quadros infecciosos observados (Figura 12 B, D e E).



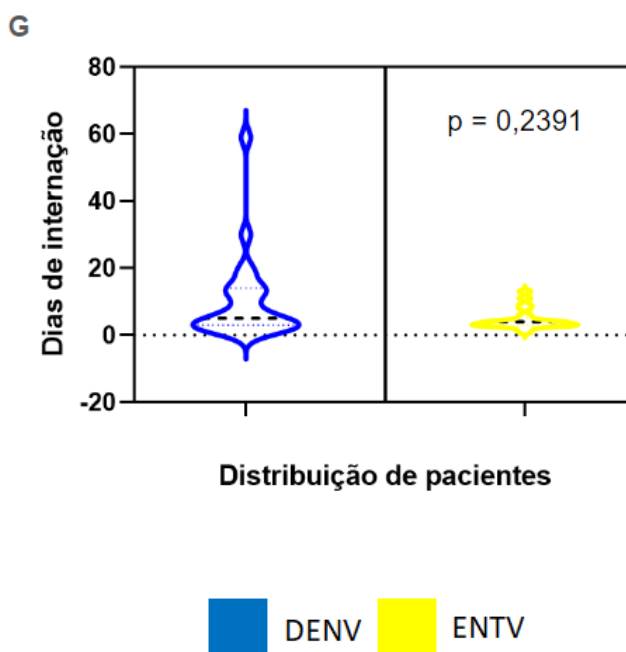
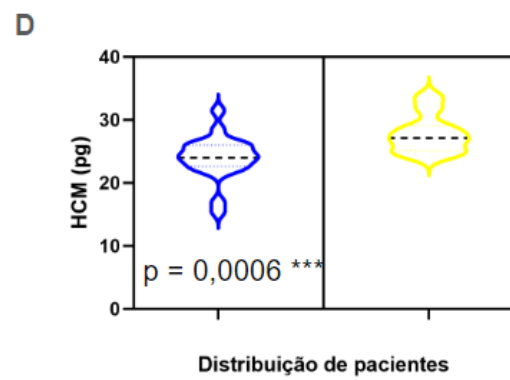
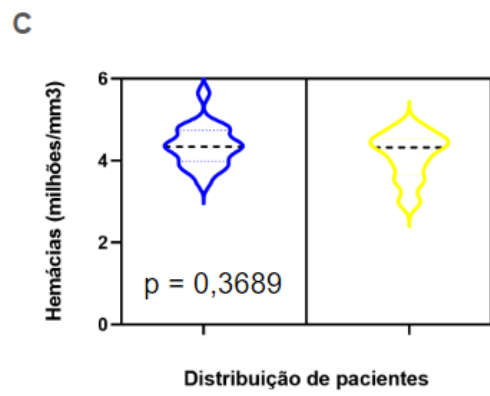
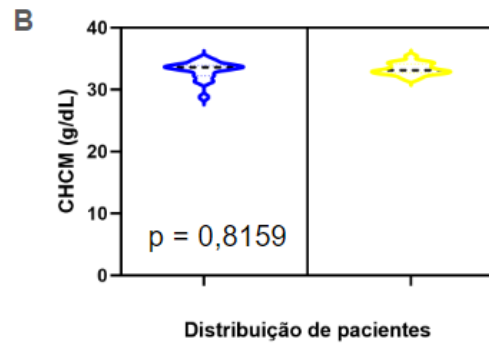
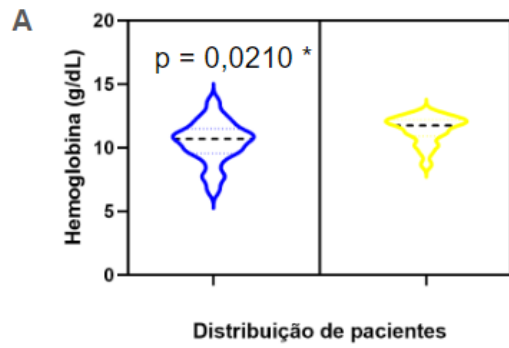


Figura 12 - Comparação da presença e ausência de sintomas entre pacientes com DENV ou com ENTV. Todos os símbolos em azul representam os pacientes que testaram positivo para DENV. Os símbolos amarelos representam os pacientes que testaram positivo para ENTV. (A) Comparação entre os sexos entre pacientes com DENV e ENTV (teste exato de Fisher). (B) Comparação da presença de febre, análise feita com teste exato de Fisher. (C) Comparação frente ao sintoma de cefaleia entre pacientes com DENV e ENTV (teste exato de Fisher). (D) Comparação frente ao sintoma de exantema, análise feita com teste exato de Fisher. (E) Comparação da presença de vômito feito por teste exato de Fisher. (F) Comparação frente a quadro de convulsão entre pacientes com DENV e ENTV, neste caso o teste exato de Fisher indicou diferença significativa entre os 2 grupos. (G) Comparação entre os dias de internação, feito com teste de Mann Whitney.

Padrões hematimétricos, obtidos a partir do hemograma dos mesmos pacientes também foram coletados e utilizados para comparar os dois grupos. Foram realizadas comparações entre os grupos infectados por DENV e por ENTV, das seguintes avaliações: concentração de hemácias; Concentração da Hemoglobina Corpuscular Média (CHCM); Hemoglobina Corpuscular Média (HCM); Volume Corpuscular Médio (VCM); *Red cell distribution width* (RDW) e hematócrito; (Figura 13 A, B, C, D, E e F).

Houve diferença estatística entre cinco dos sete padrões hematimétricos observados, onde os pacientes que testaram positivo para ENTV apresentaram níveis mais elevados de Hemoglobina, HCM, VCM e Hematócrito, do que os pacientes que testaram positivo para DENV. Já os pacientes diagnosticados com DENV apresentaram valores maiores de RDW (Figura 13 F).



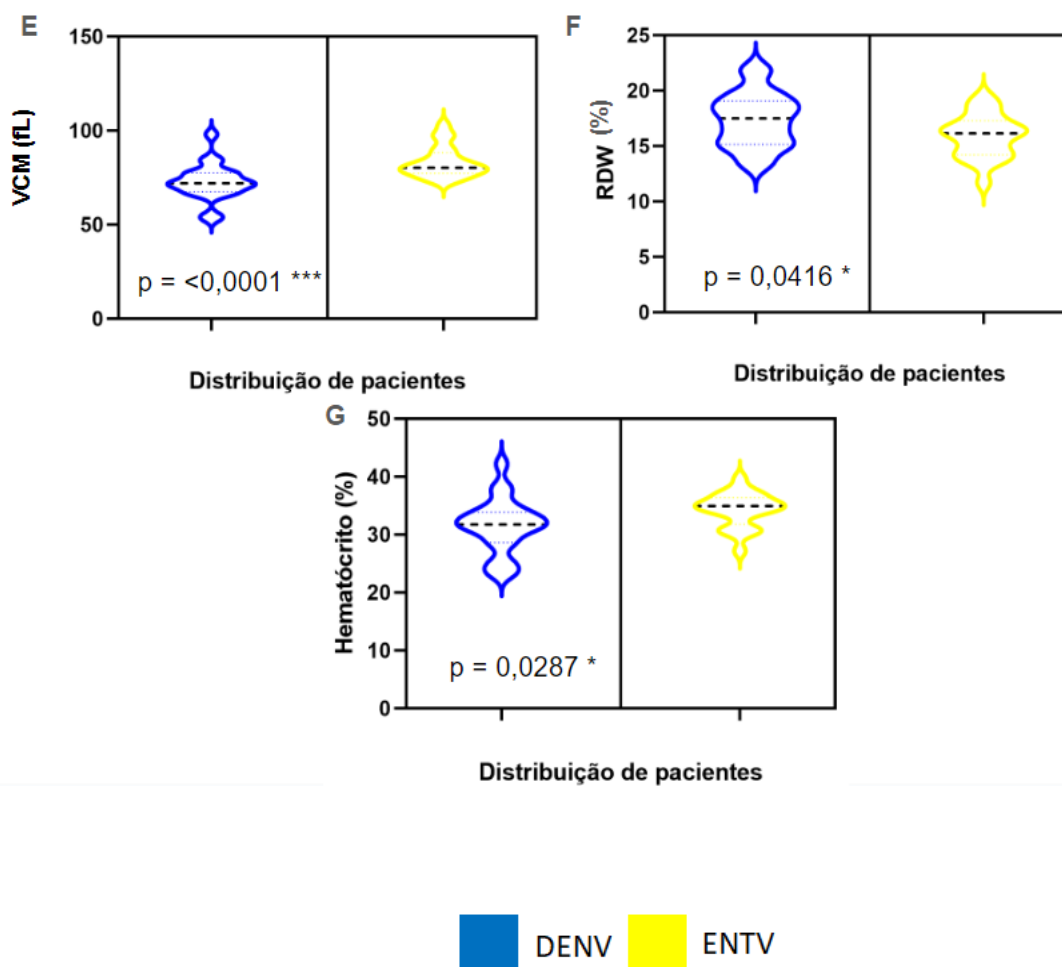


Figura 13 - **Comparações dos valores encontrados nos padrões hematemétricos de pacientes com DENV e com ENTV.** Todos os símbolos em azul representam os pacientes que testaram positivo para DENV. Os símbolos amarelos representam os pacientes que testaram positivo para ENTV. (A) Realção entre os 2 grupos, sobre as concentrações de hemácias. Teste de Mann-Whitney foi empregado. (B) Valores comparativos de CHCM para 2 grupos. Teste Mann-Whitney foi utilizado. (C) Valores comparativos de HCM para 2 grupos. Teste Mann-Whitney foi utilizado. (D) VCM, Para este caso o teste T não pareado foi utilizado. (E) Valores comparativos de RDW para 2 grupos. Teste Mann-Whitney foi utilizado. (F) Valores comparativos de hematócrito para 2 grupos. Teste Mann-Whitney foi utilizado.

## 6. Discussão

Dentre os vírus testados neste trabalho, houve resultados positivos para a amplificação do material genético de ENTV em 5% dos casos, além de 8% de resultados considerados como inconclusivos, uma vez que não foi observada amplificação do material genético em duplicata. 88% das amostras não apresentaram amplificação do material genético para nenhum dos vírus investigados.

