

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
CENTRO DE PÓS GRADUAÇÃO DA FACULDADE DE MEDICINA
CIÊNCIAS DA SAÚDE / SAÚDE DA CRIANÇA E DO ADOLESCENTE

Aline Almeida Bentes

**AVALIAÇÃO DE FATORES PREDITIVOS PARA COMPLICAÇÕES
NEUROLÓGICAS À ALTA HOSPITALAR E DURANTE SEGUIMENTO CLÍNICO
EM COORTE DE CRIANÇAS E ADOLESCENTES COM DOENÇA
NEUROINVASIVA CONFIRMADA POR FLAVIVIRUS.**

Belo Horizonte

2020

Aline Almeida Bentes

**AVALIAÇÃO DE FATORES PREDITIVOS PARA COMPLICAÇÕES
NEUROLÓGICAS À ALTA HOSPITALAR E DURANTE SEGUIMENTO CLÍNICO
EM COORTE DE CRIANÇAS E ADOLESCENTES COM DOENÇA
NEUROINVASIVA CONFIRMADA POR FLAVIVIRUS.**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde da Criança e do Adolescente da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para obtenção do título de Doutora em Saúde da Criança e do Adolescente.

Orientadora: Roberta Maia de Castro Romanelli

Co-orientadora: Erna Geessien Kroon

Belo Horizonte

2020

B475a Bentes, Aline Almeida.
Avaliação de fatores preditivos para complicações neurológicas à alta hospitalar e durante seguimento clínico em coorte de crianças e adolescentes com Doença Neuroinvasiva confirmada por Flavivirus [manuscrito]: subtítulo. / Aline Almeida Bentes. - - Belo Horizonte: 2020.
109f.: il.
Orientador (a): Roberta Maia de Castro Romanelli.
Coorientador (a): Erna Geessien Kroon.
Área de concentração: Saúde da Criança e do Adolescente.
Tese (doutorado): Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina.

1. Encefalite. 2. Meningite. 3. Vírus da Dengue. 4. Zika vírus. 5. Vírus da Febre Amarela. 6. Dissertação Acadêmica. I. Romanelli, Roberta Maia de Castro. II. Kroon, Erna Geessien. III. Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina. IV. Título.

NLM: WL 200

Bibliotecário responsável: Fabian Rodrigo dos Santos CRB-6/2697



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE
SAÚDE DA CRIANÇA E DO ADOLESCENTE

FOLHA DE APROVAÇÃO

AVALIAÇÃO DE FATORES PREDITIVOS PARA COMPLICAÇÕES NEUROLÓGICAS À ALTA HOSPITALAR E DURANTE SEGUIMENTO CLÍNICO EM COORTE DE CRIANÇAS E ADOLESCENTES INTERNADAS PÓS INFECÇÃO DO SISTEMA NERVOSO CENTRAL POR FLAVIVIRUS

ALINE ALMEIDA BENTES

Tese de Doutorado designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIAS DA SAÚDE - SAÚDE DA CRIANÇA E DO ADOLESCENTE, da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito para obtenção do grau de Doutor em CIÊNCIAS DA SAÚDE - SAÚDE DA CRIANÇA E DO ADOLESCENTE, área de concentração em CIÊNCIAS DA SAÚDE defendida e aprovada, no dia vinte e sete de agosto de 2020, pela Banca Examinadora constituída pelos seguintes Professores Doutores: Roberta Maia de Castro Romanelli (orientadora) - UFMG, Adélia Maria de Miranda Henriques Souza - IMIP, Danilo Bretas de Oliveira - UFVJM, Cláudia Machado Siqueira - UFMG, Lilian Martins de Oliveira Diniz - UFMG e Erna Geessien Kroon (Coorientadora) - UFMG

Belo Horizonte, 27 de agosto de 2020.



Documento assinado eletronicamente por **Danilo Bretas de Oliveira, Usuário Externo**, em 27/08/2020, às 18:23, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Roberta Maia de Castro Romanelli, Professora do Magistério Superior**, em 28/08/2020, às 12:14, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Adélia Maria de Miranda Henriques Souza, Usuário Externo**, em 30/08/2020, às 19:48, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Erna Geessien Kroon, Coordenador(a) de curso de pós-graduação**, em 31/08/2020, às 13:20, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Lilian Martins Oliveira Diniz, Membro**, em 01/09/2020, às 15:15, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Claudia Machado Siqueira, Professora do Magistério Superior**, em 02/09/2020, às 19:04, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



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, informando o código verificador **0231495** e o código CRC **EE4D34D2**.

AGRADECIMENTOS

Às minhas orientadoras professora Roberta e professora Erna, pelas contribuições essenciais, disposição incondicional e grande exemplo de dedicação ao ensino e à pesquisa.

Aos professores e funcionários da Faculdade de Medicina e do Programa de Pós-Graduação em Saúde da Criança e Adolescência da UFMG pela atenção e ensinamentos, que me possibilitaram trilhar o caminho da pesquisa e docência. Gostaria de expressar meu carinho, admiração e gratidão.

Aos amigos e mestres do Hospital Infantil João Paulo II, especialmente Dra Andrea Lucchesi, que em sua dedicação e paixão à infectologia pediátrica, me inspira e fortalece. Sem o apoio de todos os profissionais do Hospital João Paulo II, em especial Dra Talitah Candiani, equipe de infectologia e neurologia pediátrica esta pesquisa não seria possível.