O HIJPII é um centro de referência para doenças infectocontagiosas em pediatria, que acolhe crianças de todo o estado de Minas Gerais, em especial de Belo Horizonte e região metropolitana. Em estudos anteriores (Oliveira., 2015; Marinho., 2019; Crispim., 2020; Rebuite., 2021), com pacientes vindos do mesmo hospital, as taxas de detecção de agentes virais variaram entre 5,3% e 62,9%, durante pesquisas feitas entre os anos de 2011 e 2020 (tabela 3). A taxa de detecção de resultados é diretamente impactada pelos critérios de seleção das amostras, uma vez que as amostras englobadas neste trabalho não passaram por qualquer tipo de triagem prévia. Logo, não havia separação entre as amostras em que os profissionais do hospital não suspeitavam de infecção viral. Adicionalmente, o HIJPII tem como procedimento padrão, coletar o LCR de todas as crianças com menos de dois meses de vida, que apresentam quadros febris, sem causa determinada. Estes pacientes foram incluídos nas análises realizadas no presente estudo, e podem contribuir também para a variação das taxas de detecção.

Outras pesquisas realizadas em território brasileiro, relacionados a detecção de vírus em SNC contribuem para um melhor entendimento destas infecções. No estado do Amazonas, um estudo conduzido entre 2010 e 2012, avaliou 165 amostras de LCR de pacientes com suspeita de infecção viral no SNC, utilizando diferentes variações da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). Esta pesquisa identificou o agente etiológico viral em 29,7% das amostras. Os agentes detectados em maior quantidade foram os enterovírus, encontrados em 32,6% (n=16) das amostras positivas. Os herpesvírus foram o segundo tipo mais encontrado, no qual 22,4% (n=11) foram diagnosticados com infecção por Epstein-Barr (EBV), VZV foi identificado em 20,4% (n=10) dos casos positivos. Foram diagnosticadas como

positivas para citomegalovírus (CMV) nove amostras (18,4%), e para o caso dos HSV-1 e HSV-2, foram identificados em duas amostras cada (4,1%). Arbovírus foram identificados nesta mesma pesquisa em 14,3% das amostras, sendo quatro casos positivos para dengue e três para o vírus oropouche (BASTOS *et al.*, 2014).

Em outra pesquisa no estado do Amazonas (2011 a 2017), 700 amostras de LCR de pacientes com suspeita de infecção em SNC, com pacientes majoritariamente em idade adulta (média de idade de 28,5 anos), foram submetidas à testagem molecular e sorológica para os quatro sorotipos de DENV. Neste caso, 28 amostras foram consideradas como positivas para DENV, sendo que 85,7% das detecções foram realizadas por *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA), feitos para pesquisa de imunoglobulina M (IgM). Já 14,3% dos casos de DENV foram identificados por RT-qPCR (BASTOS *et al.*, 2019).

Pacientes atendidos em um hospital na cidade de Salvador (BA), entre os anos de 2014 até 2016, e que tiveram suspeita de infecção viral em SNC, tiveram o LCR coletado e testado para ENTV, DENV, CHIKV e ZIKV, HSV-1 e 2, VZV, EBV e CMV. Crianças de até 10 anos de idade, representavam 34,1% dos pacientes. Dentre os 170 pacientes que tiveram o LCR testado, 37 obtiveram resultado positivo para algum dos vírus testados, seja por PCR (17,1% de detecções) ou por ELISA (9,3% de detecções). Os agentes virais detectados em maior frequência foram os ENTV e DENV (ambos com 27% dos casos positivos). Curiosamente, os casos identificados como positivos foram detectados apenas em uma das duas metodologias, não havendo nenhuma amostra que obteve, ao mesmo tempo, resultado final para o mesmo vírus, tanto em PCR como por ELISA (DIAS *et al.*, 2022).

No estado de São Paulo, um estudo conduzido com 500 amostras de LCR de pacientes com suspeita de encefalite aguda, atendidos em um hospital universitário entre os anos de 2012 e 2013, foram testados por RT-qPCR para DENV 1, 2, 3 e 4, vírus da febre amarela, vírus da encefalite de St. Louis, vírus do Nilo ocidental, além de pesquisa para a região NS5 dos Alphavirus e para os enterovírus. Foram pesquisados por PCR: HSV-1 e 2; VZV; CMV; EBV; Roselovirus humanabeta 7, 6a e 6b. Foram identificados resultados positivos em 5,2% das amostras (n= 26). Destes, 12 casos foram positivos para herpesvírus, nove casos positivo para ENTV, além de dois casos de DENV e uma análise positiva para vírus da encefalite de St. Louis (FERREIRA *et al.*, 2019).

A partir da comparação entre os resultados do presente estudo e de estudos anteriores com características semelhantes, é possível observar que a taxa de casos em que foi possível identificar o agente etiológico viral (5%), é condizente com a literatura, em especial para as pesquisas em que não houve triagem prévia das amostras submetidas a análise, com base em sinais e sintomas.

Até o presente momento, são escassas as pesquisas realizadas no Brasil, relacionadas à investigação de infecções em SNC por vírus, feitas exclusivamente com pacientes pediátricos. Além das investigações feitas em Belo Horizonte (MG) por pesquisadores do Laboratório de Vírus (Instituto de Ciências Biológicas - Universidade Federal de Minas Gerais), entre os anos de 2011 e 2023, ao qual o presente estudo faz parte, foi encontrada apenas uma análise, realizada no estado do Amazonas (MARINHO *et al.*, 2023). Esta pesquisa englobou 689 pacientes atendidos em diferentes hospitais, admitidos entre os anos de 2014 e 2019, que tinham de três meses de vida até os 15 anos de idade. Após testagens com o LCR por qPCR, RT-qPCR e por sorologia, 30 amostras obtiveram resultado positivo para enterovírus, citomegalovírus, VZV, EBV ou arbovírus. Os enterovírus constituem os principais agentes virais detectados por estes autores, estando presentes em 43,3% das amostras de LCR que testaram positivo. Dos casos, seis foram identificados com meningite e cinco com encefalite (MARINHO *et al.*, 2023).

Os enterovírus são amplamente conhecidos como agentes virais associados às infecções do sistema nervoso central (SNC) (HUANG; SHIH, 2015; ROCHA *et al.*, 2021). Neste estudo, houve resultados positivos somente para ENTV (n=10), no entanto, às tentativas de sequenciamento para posterior genotipagem não foram bem sucedidas. Em estudo conduzido na cidade de São José do Rio Preto, localizada no interior do estado de São Paulo, foram testadas 288 amostras de LCR, coletadas de pacientes de todas as idades. Diversos enterovírus diferentes foram testados, utilizando metodologias de RT-PCR, RT-qPCR e ELISA. Foram identificados 16 casos positivos para ENTV e a genotipagem de cinco amostras indicou a presença de echovirus 3 (E3), coxsackie vírus A6 (CVA6) e coxsackie vírus B4 (CVB4) (ROCHA *et al.*, 2021). Um estudo multicêntrico realizado em território brasileiro foi capaz de identificar que há uma diversidade de enterovírus sendo responsáveis por infecções em SNC, no entanto, 66,8% dos casos identificados foram causados por echovirus 30 e echovirus 6 (RAMALHO *et al.*, 2019).

No ano de 2005, foi reportado um surto de meningite viral no estado do Rio de

Janeiro, do qual 22 pacientes tiveram infecção confirmada para echovirus 30, com crianças de 1 a 9 anos como as mais afetadas (PINTO JUNIOR *et al.*, 2019). Em 2004, localizado na cidade de São Joaquim da Barra (SP) outro surto de meningite foi identificado, no qual 12 amostras de LCR coletadas no período testaram positivo para echovirus 6 (LUCHS *et al.*, 2008). A circulação de echovirus 6 na cidade de Belo Horizonte, em pacientes pediátricos, foi constatada por Rebuite os Santos (2021), após analisar por RT-qPCR, amostras advindas do HIJPII, mesmo hospital em que o presente estudo coletou as amostras de LCR. Outros estudos realizados em países diversos sugerem predominância para coxsackie vírus e echovirus, como responsáveis por causar encefalite e meningite (SAWYER, 2001; ZAOUTIS, 1998; TAVAKOLI *et al.*, 2008; KUPILA, 2006) .

A porcentagem de detecção de vírus em LCR, entre diferentes estudos e localidades, apresenta variações que podem ser impactadas por questões como estações do ano e sazonalidade (PONS-SALOR *et al.*, 2018), critérios de inclusão e exclusão de pacientes ou presença e ausência de aglomerações, como no caso do distanciamento social, uso de máscaras e medidas de higienização, estabelecidas como contenção durante a pandemia de coronavírus (HATOUN *et al.*, 2020). Este último fez com que as pessoas de forma geral, incluindo crianças, ficassem reclusas durante longo período de tempo. Interferindo diretamente na dinâmica de transmissão de diversas outras doenças infectocontagiosas (HATOUN *et al.*, 2020). Parcela significativa das amostras analisadas neste estudo foi coletada quando medidas relacionadas ao controle da disseminação de SARS-CoV-2 estavam em vigor. Desta forma, é possível observar que fatores como: presença ou ausência de triagem prévia dos pacientes; utilização ou não de metodologias complementares para diagnóstico; diversidade de agentes etiológicos capazes de eliciar manifestação em SNC e a sensibilidade dos testes adotados, como fatores capazes de interferir diretamente nas porcentagens encontradas entre os estudos aqui observados e os dados obtidos nas análises trazidas pelo presente trabalho.

Em relação aos achados celulares e bioquímicos em LCR das crianças que testaram positivo para ENTV neste estudo, houve predominância, em média, de 83% de linfócitos, frente a presença de outros leucócitos. ALMEIDA *et al.*, (2007) indica que crianças saudáveis tendem a apresentar monócitos em maiores quantidade, em até 80% da contagem total de leucócitos. A presença de linfocitose é associada, comumente, a infecções de origem fúngicas, micobacterinas ou virais em

SNC (STRASINGER & LORENZO, 2008)

Valores aumentados de proteínas em LCR são considerados como alterações comuns em análise (JERRARD et al., 2001). Este dado é abordado como inespecífico, uma vez que é possível observar aumento de proteínas em LCR, em casos de hemorragias intracranianas, uso de medicamentos, processos inflamatórios, doenças infecciosas, Guillain-Barré, esclerose múltipla, processos carcinogênicos e alterações endocrinológicas. Portanto, estes valores devem ser considerados apenas quando há correlação entre a clínica e os outros resultados de exames solicitados (SEEHUSEN et al., 2003).

A privação de oxigênio e destruição tecidual levam ao aumento nas concentrações de lactato em LCR, sendo, portanto, relacionado com diferentes origens de dano na região do SNC (SEEHUSEN et al., 2003). As quantificações de lactato podem ser utilizadas, junto com outros marcadores, para contribuir com a diferenciação entre meningites de origem viral ou bacteriana (DIMAS & PUCCIONI., 2008)

Entre os padrões hematimétricos observados, foram identificadas diferenças estatísticas em cinco índices entre pacientes diagnosticados com DENV e ENTV. Os valores de hemoglobina, HCM, VCM e hematócrito mostraram-se mais elevados nos casos positivos para ENTV do que nos positivos para DENV. No entanto, em ambos os casos, as médias aritméticas estão dentro dos valores de referência. O mesmo padrão foi observado para o RDW, que apresentou valores mais altos nos casos positivos para DENV. No entanto, nota-se uma maior variação nos índices hematimétricos nos casos de DENV.

Em pacientes com dengue, os parâmetros hematimétricos variam de acordo com o estágio e gravidade da infecção. Menores valores encontrados dentre os parâmetros estão associados à duração da internação hospitalar, desenvolvimento de complicações, mortalidade, entre outros (NANDWANI et al., 2021). Quadros infecciosos mais graves de dengue estão ligados a maiores níveis de hemoconcentração, resultando em elevação dos valores de hemoglobina e hematócrito (JAYADAS et al., 2019). No presente estudo, os valores dos parâmetros hematimétricos encontrados na maioria dos pacientes com DENV podem estar relacionados a quadros infecciosos brandos. Isso é corroborado pelo RDW, em decorrência à existência de diferentes tipos de hemácias com variados tamanhos e colorações, resultantes de valores alterados de HCM, VCM e hemoglobina. Já

infecção por enterovírus está mais associada a quadros assintomáticos, infecções respiratórias e gastrointestinais em casos mais leves, ou a doenças mais graves, como encefalite, meningite, hepatite, entre outras (DE CROM et al., 2016). Em certos casos, os padrões hematimétricos podem ser usados em conjunto com outros exames como preditores de condições mais graves (CHUANG; HUANG, 2019).

## 7. Conclusões

A partir das análises realizadas, não foram encontrados arbovírus, herpes vírus humano do tipo 1, 2 e 3 e nem SARS-CoV-2 nas amostras. Este estudo reforçou a significativa relevância dos enterovírus como principais agentes virais associados às infecções no sistema nervoso central (SNC) em neonatos e crianças, uma vez que foram encontrados em 5% dos casos. Além disso, foi possível caracterizar esses pacientes em relação a diversos aspectos, como idade média, sexo, sintomas, resultados de hemograma e análise bioquímica do líquido cefalorraquidiano (LCR). Tais dados não apenas enriquecem a compreensão dessas infecções na população pediátrica, mas também ressaltam a importância de intensificar os testes para diferentes vírus, utilizando tanto a RT-qPCR e qPCR quanto a incorporação de imunoenaios, como o ELISA, que se mostrou uma metodologia complementar eficaz em pesquisas de características semelhantes realizadas por diversos autores.

Frente a pesquisas que adotaram metodologias e pacientes com características semelhantes, é possível concluir que os resultados obtidos no presente estudo, estão em consonância e de acordo com a literatura.

Adicionalmente, a comparação realizada neste estudo entre os dois vírus diagnosticados com maior frequência nos LCRs dos pacientes atendidos no Hospital Infantil João Paulo II (HIJPII) entre os anos de 2014 e 2019 - o DENV e o ENTV - revelou diferenças significativas, como a sugestiva baixa frequência de convulsões em pacientes infectados por ENTV no SNC. Além disso, as análises também evidenciaram diferenças nos achados de hemograma entre as infecções por DENV ou ENTV. Portanto, mais estudos são necessários, com a expansão das metodologias adotadas para a pesquisa e identificação dos vírus de interesse, bem como dos exames laboratoriais requeridos. Esse conjunto de observações poderá permitir a obtenção de dados robustos relacionados aos agentes etiológicos que causam infecções virais no SNC na população pediátrica, bem como à sua patogênese.

## 8. Referência bibliográfica

1. AGUT, Henri; BONNAFOUS, Pascale; GAUTHERET-DEJEAN, Agnès. Laboratory and clinical aspects of human herpesvirus 6 infections. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 28, n. 2, 2015.
2. ALM E, Lesko B, Lindegren G, Ahlm C, Söderholm S, et al. (2014) Universal Single-Probe RT-PCR Assay for Diagnosis of Dengue Virus Infections. *PLOS Neglected Tropical Diseases* 8(12): e3416. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003416>
3. ALMEIDA BENTES, Aline; KROON, Erna Geessien; ROMANELLI, Roberta Maia de Castro. *Neurological manifestations of pediatric arboviral infections in the Americas. Journal of Clinical Virology*. [S.l: s.n.]. , 2019
4. ALMEIDA, S.M.; NOGUEIRA, M. B.; RABONI, S. M.; VIDAL, L. R. Laboratorial diagnosis of lymphocytic meningitis. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*, Salvador, v. 11, n. 5, Out. 2007.
5. AMARAL, Vanessa *et al.* Primary varicella zoster infection compared to varicella vaccine reactivation associated meningitis in immunocompetent children. *Journal of Paediatrics and Child Health*. [S.l: s.n.]. , 2021
6. AMIDEI, Christina; TRESE, Sarah. Neuroanatomy and physiology. *Management of Adult Glioma in Nursing Practice*. [S.l: s.n.], 2019. .
7. ANDRADE, Ana Lucia *et al.* Single-dose varicella vaccine effectiveness in Brazil: A case-control study. *Vaccine*, v. 36, n. 4, 2018.
8. ANDRADE, Carla Hineida da Silva De *et al.* Análise da incidência de Meningite Meningocócica em todas as faixas etárias antes e após a implantação da vacina meningocócica C (conjugada) no estado do Pará. *Brazilian Journal of Health Review*, v. 3, n. 4, 2020.
9. ASUNDI, Archana *et al.* Infectious Myelitis. *Seminars in Neurology*, v. 39, n. 4, 2019.
10. AZEVEDO, Luciano Cesar Pontes; TOSCANO, Cristiana M.; BIERRENBACH, Ana Luiza. Bacterial Meningitis in Brazil: Baseline Epidemiologic Assessment of the Decade Prior to the Introduction of Pneumococcal and Meningococcal Vaccines. *PLoS ONE*, v. 8, n. 6, 2013.
11. AZEVEDO, Raimunda do Socorro da Silva; OLIVEIRA, Consuelo Silva; VASCONCELOS, Pedro Fernando da Costa. Risco do chikungunya para o Brasil. *Revista de Saúde Pública*, v. 49, 2015.
12. BAIRD, Nicholas L. *et al.* Varicella zoster virus (VZV)-human neuron interaction. *Viruses*, v. 5, n. 9, 2013.
13. BARR, Kelli L.; VAIDHYANATHAN, Vedana. *Chikungunya in infants and children: Is pathogenesis increasing? Viruses*. [S.l: s.n.]. , 2019
14. BARTOLINI, Luca *et al.* *Viral Triggers and Inflammatory Mechanisms in Pediatric Epilepsy. Molecular Neurobiology*. [S.l: s.n.]. , 2019
15. BASTOS MS, Lessa N, Naveca FG, Monte RL, Braga WS, Figueiredo LT, Ramasawmy R, Mourão MP. Detection of Herpesvirus, Enterovirus, and Arbovirus infection in patients with suspected central nervous system viral infection in the Western Brazilian Amazon. *J Med Virol*. 2014 Sep;86(9):1522-7. doi: 10.1002/jmv.23953. Epub 2014 Apr 24. PMID: 24760682.
16. BASTOS, M. de S., Martins, V. do C. A., Silva, N. L. da ., Jezine, S., Pinto, S., Aprigio, V., Monte, R. L., Fragoso, S., & Puccioni-Sohler, M.. (2019). Importance of cerebrospinal fluid investigation during dengue infection in Brazilian Amazonia Region. *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 114, e180450. <https://doi.org/10.1590/0074-02760180450>
17. BEGUM, Feroza *et al.* *Insight into the tropism of dengue virus in humans. Viruses*. [S.l: s.n.]. , 2019
18. BENGUE, Michèle *et al.* Mayaro virus infects human brain cells and induces a potent antiviral response in human astrocytes. *Viruses*, v. 13, n. 3, 2021.