Às acadêmicas, alunas de iniciação científica, Alice, Sara, Isabela, Marcele e Luciana que muito me auxiliaram neste trabalho.

À toda equipe do Laboratório de Virologia do Instituto de Ciências Biológicas, UFMG, em especial Danilo B. De Oliveira, que abriu as portas para que eu pudesse participar deste grupo de pesquisa. À Paula Marinho e Ana Paula Crispim pela parceria e excelente trabalho realizado.

Aos professores Betania P. Drumond, Cláudia M. Siqueira e Paulo P. Christo pelas contribuições na banca de qualificação.

Aos professores membros da banca de Doutorado por terem aceito o convite.

Aos meus pais, familiares e amigos (as) por compreenderem as minhas ausências constantes. Pelo amor, apoio, incentivo e por serem o farol à iluminar o meu caminho. Agradeço de todo coração à amiga professora Daiana, companheira de faculdade, residência e de toda uma vida, por sempre me lembrar do meu compromisso em contribuir para pesquisa no nosso país.

Às crianças, adolescentes e seus cuidadores, que possibilitaram e inspiraram este trabalho, minha profunda gratidão.

À Deus, causa primeira de todas as coisas, Pai misericordioso e amoroso de todos nós.

RESUMO

Introdução – Os flavivírus dengue vírus (DENV) e Zika vírus (ZIKV) são causas de surtos frequentes no Brasil. O yellow fever virus (YFV) é endêmico na América do Sul e mesmo com uma vacina com alta eficácia, este flavivírus foi responsável por um surto importante entre 2016 e 2019 na região sudeste do Brasil. Por definição, doença neuroinvasiva confirmada por estes flavivírus, é todo quadro agudo de síndromes neurológicas centrais ou periféricas, em paciente com detecção viral, por isolamento ou reação em cadeia de polimerase (RT-PCR), em sangue, líquido ou outros líquidos corporais.

Objetivo - Caracterizar as manifestações neurológicas agudas apresentadas por crianças e adolescentes internadas com doença neuroinvasiva confirmada, pelos flavivírus de maior incidência no país, avaliar os desfechos neurológicos à alta hospitalar e durante seguimento ambulatorial, assim como, identificar fatores de risco associados às complicações neurológicas, e o tempo para resolução destas complicações.

Método - Trata-se de estudo prospectivo realizado entre março de 2014 e julho de 2019. A população alvo eram pacientes com manifestações neurológicas, diagnosticados por RT-PCR realizados no líquido cefalorraquidiano (LCR). Todas as amostras de líquido foram coletadas por médicos, imediatamente congeladas em nitrogênio líquido e enviadas para o Laboratório de Virologia da UFMG. Os pacientes foram acompanhadas clinicamente para avaliação dos seguintes desfechos: óbito, complicações neurológicas pós alta hospitalar, uso de medicação anticrise, sequelas motoras, insônia e cefaleia persistente. Também foi avaliado o tempo de resolução das complicações. Este estudo foi aprovado pelo COEP da UFMG e FHEMIG.

Resultados - Foram avaliados 505 pacientes com manifestações neurológica, sendo 91 casos com flavivírus detectados em líquido por RT-PCR (18%), com DENV em 14% dos pacientes, ZIKV em 3% e YFV em 1.2% dos casos. Entre as 91 crianças incluídas inicialmente, 73 permaneceram para análise no estudo, sendo 56 DENV, 12 ZIKV e cinco YFV. Duas crianças YFV positiva foram à óbito durante a internação e outras duas receberam alta com medicação anticrise epiléptica. Foram detectadas complicações neurológicas à alta hospitalar ou no primeiro mês pós alta em 20 crianças DENV positivas (39%) e em 4 crianças ZIKV (33%). Os fatores preditivos para complicações neurológicas foram: detecção do YFV em LCR, alteração de celularidade líquórica, encefalite, sintomas motores associados ao acometimento do sistema nervoso central (SNC), alteração de exame de imagem do SNC e alteração do eletroencefalograma (EEG) durante a internação.

O tempo médio para melhora clínica dos desfechos estudados foi de 2,8 meses para as crianças DENV positivas (variando entre 0 e 32 meses), foi de 6,3 meses para as crianças ZIKV positivas (variando entre 0 e 41,3 meses) e de 2,5 meses para as crianças YFV positivas (variando entre 0,1 e 10,2 meses). Não houve diferença estatística em relação ao tempo para melhora clínica (p-valor 0,574) entre as crianças DENV, ZIKV ou YFV positivas na análise de sobrevida.

Conclusão - Este foi o primeiro estudo prospectivo realizado em crianças e adolescentes no Brasil, com doença neuroinvasiva confirmada, para os três flavivírus de maior incidência no país. Os resultados encontrados reforçam a importância do diagnóstico etiológico por RT-PCR em líquido para o melhor acompanhamento clínico destes pacientes.

Palavras-chave: Encefalite. Meningite. Vírus da Dengue. Zika vírus. Febre Amarela. Doenças Neuroinvasivas. Infecções por Flavivirus

ABSTRACT

Introduction - The flavivirus dengue virus (DENV) and Zika virus (ZIKV) are causes of frequent outbreaks in Brazil. The yellow fever virus (YFV) is endemic in South America and even with a highly effective vaccine, this flavivirus was responsible for an important outbreak between 2016 and 2019 in the southeastern region of Brazil. By definition, neuroinvasive disease confirmed by these flaviviruses, is any acute central or peripheral neurological syndromes, in a patient with viral detection by isolation or polymerase chain reaction (RT-PCR) in blood, CSF or other body fluids.