19. BENTES, Aline Almeida *et al.* Neurological manifestations due to dengue virus infection in children: clinical follow-up. *Pathogens and Global Health*, v. 115, n. 7–8, 2021.
20. BLANCO, Bruna P. *et al.* Pediatric bacterial meningitis and meningococcal disease profile in a Brazilian General Hospital. *Brazilian Journal of Infectious Diseases*, v. 24, n. 4, 2020.
21. BRADY, Oliver J. *et al.* The association between zika virus infection and microcephaly in Brazil 2015–2017: An observational analysis of over 4 million births. *PLoS Medicine*, v. 16, n. 3, 2019.
22. BRASIL. Ministério da Saúde. Coordenação-Geral de Desenvolvimento da Epidemiologia em Serviços. Guia de vigilância em saúde. Volume 1, 1ª edição. Brasília, 2017. Disponível em <[https://bvsmis.saude.gov.br/bvs/publicacoes/guia\\_vigilancia\\_saude\\_volume\\_1.pdf](https://bvsmis.saude.gov.br/bvs/publicacoes/guia_vigilancia_saude_volume_1.pdf)> Acesso em 26 de junho de 2022.
23. BRASIL. Ministério da Saúde. Boletim Epidemiológico Nº 129 - Boletim COE Coronavírus. Disponível em <<https://www.gov.br/saude/pt-br/centrais-de-conteudo/publicacoes/boletins/epidemiologicos/covid-19/2022/boletim-epidemiologico-no-129-boletim-coe-coronavirus/view>> Acesso em 09 de setembro de 2022.
24. BRITTON, Philip N. *et al.* Acute encephalitis in children: Progress and priorities from an Australasian perspective. *Journal of Paediatrics and Child Health*. [S.l: s.n.], 2015
25. BROWN Z. Preventing herpes simplex virus transmission to the neonate. *Herpes*. 2004 Aug;11 Suppl 3:175A-186A. PMID: 15319088.
26. BRÚ CM, Alabern IL. Recomendaciones para el estudio de las proteínas del líquido cefalorraquídeo. *Química Clínica*, 2000; 21(2):83-90.
27. BURRELL, C. J.; HOWARD, C. R.; MURPHY, F. A. Laboratory Diagnosis of Virus Diseases. Fenner and White's medical virology, Amsterdam, p. 135–154, Jan. 2017.
28. CAGLIOTI, Claudia *et al.* Chikungunya virus infection: An overview. *New Microbiologica*. [S.l: s.n.], 2013
29. CANTU, R.M.; DAS, J. M. Viral Meningitis. StatPearls Publishing, Treasure Island (FL). 2023. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK545217/#>>. Acesso em: 10 de Fevereiro. 2024
30. CAO-LORMEAU, Van Mai *et al.* Guillain-Barré Syndrome outbreak associated with Zika virus infection in French Polynesia: A case-control study. *The Lancet*, v. 387, n. 10027, 2016.
31. CHUANG, Y. Y.; HUANG, Y. C. Enteroviral infection in neonates. *Journal of microbiology, immunology, and infection = Wei mian yu gan ran za zhi*, v. 52, n. 6, p. 851–857, Dez, 2019.
32. COHEN, Jeffrey I. *Herpesvirus latency*. *Journal of Clinical Investigation*. [S.l: s.n.], 2020
33. COSTA, Bruna Klein Da; SATO, Douglas Kazutoshi. *Viral encephalitis: a practical review on diagnostic approach and treatment*. *Jornal de Pediatria*. [S.l: s.n.], 2020
34. COUDERC, Thérèse; LECUIT, Marc. *Chikungunya virus pathogenesis: From bedside to bench*. *Antiviral Research*. [S.l: s.n.], 2015
35. COMAR S.R.; MACHADO N.A.; DOZZA T.G.; HAAS P. Análise citológica do líquido cefalorraquidiano. *Estud Biol*, v. 3, p.93-102, Jan./Dez. 2009
36. CRISPIM, Ana Paula Correia. DETECÇÃO E ISOLAMENTO DE FLAVIVÍRUS EM LÍQUIDO CEFALORRAQUIDIANO DE PACIENTES EM MINAS GERAIS NO PERÍODO DE 2018 A 2019. 2020. 90 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Microbiologia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2020.
37. CUI, Xiaojian *et al.* A systematic review and meta-analysis of children with coronavirus disease 2019 (COVID-19). *Journal of Medical Virology*, v. 93, n. 2, 2021.
38. DAHM, Tobias *et al.* Neuroinvasion and Inflammation in Viral Central Nervous System Infections. *Mediators of Inflammation*. [S.l: s.n.], 2016
39. DAMKIER, Helle H.; BROWN, Peter D.; PRAETORIUS, Jeppe. *Cerebrospinal fluid secretion by the choroid plexus*. *Physiological Reviews*. [S.l: s.n.], 2013
40. DE ALMEIDA BARRETO, Francisca Kalline *et al.* Chikungunya and diabetes, what do we know? *Diabetology and Metabolic Syndrome*. [S.l: s.n.], 2018

41. DE CROM, S. C.M. *et al.* Enterovirus and parechovirus infection in children: a brief overview. *European Journal of Pediatrics*. [S.l: s.n.], 2016
42. DE CROM, Stephanie C.M. *et al.* Characteristics of pediatric patients with enterovirus meningitis and no cerebral fluid pleocytosis. *European Journal of Pediatrics*, v. 171, n. 5, 2012.
43. DE LEO, Alessandra; CALDERON, Abram; LIEBERMAN, Paul M. *Control of Viral Latency by Episome Maintenance Proteins*. *Trends in Microbiology*. [S.l: s.n.], 2020
44. DE LIMA, Elaine Cristina Bomfim *et al.* Chikungunya encephalitis: Report of a fatal case in northeastern Brazil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo*, v. 62, 2020.
45. DE LIMA CAVALCANTI TYV, Pereira MR, de Paula SO, Franca RFO. A Review on Chikungunya Virus Epidemiology, Pathogenesis and Current Vaccine Development. *Viruses*. 2022 May 5;14(5):969. doi: 10.3390/v14050969. PMID: 35632709; PMCID: PMC9147731.
46. DE MELLO, Camilly P.Pires; BLOOM, David C.; PAIXÃO, Izabel C.N.P. *Herpes simplex virus type-1: Replication, latency, reactivation and its antiviral targets*. *Antiviral Therapy*. [S.l: s.n.], 2016
47. DE MORAIS BRONZONI RV, Baleotti FG, Ribeiro Nogueira RM, Nunes M, Moraes Figueiredo LT. Duplex reverse transcription-PCR followed by nested PCR assays for detection and identification of Brazilian alphaviruses and flaviviruses. *J Clin Microbiol*. 2005 Feb;43(2):696-702. doi: 10.1128/JCM.43.2.696-702.2005. PMID: 15695666; PMCID: PMC548032.
48. DE OLIVEIRA, Danilo B. *et al.* Etiological agents of viral meningitis in children from a dengue-endemic area, Southeast region of Brazil. *Journal of the Neurological Sciences*, v. 375, 2017.
49. DIAS, Fellipe Camargo Ferreira *et al.* MENINGITE: ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS DA DOENÇA NA REGIÃO NORTE DO BRASIL. *Revista de Patologia do Tocantins*, v. 4, n. 2, 2017.
50. DIAS, Tamiris T. *et al.* The emergence of arboviruses changes the profile of viral meningitis in Salvador, Bahia: a case series. *Frontiers in Tropical Diseases*, v. 3, p. 1-9, 2022.
51. DICK, G. W.A. Zika Virus (I). Isolations and serological specificity. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 46, n. 5, 1952.
52. DIMAS LF, Puccioni-Sohler M. Exame do líquido cefalorraquidiano: influência da temperatura, tempo e preparo da amostra na estabilidade analítica. *J Bras Patol Med Lab*. 2008; 44(2):97-106.
53. DUARTE, Geraldo *et al.* Zika Virus Infection in Pregnant Women and Microcephaly. *Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia / RBGO Gynecology and Obstetrics*, v. 39, n. 05, 2017.
54. ELIAS, Matthew D.; NARULA, Sona; CHU, Andrew S. Acute Disseminated Encephalomyelitis Following Meningoencephalitis. *Pediatric Emergency Care*, v. 30, n. 4, 2014.
55. ELLUL, Mark; SOLOMON, Tom. *CME INFECTIOUS DISEASES Authors: A specialist registrar in neurology*. *The Walton Centre NHS Foundation Trust*. [S.l: s.n.], 2018.
56. FARIA S.M.; FARHAT, C. K. Bacterial meningitis – diagnosis and treatment. *Jornal de Pediatria*, Rio de Janeiro, v. 75, n. 7, p. 46–56, Jul. 1999.
57. FERRARIS, Pauline; YSSEL, Hans; MISSÉ, Dorothée. *Zika virus infection: an update*. *Microbes and Infection*. [S.l: s.n.], 2019
58. FERREIRA, J. E. *et al.* Molecular characterization of viruses associated with encephalitis in São Paulo, Brazil. *PloS one*, San Francisco, v. 14, n. 1, p. e0209993–e0209993, Jan. 2019.
59. FIGUEREDO, Leonardo Patrick *et al.* Perfil da meningite na população pediátrica no estado de Minas Gerais, Brasil. *Scientia Plena*, v. 17, n. 9, 2021.
60. FISAHN, Christian *et al.* Herpes Simplex Encephalitis of the Parietal Lobe: A Rare Presentation. A Case Report. *Cureus*, 2016.
61. GALLARDO-FLORES, Carla E.; COLPITTS, Che C. *Cyclophilins and their roles in hepatitis C virus and flavivirus infections: Perspectives for novel antiviral approaches*. *Pathogens*. [S.l:

- s.n.], 2021
62. GATHERER, Derek *et al.* ICTV virus taxonomy profile: Herpesviridae 2021. *Journal of General Virology*, v. 102, n. 10, 2021.
  63. GHABOULI SHAHROODI, Mohammad Javad *et al.* Enteroviral meningitis in neonates and children of mashhad, Iran. *Jundishapur Journal of Microbiology*, v. 9, n. 5, 2016.
  64. 45
  65. GHANNAM, Jack Y.; AL KHARAZI, Khalid A. *Neuroanatomy, Cranial Meninges*. [S.l.: s.n.], 2019.
  66. GNUTZMANN L.V. *et al.* Análise dos valores de referência do líquido cefalorraquidiano. *Revista brasileira de análises clínicas*, Rio de Janeiro, v. 48. n. 3, Set./Out. 2016
  67. GIOVANE, Richard A.; LAVENDER, Paul Drake. Central Nervous System Infections. *Primary Care: Clinics in Office Practice*, v. 45, n. 3, p. 505–518, 1 set. 2018.
  68. GORBALENYA, Alexander E. *et al.* The species Severe acute respiratory syndrome related coronavirus: classifying 2019-nCoV and naming it SARS-CoV-2. *Nature Microbiology*. [S.l.: s.n.], 2020
  69. Governo do estado de Minas Gerais. Secretaria de Saúde. Atualização epidemiológica - Febre amarela. Disponível em
  70. <[https://saude.mg.gov.br/images/1\\_noticias/08\\_2022/02-jul-ago-set/02-09-Boletim\\_periodo\\_eleitoral\\_An%C3%A1lise%20Febre%20Amarela%2001-09-2022.pdf](https://saude.mg.gov.br/images/1_noticias/08_2022/02-jul-ago-set/02-09-Boletim_periodo_eleitoral_An%C3%A1lise%20Febre%20Amarela%2001-09-2022.pdf)> Acesso em 02 de setembro de 2022.
  71. Governo do estado de Minas Gerais. Secretaria de Saúde. Boletim epidemiológico COVID-19 até 09 de setembro de 2022, Disponível em
  72. <[https://www.coronavirus.saude.mg.gov.br/images/2022/08/COVID-19\\_-\\_BOLETIM20220909.pdf](https://www.coronavirus.saude.mg.gov.br/images/2022/08/COVID-19_-_BOLETIM20220909.pdf)> Acesso em 09 de setembro de 2022b.
  73. GRINDE, Bjørn. Herpesviruses: latency and reactivation – viral strategies and host response. *Journal of Oral Microbiology*, v. 5, n. 1, 2013.
  74. GUO, Haitao *et al.* Role of tegument proteins in herpesvirus assembly and egress. *Protein and Cell*. [S.l.: s.n.], 2010
  75. HATOUN J, Correa ET, Donahue SMA, Vernacchio L. Social Distancing for COVID-19 and Diagnoses of Other Infectious Diseases in Children. *Pediatrics*. 2020 Oct;146(4):e2020006460. doi: 10.1542/peds.2020-006460. Epub 2020 Sep 2. PMID: 32879032.
  76. HARVALA, Heli *et al.* Distinct systemic and central nervous system disease patterns in enterovirus and parechovirus infected children. *Journal of Infection*, v. 69, n. 1, 2014.
  77. HERSI, Kenadeed *et al.* *Meningitis (Nursing)*. [S.l.: s.n.], 2021.
  78. HOPKINS, Susan; JOLLES, Stephen. *Drug-induced aseptic meningitis. Expert Opinion on Drug Safety*. [S.l.: s.n.], 2005
  79. HOYER, C. *et al.* Blood-CSF-barrier dysfunction is a marker for encephalitic involvement in patients with aseptic meningitis/meningoencephalitis. *Journal of Clinical Virology*, v. 84, 2016.
  80. HRISHI, Ajay Prasad; SETHURAMAN, Manikandan. Cerebrospinal fluid (CSF) analysis and interpretation in neurocritical care for acute neurological conditions. *Indian Journal of Critical Care Medicine*, v. 23, 2019.
  81. HUANG, Chaolin *et al.* Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *The Lancet*, v. 395, n. 10223, 2020.
  82. HUANG HI, Shih SR. Neurotropic Enterovirus Infections in the Central Nervous System. *Viruses*. 2015 Nov 24;7(11):6051-66. doi: 10.3390/v7112920. PMID: 26610549; PMCID: PMC4664993
  83. HUCH, Jennifer H. *et al.* Impact of Varicella-Zoster Virus on Dendritic Cell Subsets in Human Skin during Natural Infection. *Journal of Virology*, v. 84, n. 8, 2010.
  84. IANI, Felipe C.M. *et al.* Epidemiology and evolution of Zika virus in Minas Gerais, Southeast Brazil. *Infection, Genetics and Evolution*, v. 91, 2021.
  85. JACKSON, Cody B. *et al.* Mechanisms of SARS-CoV-2 entry into cells. *Nature*

- Reviews Molecular Cell Biology*. [S.l.: s.n.], 2022
86. JAMES, Scott H.; KIMBERLIN, David W. *Neonatal herpes simplex virus infection: Epidemiology and treatment. Clinics in Perinatology*. [S.l.: s.n.], 2015
  87. JAYADAS, T. T. P. et al. The clinical profile, hematological parameters and liver transaminases of dengue NS1 Ag positive patients admitted to Jaffna Teaching Hospital, Sri Lanka. *BMC Research Notes*, v. 12, n. 1, Set, 2019.
  88. JERRARD DA, Hanna JR, Schindelheim GL. Cerebrospinal fluid. *J Emerg Med*. 2001 Aug;21(2):171-8
  89. JONES, Cheryl A.; RAYNES-GREENOW, Camille; ISAACS, David. Population based surveillance of neonatal herpes simplex virus infection in Australia, 1997-2011. *Clinical Infectious Diseases*, v. 59, n. 4, 2014.
  90. JUNIOR, Walter Rebuite dos Santos. INVESTIGAÇÃO DE AGENTES ETIOLÓGICOS VIRAIS EM CASOS DE MENINGOENCEFALITES EM CRIANÇAS. 2021. 88 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Microbiologia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2021.
  91. KARCIOGLU, O.; YILMAZ, E. Diagnostic Advances in Acute Viral Meningitis: Any Novelty for the Physician? *Emergency Medicine - Open Journal*, v. 4, n. 1, p. 20–24, Dec. 2018.
  92. KHEDIRI, Z. et al. Adverse effects of maternal enterovirus infection on the pregnancy outcome: A prospective and retrospective pilot study. *Virology Journal*, v. 15, n. 1, 2018.
  93. KIM, Kwang Sik. *Mechanisms of microbial traversal of the blood-brain barrier. Nature Reviews Microbiology*. [S.l.: s.n.], 2008
  94. KNIPE, David M.; CLIFFE, Anna. *Chromatin control of herpes simplex virus lytic and latent infection. Nature Reviews Microbiology*. [S.l.: s.n.], 2008
  95. KOHIL, Amira et al. *Viral meningitis: an overview. Archives of Virology*. [S.l.: s.n.], 2021
  96. KOSKI, Renee R.; VAN LOO, Dean. *Etiology and management of chronic meningitis. U.S. Pharmacist*. [S.l.: s.n.], 2010
  97. KROPP, Rhonda Y. et al. Neonatal herpes simplex virus infections in Canada: Results of a 3-year national prospective study. *Pediatrics*, v. 117, n. 6, 2006.
  98. KU, Chia-Chi et al. Tropism of Varicella-Zoster Virus for Human Tonsillar CD4 + T Lymphocytes That Express Activation, Memory, and Skin Homing Markers . *Journal of Virology*, v. 76, n. 22, 2002.
  99. KUKHANOVA, M. K.; KOROVINA, A. N.; KOCHETKOV, S. N. *Human herpes simplex virus: Life cycle and development of inhibitors. Biochemistry (Moscow)*. [S.l.: s.n.], 2014
  100. KÜMMERER, Beate Mareike et al. Construction of an infectious Chikungunya virus cDNA clone and stable insertion of mCherry reporter genes at two different sites. *Journal of General Virology*, v. 93, n. PART 9, 2012.
  101. KUPILA L, Vuorinen T, Vainionpaa R, Hukkanen V, Marttila RJ, Kotilainen P: Etiology of aseptic meningitis and encephalitis in an adult population. *Neurology*. 2006, 66: 75-80. 10.1212/01.wnl.0000191407.81333.00.
  102. LAN K, Luo MH. Herpesviruses: epidemiology, pathogenesis, and interventions. *Virol Sin*. 2017 Oct;32(5):347-348. doi: 10.1007/s12250-017-4108-2. PMID: 29116595; PMCID: PMC6598912.
  103. LEMANT J, Boisson V, Winer A, Thibault L, André H, Tixier F, et al. Serious acute chikungunya virus infection requiring intensive care during the Reunion Island outbreak in 2005–2006. *Critical care medicine*. 2008;36(9):2536–41. 10.1097/CCM.0b013e318183f2d2
  104. LI, Guo Hong et al. *Neurological manifestations of dengue infection. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. [S.l.: s.n.], 2017
  105. LI, Hongda et al. *The Neurobiology of Zika Virus. Neuron*. [S.l.: s.n.], 2016
  106. LIMA, Lyana Rodrigues Pinto et al. Diagnosis of human herpes virus 1 and 2 (HHV-1 and HHV-2): Use of a synthetic standard curve for absolute quantification by real time polymerase chain reaction. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 112, n. 3, 2017.
  107. LOUVEAU, A, Smirnov I, Keyes TJ, Eccles JD, Rouhani SJ, Peske JD, Derecki NC, Castle D, Mandell JW, Lee KS, Harris TH, Kipnis J. Structural and functional features of