Objective - To characterize the acute neurological manifestations presented by children and adolescents hospitalized with neuroinvasive disease confirmed by the highest incidence of flaviviruses in the country, to evaluate the neurological outcomes at hospital discharge and during outpatient follow-up, as well as to identify risk factors associated with neurological complications, and the time to resolve these complications.

Method - This is a prospective study carried out between March 2014 and July 2019. The target populations were patients with neurological manifestations, diagnosed by RT-PCR performed in cerebrospinal fluid (CSF). All CSF samples were collected by doctors, immediately frozen in liquid nitrogen and sent to the Virology Laboratory at UFMG. Patients were followed up clinically to assess the outcomes: death, neurological complications after hospital discharge, use of anti-crisis medication, motor sequelae, insomnia and persistent headache. The time to resolve complications was also assessed. This study was approved by the COEP of UFMG and FHEMIG.

Results - 505 patients with neurological manifestations were evaluated, with 91 cases with flavivirus detected in CSF by RT-PCR (18%), with DENV in 14% of patients, ZIKV in 3% and YFV in 1.2% of cases. Among the 91 children initially included, 73 remained for analysis in the study, with 56 DENV, 12 ZIKV and five YFV. Two YFV positive children died during hospitalization and two others were discharged with epileptic anti-crisis medication. Neurological complications were detected at hospital discharge or in the first month after discharge in 20 positive DENV children (39%) and in four ZIKV children (33%). The predictive factors for neurological complications were: detection of YFV in CSF, alteration of CSF cellularity, encephalitis, motor symptoms associated with involvement of the central nervous system (CNS), alteration of the CNS image exam and alteration of the electroencephalogram (EEG) during hospitalization.

The mean time to clinical improvement of the studied outcomes was 2.8 months for DENV positive children (ranging from 0 to 32 months), was 6.3 months for positive ZIKV children (ranging from 0 to 41.3 months) and 2.5 months for positive YFV children (ranging from 0.1 to 10.2 months). There was no statistical difference in relation to the time of evolution (p-value 0.574) between DENV, ZIKV or YFV positive children in the analysis of survival.

Conclusion - This was the first prospective study carried out in children and adolescents in Brazil, with confirmed neuroinvasive disease, for the three flaviviruses with the highest incidence in the country. The results found reinforce the importance of the etiological diagnosis by RT-PCR in CSF for the best clinical follow-up of these patients.

Keywords: Encephalitis. Meningitis. Dengue virus. Zika virus. Yellow fever. Neuroinvasive Diseases. Flavivirus infections.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	18
	Número de internações hospitalares por dengue, meningites não especificadas, meningite viral, encefalite viral, paralisia flácida e doenças inflamatórias do SNC entre os anos de 2014 e 2019 para crianças e adolescentes entre 0 e 14 anos. (Brasil, Ministério da Saúde, Datasus).	
Figura 2	25
	Ilustração esquemática de mecanismos de invasão flavivírus SNC. Adaptado Mustafá et al, 2019.	
Figura 3	40
	Fluxograma dos pacientes com manifestações neurológicas e DENV, ZIKV ou YFV detectado por RT-PCR em líquido, Hospital Infantil João Paulo II (Março 2014-Julho 2019).	
Figura 4	45
	Distribuição mensal dos casos de crianças com manifestações neurológicas e detecção em líquido de DENV (representado na cor vermelha), ZIKV (em cor azul) e YFV (em cor amarelo) no Hospital Infantil João Paulo II (Março 2014- Julho 2019)	
Figura 5	46
	Distribuição espacial pelo local de moradia dos casos de crianças com manifestações neurológicas e detecção em líquido de DENV (representado na cor vermelha), ZIKV(em cor azul) e YFV (em cor amarelo) no Hospital Infantil João Paulo II (Março 2014-Julho 2019)	
Figura 6	49
	Sorotipos de DENV identificados por RT-PCR no líquido das crianças com manifestações neurológicas entre Março 2014 e Julho 2019	
Figura 7	50
	Detecção dos sorotipos de dengue (DENV 1-4) por PCR em pacientes com infecção por dengue em Minas Gerais, 2011-2020.	
Figura 8	50
	Detecção sorotipos de dengue por RT-PCR no líquido de crianças internadas no Hospital Infantil João Paulo II por ano. (Março 2014-Julho 2019).	
Figura 9	51
	Mapa da distribuição sorotipos de dengue em Minas Gerais, 2019-2020.	