- central nervous system lymphatic vessels. *Nature*. 2015 Jul 16;523(7560):337-41. doi: 10.1038/nature14432. Epub 2015 Jun 1. Erratum in: *Nature*. 2016 May 12;533(7602):278. PMID: 26030524; PMCID: PMC4506234.
108. LUCHS A, Russo DH, Cilli A, Costa FF, Morillo SG, Machado BC, Pellini AC, de Cássia Compagnoli Carmona R, Timenetsky Mdo C. Echovirus 6 associated to aseptic meningitis outbreak, in São Joaquim da Barra, São Paulo, Brazil. *Braz J Microbiol*. 2008 Jan;39(1):28-31. doi: 10.1590/S1517-83822008000100007. Epub 2008 Mar 1. PMID: 24031172; PMCID: PMC3768353.
  109. LUKŠIĆ, I. *et al.* Estimating global and regional morbidity from acute bacterial meningitis in children: assessment of the evidence. *Croatian Medical Journal, Zagreb*, v. 54, n. 6, p. 510–518, Dec. 2013.
  110. MACQUAID C, Brady M, Deane R. SARS-CoV-2: is there neuroinvasion? *Fluids Barriers CNS*. 2021 Jul 14;18(1):32. doi: 10.1186/s12987-021-00267-y. PMID: 34261487; PMCID: PMC8278192.
  111. MACIEL, N. de S., Braga, H. F. G. M., Moura, F. J. N. de ., Luzia, F. J. M., Sousa, I. e S., & Rouberte, E. S. C.. (2023). Temporal and spatial distribution of polio vaccine coverage in Brazil between 1997 and 2021. *Revista Brasileira De Epidemiologia*, 26, e230037. <https://doi.org/10.1590/1980-549720230037>
  112. MADHUGIRI, R. *et al.* Coronavirus cis-Acting RNA Elements. *Advances in Virus Research*. [S.l: s.n.], 2016. v. 96. .
  113. MAHADEVAN, Vishy. *Neuroanatomy: an overview. Surgery (United Kingdom)*. [S.l: s.n.], , 2018
  114. MARINHO EPM, Ferreira EDS, Barrionuevo CCLB, Melo SA, Cordeiro JSM, Pinto SD, Monte RL, da Silva VA, Martins YF, Reis MF, Tufic-Garutti SDS, Sampaio VS, de Castro DB, Feitoza PVS, da Rocha LA, de Lima Ferreira LC, Bastos MS. Pediatric central nervous system infections in the Amazon: clinical and laboratory profiles. *Front Public Health*. 2023 Dec 21;11:1329091. doi: 10.3389/fpubh.2023.1329091. PMID: 38186717; PMCID: PMC10768178.
  115. MARINHO, P. E.S.; KROON, E. G. *Flaviviruses as agents of childhood central nervous system infections in Brazil. New Microbes and New Infections*. [S.l: s.n.], , 2019
  116. MARINHO, Paula Eillanny Silva *et al.* The impact of viral infections on childhood central nervous system infections. *Journal of Clinical Virology*, v. 140, 2021.
  117. MARINHO, Paula Eillanny Silva. DETECÇÃO E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE FLAVIVIRUS EM LÍQUIDO CEFALORRAQUIDIANO DE CRIANÇAS COM SUSPEITA DE INFECÇÃO NO SISTEMA NERVOSO CENTRAL. 2019. 123 f. Tese (Doutorado) - Curso de Microbiologia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2019.
  118. MARIMOUTOU C, Vivier E, Oliver M, Boutin J-P, Simon F. Morbidity and impaired quality of life 30 months after chikungunya infection: comparative cohort of infected and uninfected French military policemen in Reunion Island. *Medicine*. 2012;91(4):212–9. 10.1097/MD.0b013e318260b604
  119. MARTINS, Marlos Melo; PRATA-BARBOSA, Arnaldo; DA CUNHA, Antônio José Ledo Alves. *Update on SARS-CoV-2 infection in children. Paediatrics and International Child Health*. [S.l: s.n.], , 2021
  120. MAURY, A. *et al.* Neurological manifestations associated with SARS-CoV-2 and other coronaviruses: A narrative review for clinicians. *Revue Neurologique*. [S.l: s.n.], , 2021
  121. MAXIMOVA, Olga A.; PLETNEV, Alexander G. *Flaviviruses and the central nervous system: Revisiting neuropathological concepts. Annual Review of Virology*. [S.l: s.n.], , 2018
  122. MCGAVERN, Dorian B.; KANG, Silvia S. *Illuminating viral infections in the nervous system. Nature Reviews Immunology*. [S.l: s.n.], , 2011
  123. MCINTYRE, Peter B. *et al.* Effect of vaccines on bacterial meningitis worldwide. *The Lancet*. [S.l: s.n.], , 2012
  124. MCPHERSON R.A.; PINCUS M. R. *Henry's Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods*. 22 ed. Philadelphia: Saunders, 2011. 1618 p.

125. MEHRA, Bharat *et al.* Covid-19 associated multisystem inflammatory syndrome in children: A multicentric retrospective cohort study. *Indian Journal of Critical Care Medicine*, v. 25, n. 10, 2021.
126. MEHNDIRATTA MM, Mehndiratta P, Pande R. Poliomyelitis: historical facts, epidemiology, and current challenges in eradication. *Neurohospitalist*. 2014 Oct;4(4):223-9. doi: 10.1177/1941874414533352. PMID: 25360208; PMCID: PMC4212416.
127. MERCORELLI, Beatrice; PALÙ, Giorgio; LOREGIAN, Arianna. *Drug Repurposing for Viral Infectious Diseases: How Far Are We? Trends in Microbiology*. [S.l: s.n.]. , 2018
128. MEYDING-LAMADÉ, Uta; CRAEMER, Eva Maria. Meningitis, Meningoencephalitis - A Chameleon in (Emergency) Medicine. *Deutsche Medizinische Wochenschrift*, v. 145, n. 19, 2020.
129. MEYEROWITZ, Eric A. *et al.* Transmission of sars-cov-2: A review of viral, host, and environmental factors. *Annals of Internal Medicine*. [S.l: s.n.]. , 2021
130. MILLER J.M. *et al.* A Guide to Utilization of the Microbiology Laboratory for Diagnosis of Infectious Diseases: 2018 Update by the Infectious Diseases Society of America and the American Society for Microbiology. *Clinical Infectious Diseases*, Chicago, v. 67, n. 6, p. e1–e94, June. 2018.
131. MILLER, Katelyn D.; SCHNELL, Matthias J.; RALL, Glenn F. *Keeping it in check: Chronic viral infection and antiviral immunity in the brain. Nature Reviews Neuroscience*. [S.l: s.n.]. , 2016
132. MORIGUCHI, T. *et al.* A first case of meningitis/encephalitis associated with SARS-Coronavirus-2. *International Journal of Infectious Diseases*, Hamiton, v. 94, p. 55–58, May. 2020.
133. MOURA REIS, Lúcia Aline; NUNES NETO, Joaquim Pinto. Ilheus virus: Revisão sobre um Arbovirus Emergente / Ilheus virus: emerging arbovirus review. *Brazilian Journal of Development*, v. 7, n. 4, 2021.
134. MULLER M, Slivinski N, Todd EJAA, Khalid H, Li R, Karwatka M, Merits A, Mankouri J, Tuplin A. Chikungunya virus requires cellular chloride channels for efficient genome replication. *PLoS Negl Trop Dis*. 2019 Sep 4;13(9):e0007703. doi: 10.1371/journal.pntd.0007703. PMID: 31483794; PMCID: PMC6746389.
135. MUENCHHOFF, Maximilian; GOULDER, Philip J R. Sex differences in pediatric infectious diseases. *Journal of Infectious Diseases*, 2014.
136. NAGEL, Maria A.; GILDEN, Don. *Neurological complications of varicella zoster virus reactivation. Current Opinion in Neurology*. [S.l: s.n.]. , 2014
137. NAGEL, Maria A.; NIEMEYER, Christy S.; BUBAK, Andrew N. *Central nervous system infections produced by varicella zoster virus. Current Opinion in Infectious Diseases*. [S.l: s.n.]. , 2020
138. NANDWANI, S. *et al.* Early hematological parameters as predictors for outcomes in children with dengue in northern India: A retrospective analysis. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 54, p. 1–7, 2021.
139. NEAL, J. W. *Flaviviruses are neurotropic, but how do they invade the CNS? Journal of Infection*. [S.l: s.n.]. , 2014
140. NUNES, Marcio Roberto Teixeira *et al.* Emergence and potential for spread of Chikungunya virus in Brazil. *BMC Medicine*, v. 13, n. 1, 2015.
141. OCHANI, Rohan Kumar *et al.* Covid-19 pandemic: From origins to outcomes.

- A comprehensive review of viral pathogenesis, clinical manifestations, diagnostic evaluation, and management. Infezioni in Medicina.* [S.l: s.n.]. , 2021
144. OLIVEIRA, Danilo Bretas de. DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO DE UMA PLATAFORMA DE DIAGNÓSTICO PARA MENINGOENCEFALITES VIRAIS POR PCR EM TEMPO REAL. 2015. 172 f. Tese (Doutorado) - Curso de Microbiologia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2015.
  145. PASTORINO, Boris *et al.* Development of a TaqMan® RT-PCR assay without RNA extraction step for the detection and quantification of African Chikungunya viruses. *Journal of Virological Methods*, v. 124, n. 1–2, 2005.
  146. PATEL, Pranav *et al.* Development of one-step quantitative reverse transcription PCR for the rapid detection of flaviviruses. *Virology Journal*, v. 10, 2013.
  147. PAUL, Aniko V.; WIMMER, Eckard. Initiation of protein-primed picornavirus RNA synthesis. *Virus Research*, v. 206, 2015.
  148. PETERSEN, Lyle R.; POWERS, Ann M. *Chikungunya: Epidemiology. F1000Research.* [S.l: s.n.]. , 2016
  149. PHU LY, Minh Huong *et al.* Isolation of dengue serotype 3 virus from the cerebrospinal fluid of an encephalitis patient in Hai Phong, Vietnam in 2013. *Journal of Clinical Virology*, v. 70, 2015.
  150. PINNINTI, Swetha G.; KIMBERLIN, David W. *Neonatal Herpes Simplex Virus Infections. Pediatric Clinics of North America.* [S.l: s.n.]. , 2013
  151. PINTO JUNIOR VL, Rebelo MC, Costa EV, Silva EE, Bóia MN. Description of a widespread outbreak of aseptic meningitis due to echovirus 30 in Rio de Janeiro state, Brazil. *Braz J Infect Dis.* 2009; 13(5): 367-370.
  152. PIRES, Frederico Ribeiro *et al.* Comparison of enterovirus detection in cerebrospinal fluid with Bacterial Meningitis Score in children. *Einstein (Sao Paulo, Brazil)*, v. 15, n. 2, 2017.
  153. PIRET, Jocelyne; BOIVIN, Guy. *Immunomodulatory strategies in herpes simplex virus encephalitis. Clinical Microbiology Reviews.* [S.l: s.n.]. , 2020
  154. PLOURDE, Anna R.; BLOCH, Evan M. *A literature review of zika virus. Emerging Infectious Diseases.* [S.l: s.n.]. , 2016
  155. PNCQ. Programa nacional de controle de qualidade. Sociedade Brasileira de Patologia Clínica. VALORES DE REFERÊNCIA HEMATOLÓGICOS PARA ADULTOS E CRIANÇAS. Disponível em <<https://www.pncq.org.br/uploads/2019/VNH2019.pdf>> Acesso em 25 de ABRIL de 2024.
  156. PONS-SALOR M, Oberste MS, Pallansch MA, Abedi GR, Takahashi S, Grenfell BT, Grassly NC. The seasonality of nonpolio enteroviruses in the United States: Patterns and drivers. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2018 Mar 20;115(12):3078-3083. doi: 10.1073/pnas.1721159115. Epub 2018 Mar 5. PMID: 29507246; PMCID: PMC5866597.
  157. POSTLER T.S., Beer, M., Blitvich, B.J. *et al.* Renaming of the genus *Flavivirus* to *Orthoflavivirus* and extension of binomial species names within the family *Flaviviridae.* *Arch*

- Virology* 168, 224 (2023). <https://doi.org/10.1007/s00705-023-05835-1>
158. PUEMPA J, Mauleekoonphairoj J, Linsuwanon P, Suwannakarn K, Chieochansin T, Korkong S, Theamboonlers A, Poovorawan Y. Prevalence and characterization of enterovirus infections among pediatric patients with hand foot mouth disease, herpangina and influenza like illness in Thailand, 2012. *PLoS One*. 2014 Jun 2;9(6):e98888. doi: 10.1371/journal.pone.0098888. PMID: 24887237; PMCID: PMC4041783.
  159. RADIA, Trisha *et al.* *Multi-system inflammatory syndrome in children & adolescents (MIS-C): A systematic review of clinical features and presentation. Paediatric Respiratory Reviews*. [S.l: s.n.], 2021
  160. RAMALHO E, Sousa I Jr, Burlandy F, Costa E, Dias A, Serrano R, Oliveira M, Lopes R, Debur M, Burger M, Riediger I, Oliveira ML, Nascimento O, da Silva EE. Identification and Phylogenetic Characterization of Human Enteroviruses Isolated from Cases of Aseptic Meningitis in Brazil, 2013-2017. *Viruses*. 2019 Jul 29;11(8):690. doi: 10.3390/v11080690. PMID: 31362357; PMCID: PMC6723535..
  161. RAZONABLE, Raymund R. *Antiviral drugs for viruses other than human immunodeficiency virus*. 2011, [S.l: s.n.], 2011.
  162. RISI JUNIOR JB. *Poliomielite no Brasil: do reconhecimento da doença ao fim da transmissão*. 1ª ed. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz; 2019
  163. ROCHA LCd, Estofolete CF, Aguiar Milhim BHGd, *et al.* Enteric viruses circulating in undiagnosed central nervous system infections at tertiary hospital in São José do Rio Preto, São Paulo, Brazil. *J Med Virol*. 2021; 93: 3539–3548. <https://doi.org/10.1002/jmv.26216>
  164. ROTH, Patrick; WELLER, Michael. *Management of neoplastic meningitis. Chinese Clinical Oncology*. [S.l: s.n.], 2015
  165. Ren, J., Wang, X., Hu, Z. *et al.* Picornavirus uncoating intermediate captured in atomic detail. *Nat Commun* 4, 1929 (2013). <https://doi.org/10.1038/ncomms2889>
  166. ROZENBERG, Flore. *Herpes simplex virus and central nervous system infections: Encephalitis, meningitis, myelitis. Virologie*. [S.l: s.n.], 2020
  167. RYU WS, Kang B, Hong J, Hwang S, Kim J, Cheon DS. Clinical and etiological characteristics of enterovirus 71-related diseases during a recent 2-year period in Korea. *J Clin Microbiol*. 2010 Jul;48(7):2490-4. doi: 10.1128/JCM.02369-09. Epub 2010 May 12. PMID: 20463159; PMCID: PMC2897491
  168. SADEGHIEH, Tara *et al.* Zika virus outbreak in Brazil under current and future climate. *Epidemics*, v. 37, 2021.
  169. SÁFADI, Marco Aurélio Palazzi; ALMEIDA, Flavia J.; DE ÁVILA KFOURI, Renato. Zika virus outbreak in Brazil—Lessons learned and perspectives for a safe and effective vaccine. *Anatomical Record*, v. 304, n. 6, 2021.
  170. SAKKA, L.; COLL, G.; CHAZAL, J. *Anatomy and physiology of cerebrospinal fluid. European Annals of Otorhinolaryngology, Head and Neck Diseases*. [S.l: s.n.], 2011
  171. SALLES, Tiago Souza *et al.* *History, epidemiology and diagnostics of dengue in the*

- American and Brazilian contexts: A review. Parasites and Vectors.* [S.l: s.n.], 2018
172. SANTIAGO, Gilberto A. *et al.* Analytical and Clinical Performance of the CDC Real Time RT-PCR Assay for Detection and Typing of Dengue Virus. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, v. 7, n. 7, 2013.
  173. SARRAZIN, J.-L.; BONNEVILLE, F.; MARTIN-BLONDEL G. Brain infections. *Diagnostic and Interventional Imaging*, Paris, v. 93, n. 6, p. 473–490, Juin. 2012.
  174. SAWYER MH: Enterovirus infections: diagnosis and treatment. *Curr Opin Pediatr.* 2001, 13: 65-69. 10.1097/00008480-200102000-00012.
  175. SHARMA, Kiran Bala; VRATI, Sudhanshu; KALIA, Manjula. Pathobiology of Japanese encephalitis virus infection. *Molecular Aspects of Medicine*, v. 81, 2021.
  176. SEEHUSEN DA, Reeves MM, Fomin DA. Cerebrospinal fluid analysis. *Am Fam Physician.* 2003;68(6):1103-8.
  177. SIMMONDS, Peter *et al.* ICTV virus taxonomy profile: Flaviviridae. *Journal of General Virology*, v. 98, n. 1, 2017.
  178. SIPS, Gregorius J.; WILSCHUT, Jan; SMIT, Jolanda M. *Neuroinvasive flavivirus infections. Reviews in Medical Virology.* [S.l: s.n.], 2012
  179. STRASINGER SK, Lorenzo MSD. *Urinalysis and body fluids.* 5<sup>a</sup> ed. Philadelphia: F. A. Davis Company, 2008.
  180. Stiasny K, Kiermayr S, Holzmann H, Heinz FX. Cryptic properties of a cluster of dominant flavivirus cross-reactive antigenic sites. *J Virol.* 2006 Oct;80(19):9557-68. doi: 10.1128/JVI.00080-06. PMID: 16973559; PMCID: PMC1617264.
  181. SOUSA, I.P., Jr.; dos Santos, F.B.; de Paula, V.S.; Vieira, T.C.R.G.; Dias, H.G.; Barros, C.A.; da Silva, E.E. Viral and Prion Infections Associated with Central Nervous System Syndromes in Brazil. *Viruses* 2021, 13, 1370. <https://doi.org/10.3390/v13071370>
  182. SWANSON, Phillip A.; MCGAVERN, Dorian B. *Viral diseases of the central nervous system. Current Opinion in Virology.* [S.l: s.n.], 2015
  183. TAVAKOLI NP, Wang H, Nattanmai S, Dupuis M, Fusco H, Hull R: Detection and typing of enteroviruses from CSF specimens from patients diagnosed with meningitis/encephalitis. *J Clin Virol.* 2008, 43: 207-211. 10.1016/j.jcv.2008.06.016.
  184. TEALE, A *et al.* Zika virus, an emerging flavivirus, as a cause of fever and rash in a traveller returning from Central America. *Canada Communicable Disease Report*, v. 42, n. 3, 2016.
  185. TELESSAÚDERS-UFRGS, PROTOCOLOS DE ENCAMINHAMENTO PARA HEMATOLOGIA PEDIÁTRICA. 2018. Disponível em <[https://www.ufrgs.br/telessauders/documentos/protocolos\\_resumos/hematologia\\_pediatria.pdf](https://www.ufrgs.br/telessauders/documentos/protocolos_resumos/hematologia_pediatria.pdf)> Acesso em 12 de abril de 2024.
  186. THOMAS, Stephen J.; MARTINEZ, Luis J.; ENDY, Timothy P. Flaviviruses: Yellow fever, Japanese B, west nile, and others. *Viral Infections of Humans: Epidemiology and Control.* [S.l: s.n.], 2014. .
  187. TÖRÜN, Selda Hançerli *et al.* Multicenter prospective surveillance study of viral agents causing meningoencephalitis. *Scientific Reports*, v. 11, n. 1, 2021.

188. TREISTER, Andrew K.; KOERNER, Ines P. Pharmacologic Treatment of Meningitis and Encephalitis in Adult Patients. *Journal of Neuroanaesthesiology and Critical Care*, v. 06, n. 02, 2019.
189. TSUNEMINE, Hiroko *et al.* Multiplex Polymerase Chain Reaction Assay for Early Diagnosis of Viral Infection. *Polymerase Chain Reaction for Biomedical Applications*. [S.l: s.n.], 2016. .
190. VAIRO, Francesco *et al.* *Chikungunya: Epidemiology, Pathogenesis, Clinical Features, Management, and Prevention*. *Infectious Disease Clinics of North America*. [S.l: s.n.], 2019
191. VARELA, Fernanda Hammes; PINTO, Leonardo Araújo; SCOTTA, Marcelo Comerlato. Global impact of varicella vaccination programs. *Human Vaccines and Immunotherapeutics*, v. 15, n. 3, 2019.
192. VEDOVELLO, Danila *et al.* First genome sequence of St. Louis encephalitis virus (SLEV) isolated from a human in Brazil. *Archives of Virology*, v. 160, n. 5, 2015.
193. VEGA-RÚA, Anubis *et al.* Vector competence of *Aedes albopictus* populations for chikungunya virus is shaped by their demographic history. *Communications Biology*, v. 3, n. 1, 2020.
194. VIDAL, Luine Rosele Renaud *et al.* Enterovirus and herpesviridae family as etiologic agents of lymphomonocytary meningitis, Southern Brazil. *Arquivos de Neuro Psiquiatria*, v. 69, n. 3, 2011.
195. WEN, Xingjian *et al.* *Multifunctionality of structural proteins in the enterovirus life cycle*. *Future Microbiology*. [S.l: s.n.], 2019
196. WRIGHT, W. F.; PINTO, C. N.; PALISOC, K.; BAGHLI, S. Viral (aseptic) meningitis: A review. *Journal of the Neurological Sciences*, Amsterdam, v. 398, p. 176–183, Mar. 2019.
197. WOLBURG, Hartwig; LIPPOLDT, Andrea. Tight junctions of the blood-brain barrier: Development, composition and regulation. *Vascular Pharmacology*, v. 38, n. 6, 2002.
198. WU, Yi Chi; CHEN, Ching Sung; CHAN, Yu Jiun. *The outbreak of COVID-19: An overview*. *Journal of the Chinese Medical Association*. [S.l: s.n.], 2020
199. YAMAMOTO, Lidia *et al.* *SARS-CoV-2 infections with emphasis on pediatric patients: A narrative review*. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo*. [S.l: s.n.], 2020
200. YELEHE-OKOUMA, Melissa *et al.* *Drug-induced aseptic meningitis: a mini-review*. *Fundamental and Clinical Pharmacology*. [S.l: s.n.], 2018
201. ZAMANI, Raha; POUREMAMALI, Rozhina; REZAEI, Nima. Central neuroinflammation in Covid-19: a systematic review of 182 cases with encephalitis, acute disseminated encephalomyelitis, and necrotizing encephalopathies. *Reviews in the Neurosciences*, v. 33, n. 4, 2022.
202. Zamperin G, Milani A, Gastaldelli M, Quartesan R, Fortin A, Cappelozza E, Patarnello P, Toffan A. Genomic Sequence of a New *Alphavirus* Detected in Comber (Serranus cabrilla). *Microbiol Resour Announc*. 2020 Jan 9;9(2):e01294-19. doi: 10.1128/MRA.01294-19. PMID: 31919171; PMCID: PMC6952657.