Figura 10	66
	Histograma do tempo até resolução das complicações neurológicas pós alta hospitalar em crianças com RT-PCR de líquido positivo para DENV, ZIKV e YFV, Hospital Infantil João Paulo II. (Março 2014-Julho 2019)	
Figura 11	67
	Tempo em meses até resolução das complicações neurológicas pós alta hospitalar em crianças com RT-PCR de líquido positivo para DENV, ZIKV e YFV, Hospital Infantil João Paulo II. (Março 2014-Julho 2019)	

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	43
	Distribuição por faixa etária, sexo e local de moradia das crianças com manifestações neurológicas e DENV, ZIKV ou YFV detectado por RT-PCR em líquido, Hospital Infantil João Paulo II (Março 2014-Julho 2019).	
Tabela 2	43
	Número de crianças notificadas por ano com infecções por flavivírus no Hospital Infantil João Paulo II (Março 2014- Julho 2019)	
Tabela 3	45
	Incidência de crianças e adolescentes com manifestações neurológicas diagnosticadas com DENV, ZIKV ou YFV por RT-PCR no líquido, Hospital Infantil João Paulo II (Março 2014- Julho 2019)	
Tabela 4	48
	Sintomas clínicos e exames laboratoriais das crianças com manifestações neurológicas diagnosticadas por RT-PCR em líquido com DENV, ZIKV e YFV (Março 2014- Julho 2019)	
Tabela 5	54
	Manifestações neurológicas em crianças nas quais DENV, ZIKV ou YFV foi detectado em líquido por RT-PCR.	
Tabela 6	57
	Análise univariada de fatores preditores para óbito, complicações neurológicas à alta, uso de medicação anticrise pós alta hospitalar, sintomas motores, insônia ou cefaleia persistentes pós alta em crianças com DENV, ZIKV ou YFV detectados em líquido, Hospital Infantil João Paulo II. (Março 2014-Julho 2019)	
Tabela 7	58
	Fatores preditivos para complicações neurológicas pós alta hospitalar em crianças com RT-PCR de líquido positivo para DENV, ZIKV ou YFV, Hospital Infantil João Paulo II. (Março 2014-Julho 2019)	
Tabela 8	58
	Fatores preditivos para uso de medicação anticrise pós alta hospitalar em crianças com RT-PCR de líquido positivo para DENV-1, DENV-2, DENV-3, DENV-4, para os diferentes sorotipos de DENV, ZIKV ou YFV, Hospital Infantil João Paulo II. (Março 2014-Julho 2019)	

Tabela 9	60
	Fatores preditivos para complicações motoras pós alta hospitalar em crianças com RT-PCR de líquido positivo para DENV, ZIKV ou YFV, Hospital Infantil João Paulo II. (Março 2014-Julho 2019)	
Tabela 10	62
	Prevalência das manifestações neurológicas em crianças nas quais os diferentes sorotipos de DENV foram detectados em líquido por RT-PCR, Hospital Infantil João Paulo II. (Março 2014-Julho 2019).	
Tabela 11	63
	Análise univariada de fatores preditores para complicações neurológicas à alta, uso de medicação anticrise pós alta hospitalar, sintomas motores, insônia ou cefaleias persistentes pós alta em crianças com DENV detectado em líquido, Hospital Infantil João Paulo II. (Março 2014-Julho 2019)	
Tabela 12	64
	Fatores preditivos para complicações neurológicas à alta hospitalar em crianças com RT-PCR de líquido positivo para DENV, Hospital Infantil João Paulo II. (Março 2014-Julho 2019)	
Tabela 13	64
	Fatores preditivos para uso de medicação anticrise pós alta hospitalar em crianças com RT-PCR de líquido positivo para DENV, ZIKV ou YFV, Hospital Infantil João Paulo II. (Março 2014-Julho 2019)	
Tabela 14	65
	Fator preditivo para insônia pós alta hospitalar em crianças com RT-PCR de líquido positivo para os sorotipos de DENV, Hospital Infantil João Paulo II. (Março 2014-Julho 2019)	

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ASQ3: ages and stages questionnaire
AXL: receptor tirosine kinase tipo AXL
DNA: ácido desoxirribonucleico
DENV: dengue vírus
Cas9: associated protein 9
CRISPR: clustered regularly interspaced short palindromic repeats
EEG: eletroencefalograma
ENE: exame neurológico evolutivo
IFNAR: receptor de interferon
IFN- γ : interferon gama
MAC-ELISA: antibody capture enzyme-linked immunosorbent assay.
MER: receptor tirosine kinase tipo MER
NCR: proteínas não codificadoras
NPC: células progenitoras neuronais
NS1: proteína não estrutural 1
PAHO: Pan American Health Organization
p53: proteína 53
PRNT: teste de neutralização em placa
RNA: ácido ribonucleico
SGB: síndrome Guillain-Barré
SNC: sistema nervoso central
SNP: sistema nervoso periférico
SGZ: zona subgranular do hipocampo
SVZ: zona subventricular do prosencéfalo anterior
TAM: receptor tirosine kinase TAM family
TLR3: receptor toll-like 3
TYRO3: receptor tyrosine kinase
TIM: mucin domain
YFV: yellow fever virus
ZIKV: Zika vírus