203. Zaoutis T, Klein JD: Enterovirus infections. *Pediatr Rev.* 1998, 19: 183-191. 10.1542/pir.19-6-183.
204. ZAKI SALAHUDDIN, S. *et al.* Isolation of a new virus, HBLV, in patients with lymphoproliferative disorders. *Science*, v. 234, n. 4776, 1986.
205. ZELL, R. *et al.* ICTV virus taxonomy profile: Picornaviridae. *Journal of General Virology*, v. 98, n. 10, 2017.
206. ZELL, Roland. *Picornaviridae—the ever-growing virus family. Archives of Virology.* [S.l: s.n.]. , 2018
207. ZHANG S, He Y, Wu Z, Wang M, Jia R, Zhu D, Liu M, Zhao X, Yang Q, Wu Y, Zhang S, Huang J, Ou X, Gao Q, Sun D, Zhang L, Yu Y, Chen S, Cheng A. Secretory pathways and multiple functions of nonstructural protein 1 in flavivirus infection. *Front Immunol.* 2023 Jul 13;14:1205002. doi: 10.3389/fimmu.2023.1205002. PMID: 37520540; PMCID: PMC10372224.
208. ZHAO, Rong *et al.* *Flavivirus: From structure to therapeutics development. Life.* [S.l: s.n.]. , 2021

## 9. Material suplementar

Tabela suplementar 1 – Informações clínicas coletadas dos prontuários dos pacientes que testaram positivo para ENTV

Identificador da amostra	Admissão	data da coleta	data de nascimento	Inicio dos sintomas	Sexo	Local de origem	Tempo de internação	Desfecho	Diagnóstico Final
1498	19/07/2022	21/07/2022	12/03/2015	17/07/2022	M	Belo Horizonte	16 dias	Melhorado	Encefalite viral; DM1 insulino-dependente com cetoacidose; SARS; outras convulsões não especificadas
1638	08/04/2022	08/04/2022	29/05/2019	06/04/2022	F	Belo Horizonte	6 dias	Melhorado	Encefalite viral, não especificada; Outras gastroenterites e colites não infecciosas
1512	04/05/2022	04/05/2022	17/02/2011	21/04/2022	F	Itaúna	63 dias	Melhorado	Síndrome de Guillain-Barre; Acidose
1515	28/01/2022	28/01/2022	27/11/2021	27/01/2022	F	Ribeirão das Neves	6 dias	Melhorado	hérnia inguinal à esquerda; covid-19; alteração auditiva a investigar; encefalite a investigar
1518	10/09/2022	11/09/2022	21/08/2022	06/09/2022	F	Belo Horizonte	16 dias	Melhorado	Infeção não especificada devido ao vírus da herpes
1602	23/05/2022	24/05/2022	14/05/2013	19/05/2022	F	Ribeirão das Neves	3 dias	Transferido-Santa Casa	Dor abdominal e pélvica
1652	15/02/2022	15/02/2022	19/04/2021	13/02/2022	M	Contagem	7 dias	Melhorado	Meningite viral não especificada
1470	10/09/2022	12/09/2022	05/06/2022	09/09/2022	F	Antônio Pereira	37 dias	Melhorado	Comunicação Interatrial; permeabilidade do canal arterial
1558	01/09/2022	02/09/2022	14/09/2021	ago/22	F	Moeda	21 dias	Melhorado	Outras pneumonias bacterianas
1466	21/05/2022	22/05/2022	11/11/2020	21/05/2022	M	Belo Horizonte	5 dias	Melhorado	Pneumonia devido a alimento ou vômito; convulsões febris; SARS

Síntomas

Febre	Início da Febre	Exantema	Cefaléia	Arralgia	Vômito	Diarréia	Rigidez de nuca	Ataxia	Convulsões	Confusão mental	Síncopes	Hepatomegali	Outros
N	N	N	N	N	S	N	N	N	S	S	N	N	hipertonía; estado de mal epiléptico; tosse; nees-dade de intubação; epistaxe - oníficativa
S	06/04/2022	N	N	N	S	N	N	S	N	N	N	N	-
N	N	N	S	S	S	N	S	S	N	S	S	N	aumento pressóric; dificuldade de deambular; restrição da motilidade ocular bilateralmente; mialgia nos MMII; papiledema em fundo de olho; PA elevada; irritabilidade; abaulamento de fontanela; tosse seca esporádica; prostração; dificuldade para mamar lesões vesiculares inicialmente no abdome; com disseminação para outras partes do corpo e para o couro cabeludo; dor abdominal intensa
N	N	N	N	N	S	N	S	N	N	N	N	N	abaulamento da fontanela Displasia broncopulmonar; cianose; pneumotórax; tosse e esforço respiratório
S	13/02/2022	N	N	N	S	N	N	N	N	N	N	N	glasgow 7; nees-dade de intubação; sepse
S	29/09/2022	N	N	N	N	N	N	N	S	N	N	N	
S	31/08/2022	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	
S	21/05/2022	N	N	N	S	N	N	N	S	S	N	S	

Valores do hemograma e padrões hematemétricos											Leucograma				Presença de células imaturas?
Hemácias (milhões/mm <sup>3</sup> )	Hemoglobina (g/dL)	Hematócrito (%)	Plaquetas (mm <sup>3</sup> )	HCM (pg)	CHCM (g/dL)	VCM (fl)	RDW (%)	Leucócitos (mm <sup>3</sup> )	Linfócitos (%)	Neutrófilos segmentados (%)	Eosinófilos (%)	Monócitos (%)			
-	11,9	34,7	203000	-	-	-	-	9760	14	77	-	-	N		
4,85	12,9	37,7	429000	27,7	34,2	81	13,7	9670	22,42	63,67	0,9	3,58	N		
-	13,2	38,6	388000	-	-	-	-	11600	15	77	1	6	N		
-	10,5	31,2	298000	-	-	-	-	5580	52	27	0	20	N		
-	17,4	54,4	516000	-	-	-	-	13770	50	18	2	14	bastonetes		
3,41	9	26,8	437000	26,4	33,7	78,4	13,7	12460	10	84	1	5	N		
4,7	12	35	416000	25,5	34,3	74,5	16,3	20110	35	55	3	2	bastonetes		
-	8,9	27,9	589000	-	-	-	-	14260	35	41	10	4	bastonetes		
3,36	9,6	30,9	231000	28,7	31,2	92,2	17,7	19220	3652	9033	192	4036	bastonetes		
4,07	9,7	28,9	300000	23,8	33,5	71,1	17,1	16560	17,5	-	50	-	bastonetes		

Presença de células mastocitárias?	Análise do LCR							Bioquímica		
	Leucócitos (mm <sup>3</sup> )	Linfócitos (x)	Monócitos (x)	Neutrófilos (x)	Lactato (mmol/L)	Glicose (mg/dL)	Proteínas (mg/dL)	PCR	AST	ALT
N	2	100	0	0	1,8	161	19	18,9	-	-
N	11	78	21	1	1,1	56	15	<5	-	-
N	3	89	10	0	1,7	63	588	1,99	56	10
N	3	72	12	8	1,2	36	65	<5	-	-
bastonetes	3	72	12	8	1,2	36	65	<5	56	-
N	2	94	5	1	1,2	53	55	6,3	25	-
bastonetes	26	90	0	10	1,3	53	23	14,7	44	13
bastonetes	1	67	18	10	1,4	56	54	25	-	-
bastonetes	2	88	10	1	6,1	69	34	283,9	26	13
bastonetes	8	83	16	0	1,6	77	<10	<10	6,2	-

F = sexo feminino, M = sexo masculino, - = dado não encontrado/coletado, N = negativo.

## 10. Participação e organização em eventos científicos e atividade de extensão

- Participação no programa de extensão “Ciência pra você – UFMG”, voltado para divulgação científica em redes sociais. (Setembro de 2022 a agosto de 2023)

- Organização do Simpósio de Microbiologia – UFMG (27 a 29 de setembro de 2022)

- Apresentações de trabalhos:

58º Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical (10 a 13 de setembro de 2023)

- 1- Infecções no sistema nervoso central causadas por dengue vírus ou enterovírus relacionados a diferentes padrões hematimétricos, em pacientes pediátricos de Minas Gerais.

V FAMERP-UTMB Emerging Infections in the Americas (25 a 28 de julho de 2023)

- 1- *Identification of enterovirus and absence of detection of flavivirus and Chikungunya virus in pediatric patients with suspected central nervous system infection in the metropolitan region of Belo Horizonte (MG), during 2022.*

34º Congresso da Sociedade Brasileira de Virologia (24 a 27 de setembro de 2023)

- 1- *Central nervous system infections by dengue virus are more related to the presence of seizures when compared to enterovirus infections in pediatric patients.*
- 2- *Detection of enterovirus in cerebrospinal fluid from pediatric patients with suspected central nervous system infection in the metropolitan region of Belo Horizonte (MG), during 2022.*