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	16
1.1	Epidemiologia e manifestações clínicas	17
1.2	Manifestações neurológicas	21
1.3	Neuropatogênese	22
1.4	Diagnóstico	26
1.5	Tratamento e prevenção.....	27
2.	JUSTIFICATIVA.....	28
3.	OBJETIVOS.....	29
3.1	Gerais.....	29
3.2	Específicos.....	29
4.	MÉTODOS.....	30
4.1	Conceitos clínicos ou definições diagnósticas.....	30
4.2	Delineamento.....	31
4.3	Cenário do Estudo.....	32
4.4	Cálculo Amostral.....	32
4.5	Critérios de Inclusão.....	33
4.6	Critérios de Exclusão.....	33
4.7	Desfechos.....	33
4.8	Variáveis preditoras.....	34
4.9	Coleta e processamento de espécimes clínicos	35
4.9.1	Coleta de amostras clínicas.....	35
4.10	Instrumentos para coleta de informações clínicas.....	35
4.10.1	Questionário Estruturado.....	36
4.11	Metodologia utilizada para realização dos exams de imagem e EEG.....	37
5.	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	38
6.	ASPECTOS ÉTICOS.....	39
7.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	40
7.1	Dados epidemiológicos.....	40
7.2	Sintomas clínicos e exames laboratoriais.....	46
7.3	Manifestações neurológicas em crianças com DENV, ZIKV ou YFV	

	detectado em líquido por PCR	49
7.4	Exames de imagem e eletrocardiograma (EEG) em crianças com manifestações neurológicas por DENV, ZIKV ou YFV.....	55
7.5	Fatores preditores para complicações neurológicas em crianças com DENV, ZIKV ou YFV detectado em líquido.....	56
7.6	Fatores preditores para complicações neurológicas em crianças com DENV-1, DENV-2, DENV-3, DENV-4 detectado em líquido.....	61
7.7	Análise de sobrevivência em crianças com complicações neurológicas por DENV, ZIKV e YFV detectado em líquido.....	65
8.	CONCLUSÃO.....	68
	REFERÊNCIAS.....	70
	APÊNDICES.....	77
	APÊNDICE A.....	77
	<i>Neurological manifestations of pediatric arboviral infections in the Americas</i>	
	APÊNDICE B.....	86
	Questionário estruturado	
	ANEXOS.....	97
	ANEXO A.....	97
	Parecer substanciado do CEP	
	ANEXO B.....	101
	Termo consentimento, livre e esclarecido, dos pais ou responsáveis	
	ANEXO C.....	106
	Termo de assentimento livre e esclarecido	
	ANEXO D.....	107
	Valores de referência para exames laboratoriais	

1. INTRODUÇÃO

Na família *Flaviviridae*, gênero *Flavivirus*, há três vírus de importância epidemiológica crescente nas Américas: Zika vírus (ZIKV), dengue vírus (DENV), e yellow fever virus (YFV) que podem ser transmitidos pelo mosquito *Aedes aegypti* (BECKHAM; TYLER, 2015; PATTERSON; SAMMON; GARG, 2016; VASCONCELOS, 2003). Todo vírus transmitido por um artrópode, como um mosquito, é por definição um arbovírus (BECKHAM; TYLER, 2015)

O *Aedes aegypti* é um vetor urbano altamente eficiente, pois pode picar diversos seres humanos seguidamente, para se alimentar. Além disso, este mosquito se reproduz em pequenas poças de água limpa, encontradas com frequência, em torno das habitações humanas (BECKHAM; TYLER, 2015; PATTERSON; SAMMON; GARG, 2016). A população de mosquitos é maior nos trópicos e varia de acordo com as precipitações pluviais, temperatura, número de predadores naturais, especialmente em locais com baixa qualidade dos serviços de saneamento, limpeza urbana e controle de vetores (REITER, 2007).

No gênero *Flavivirus*, há vários vírus neurotrópicos e neurovirulentos como YFV, ZIKV, DENV, *Japanese encephalitis virus* (JEV), *West Nile virus* (WNV), *Tick-born encephalitis virus* (TBEV) e *Saint Louis encephalitis virus* (SLEV) (BECKHAM; TYLER, 2015). Embora, os mecanismos que possibilitam a invasão do sistema nervoso central (SNC) pelos flavivírus não sejam completamente esclarecidos, há estudos em modelos animais e celulares que demonstram que estes vírus compartilhem de vias neuropatogênicas semelhantes (MUSTAFÁ et al, 2019; MARINHO; KROON, 2019).

No Brasil, país tropical de clima quente e úmido, os flavivírus transmitidos pelo mosquito *Aedes aegypti* como DENV e ZIKV são causas de surtos crescentes, assim como possível reurbanização da febre amarela pela presença do vetor é causa de grande preocupação de saúde pública (PATTERSON; SAMMON; GARG, 2016; VASCONCELOS, 2003).

Diversos estudos reportam aumento de casos de manifestações neurológicas, como meningoencefalites e síndrome Guillain-Barré (SGB) em associação aos surtos destes flavivírus (HORWOOD et al, 2017; LOHITHARAJAH et al, 2017; CAO-LORMEAU et al, 2016; ALHAKIMI et al, 2015). O Manual de Vigilância Sentinela de Doenças Neuroinvasivas por arbovírus do Ministério da Saúde, estabelece como caso confirmado de

arbovirose neuroinvasiva, todo quadro agudo de encefalite, mielite, encefalomielite, polirradiculoneurite ou de outras síndromes neurológicas centrais ou periféricas, em paciente com detecção viral por isolamento ou reação em cadeia de polimerase em sangue, líquido ou outros líquidos corporais (BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017).

Entretanto, este é o primeiro estudo prospectivo que avaliou desfechos à alta hospitalar, sequelas neurológicas à longo prazo e tempo de resolução das complicações pós doenças neuroinvasivas por DENV, ZIKV e YFV em crianças e adolescentes.

1.1 Epidemiologia e manifestações clínicas

O DENV causa uma doença exantemática febril associada a mialgia e cefaleia, na qual pode ocorrer alterações vasculares levando à hemoconcentração e em casos mais graves hipovolemia e manifestações hemorrágicas (SOUZA org., 2016). É causada por quatro sorotipos de DENV geneticamente diferentes (DENV 1–4), sendo uma das arboviroses que mais frequentemente afetam os seres humanos. Estima-se que 3,9 bilhões de pessoas estejam sob risco de infecção e mais de 390 milhões sejam infectadas a cada ano, mas apenas um quarto delas apresentam manifestações clínicas (BHATT et al, 2013).

De acordo com dados do Datasus de morbidade hospitalar do SUS, no Brasil ocorreram dois surtos recentes de dengue com aumento considerável de internações por dengue hemorrágica e choque do dengue em 2015- 2016 e 2018-2019. O número médio de internações passou de 24.650 para 63.247 nos anos das epidemias. Foram internadas por dengue 13.687 crianças e adolescentes menores de 14 anos em 2015, 14.976 em 2016 e 13.191 em 2019 (Figura 1) (DATASUS, 2020).

Os quatro sorotipos de DENV já foram descritos como causadores de manifestações neurológicas como meningoencefalites, SGB e mielites, com relatos mais frequentes associados aos DENV 2 e 3 (SOLBRIG; PERNG, 2015; SALAZAR et al, 2013; FONG et al, 2017; SOARES et al, 2006; OLIVEIRA et al, 2017). Estudos que avaliaram etiologias virais das meningoencefalites em crianças no Camboja, China, Índia e Brasil encontraram uma prevalência de infecção entre 4,6 e 12% (HORWOOD et al, 2017; LOHITHARAJAH et al, 2017; OLIVEIRA et al, 2017).

Ao analisar os dados de morbidade hospitalar do Datasus entre os anos de 2014 e 2019, não ocorreram variações significativas, nos anos de epidemia de dengue, no número de internações por meningites não especificadas, por meningites e encefalites virais, por paralisias flácidas (onde são notificados os pacientes com SGB) e por outras doenças

inflamatórias do SNC em crianças e adolescentes menores de 14 anos como é possível visualizar na figura 1 (DATASUS, 2020).

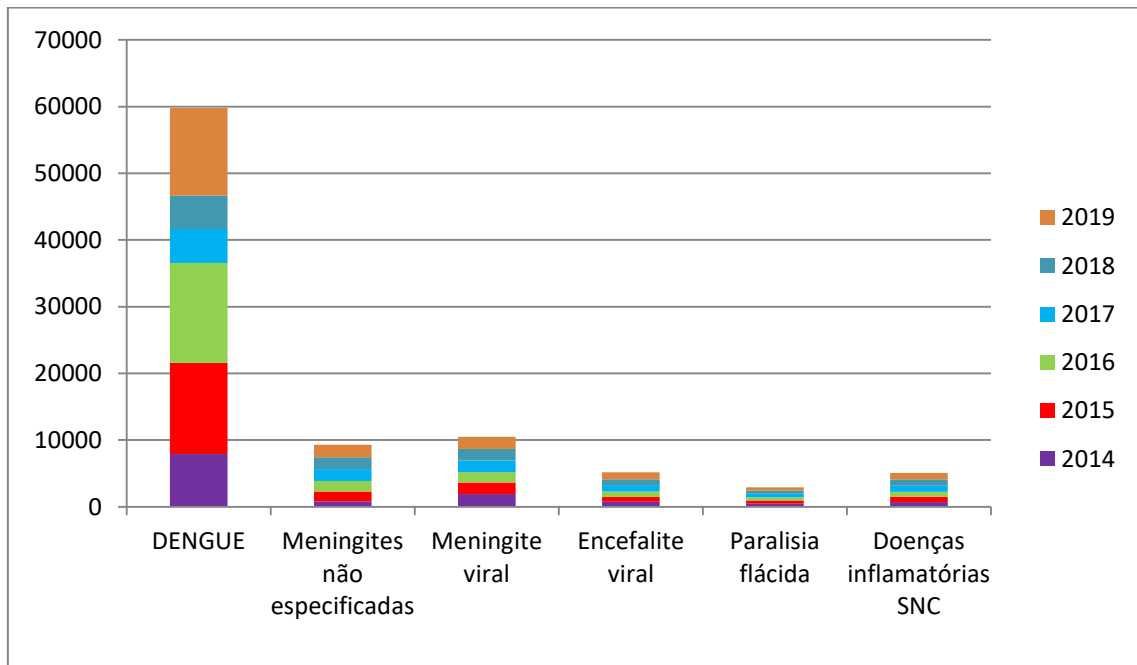


Figura 1: Número de internações hospitalares por dengue, por meningites não especificadas, meningite viral, encefalite viral, paralisia flácida e doenças inflamatórias do SNC entre os anos de 2014 e 2019 para crianças e adolescentes entre 0 e 14 anos. (DATASUS, 2020).

O ZIKV causa, mais frequentemente, uma doença exantemática febril oligossintomática, semelhante ao quadro de dengue branda e por isso pode muitas vezes ser confundida com as infecções por dengue (SOUZA org., 2016). O ZIKV foi, pela primeira vez, identificado em macacos na Uganda em 1947, através de uma rede que monitorava a febre amarela. Em 1952, foi identificado em humanos na Uganda e na República Unida da Tanzânia (DICK; KITCHEN; HADDOW, 1952). Entre os anos 1960 e os anos 1980 foram registrados casos da doença na África, nas Américas, na Ásia e no Pacífico. O primeiro grande surto da doença causado pela infecção por ZIKV foi notificada na ilha de Yap (Estados Federados da Micronésia), em 2007 (DUFFY et al, 2009). Estudos epidemiológicos tem encontrado uma soroprevalência por ZIKV variando entre 6% e 50% de acordo com a população investigada (IOOS et al, 2014).

O ZIKV chegou às Américas, vindo do Pacífico, entre 2013 e 2015. A circulação do vírus no Brasil foi confirmada laboratorialmente em abril de 2015, em amostras de pacientes da Bahia

(ZANLUCA et al, 2015). Em poucos meses, devido à susceptibilidade da população brasileira, 18 estados brasileiros notificaram 440.000 casos de transmissão autóctone do ZIKV no país (HENNESSEY; FISCHER; STAPLES, 2016). A epidemia disseminou-se por diversos países da América Latina e, em 2018, a Organização Pan Americana de Saúde reportou 1.003.509 casos suspeitos ou confirmados de ZIKV em 52 países nas Américas (PAHO, 2018).

Pacientes infectados por ZIKV mais comumente apresentam febre baixa, cefaleia, mialgia, hiperemia conjuntival e exantema micropapular que surge no primeiro dia de febre (SOUZA org., 2016). Estes sintomas duram cerca de 3 a 5 dias e muitos pacientes não procuram atendimento clínico, o que pode levar a subnotificação dos casos (DIDIER MUSSO, 2016). Entretanto, se a infecção ocorre durante a gravidez, pode causar infecção congênita entre 2-26% dos bebês (POMAR et al, 2018). O risco de infecção congênita e gravidade das manifestações clínicas apresentadas depende do período gestacional em que a mãe foi infectada pelo ZIKV (POMAR et al, 2018; MARQUES et al, 2019). A infecção pelo ZIKV também foi associada à SGB, meningoencefalites, mielites, neurite óptica e alterações comportamentais em crianças e adultos . (LANDAIS et al, 2017; XIMENES et al, 2019; BENTES; KROON; ROMANELLI, 2019, MARINHO et al, 2019).

O YFV é causador de uma doença febril com alta letalidade nas formas toxêmicas. O vírus é endêmico em regiões tropicais da África e da América do Sul, e é mantido na natureza pela transmissão entre primatas não humanos e mosquitos, principalmente, pertencentes aos gêneros *Haemagogus* e *Sabethes* (VASCONCELOS, 2003; GARSKE et al, 2017). Os seres humanos são infectados, esporadicamente, quando picados por mosquitos silvestres, que se infectam ao picar um macaco virêmico (febre amarela silvestre), mas, também podem ser hospedeiros virêmicos para transmissão inter-humana pelo mosquito *Aedes aegypti* (febre amarela urbana) (GARSKE et al, 2017; PAULES; FAUCI, 2017).

Apesar da disponibilidade de vacinas para a febre amarela, desde a década de 1940, a transmissão ocorre de forma endêmica em 47 países da África, América Central e América do Sul, onde surtos localizados resultam em 84.000 a 170.000 casos graves e 29.000 a 60.000 mortes por ano, de acordo com a Organização Mundial de Saúde (GARSKE et al, 2017; PAULES; FAUCI, 2017; KRAEMER et al, 2017).

Os últimos surtos reportados pela Organização Mundial de Saúde foram na Nigéria entre 2017 e 2019 com 4189 casos suspeitos, 404 casos confirmados e 12,2% de letalidade. Em Angola e na República Democrática do Congo (2015-2016) com 7334 casos suspeitos notificados, dos

quais 962 casos e 393 óbitos foram confirmados laboratorialmente (GARSKE et al, 2017; PAULES; FAUCI, 2017; KRAEMER et al, 2017).

Em 2016, o YFV reemergiu no extremo leste brasileiro, causando o maior surto de febre amarela silvestre observado nas últimas décadas, envolvendo principalmente os estados de Minas Gerais, Espírito Santo, São Paulo e Rio de Janeiro. De dezembro de 2016 a maio de 2019, 1986 casos de febre amarela silvestre foram confirmados no Brasil, dos quais 603 (30%) evoluíram para óbito. Apenas no Estado de Minas Gerais, neste mesmo período ocorreram 467 casos confirmados com 155 (33%) óbitos (SES-MG, 2018).

As manifestações neurológicas descritas em pacientes infectados por YFV são encefalopatia, encefalite e convulsões (BENTES; KROON; ROMANELLI, 2019; MARINHO et al, 2019; DINIZ et al, 2019).

O West Nile virus (WNV) também foi descoberto na Uganda em 1937 (HERRING et al, 2019). A infecção ocorre principalmente pela picada de mosquitos do gênero *Culex* e aproximadamente 75% das pessoas infectadas são assintomáticas. Os primeiros casos de infecção nas Américas por WNV foram reportados nos EUA em 1999. Nos EUA, entre 1999 e 2015, ocorreram 44 mil casos confirmados ou prováveis de WNV, com cerca de 20mil casos de doença neuroinvasiva (SEJVAR et al, 2015; HERRING et al, 2019). Do total de casos de doenças neuroinvasivas por West Nile (WNND) que ocorrem nos EUA, apenas 4% são na faixa etária pediátrica. A incidência anual de WNND é de 0,68 casos por 1 milhão de crianças nos EUA. As manifestações neurológicas mais descritas após infecção pelo WNV são meningite, encefalite e paralisia flácida aguda (PATEL et al, 2015; SEJVAR et al, 2015; HERRING et al, 2019).

Estudos que avaliaram fatores preditivos de risco, em pacientes infectados por WNV, detectaram que idade acima de 50 anos, imunossupressão, quimioterapia, cardiopatia, hipertensão e diabetes, foram associados à maior risco de morte e doença neuroinvasiva (PATEL et al, 2015).

1.2 Manifestações neurológicas

Há poucos estudos sobre as complicações neurológicas e prognósticos clínicos das infecções por DENV, ZIKV ou YFV no SNC, na população pediátrica (SOLBRIG; PERNG, 2015; XIMENES et al, 2019; BENTES; KROON; ROMANELLI, 2019). Inicialmente, para melhor compreensão das manifestações neurológicas em crianças, causadas pelos arbovírus de interesse foi feita ampla busca da literatura, que resultou em uma revisão já publicada (APÊNDICE A). No entanto, a maioria dos estudos inclui população adulta (ALHAKIMI et al, 2015; CAO-LORMEAU et al, 2016; LOHITHARAJAH et al, 2017).

Desde 1976 tem sido descritos quadros de encefalopatia como complicações de dengue grave (SANGUANSERMRI; PONEPRASERT; PHORNPHURKEL, 1976) . Entretanto, alguns estudos recentes tem descrito meningites, encefalites, crises convulsivas como manifestações neurológicas da infecção pelo DENV em pacientes sem sintomas de dengue (SOLBRIG; PERNG, 2015; LOHITHARAJAH et al, 2017; HORWOOD et al, 2017).

MURTHY et al (2010), SOLBRIG e PERNG (2015) propuseram uma classificação para as complicações neurológicas causadas pelo DENV baseado em três mecanismos de neuropatogênese: (1) invasão do sistema nervoso central (SNC) e periférico (SNP) levando a meningites, encefalites, mielites e paresias; (2) distúrbios metabólicos e vasculares levando a encefalopatia, vasculites e sangramentos no SNC e (3) síndromes imuno-mediadas pós dengue que incluem encefalite aguda disseminada (ADEM), neuromielite óptica, neurites, mielites e Guillain-Barré.

A síndrome congênita do Zika vírus é caracterizada por microcefalia grave, calcificações subcorticais, hipoplasia cerebelar, contraturas congênitas, artrogripose e alterações retinianas (POMAR et al, 2018; MARQUES et al, 2019). Perda fetal ocorre em 5-14% das gestações com infecção comprovada por ZIKV (POMAR et al, 2018; MARQUES et al, 2019). No entanto, existem poucos relatos de casos de manifestações neurológicas pelo ZIKV adquirida entre crianças (BENTES; KROON; ROMANELLI, 2019).

Manifestações neurológicas reportadas em crianças após infecção por ZIKV fora do período neonatal são: hemiparesia, mielite, encefalite associada à mielorradiculite, Guillain-Barré, infarto cortical a alterações de comportamento. A análise do líquido evidenciou pleocitose com proteínas e glicose normais em 3 dos 5 casos reportados na literatura até o momento (LANDAIS et al, 2017; RABONI et al, 2017; ZUCKER et al., 2017; MARINHO et al, 2019).

Foram encontrados apenas 4 estudos que incluíram crianças e relataram complicações neurológicas pelo vírus selvagem da febre amarela (JONES; WILSON, 1972; ALHAKIMI et al, 2015; MARINHO et al, 2019; DINIZ et al, 2019).

Em 1969, durante um surto de febre amarela na Nigéria foram avaliados 103 pacientes, destes 14 tinham menos de 19 anos. Sinais de envolvimento do SNC foram descritos em 25% dos pacientes durante a epidemia, 8 dos quais apresentaram crises convulsivas generalizadas (JONES; WILSON, 1972).

Estudo descritivo, transversal e multicêntrico conduzido no Sudão durante o surto de 2012-2013 avaliou 844 pacientes internados e notificados como suspeitos de febre amarela, entre eles 181 pacientes menores de 15 anos. Este estudo não discrimina os desfechos por faixa etária, mas descreve que 15,6% do total de pacientes apresentaram convulsões (ALHAKIMI et al, 2015).

No surto de febre amarela no Brasil, entre 2016 e 2019, foram reportados 2 casos bem documentados de infecção pelo vírus silvestre (MARINHO et al, 2019, DINIZ et al, 2019). Uma infecção perinatal em um bebê de 6 dias, filho de mãe não imunizada com infecção grave por febre amarela. Este bebê evoluiu com icterícia, instabilidade hemodinâmica, encefalopatia, crises convulsivas e evoluiu para óbito em poucos dias. Foi diagnosticado por RT-PCR em soro (DINIZ et al, 2019). E uma criança de 3 anos de idade, que foi internada em centro de terapia intensiva devido quadro agudo de crises convulsivas persistentes que evoluíram com instabilidade hemodinâmica, rebaixamento do sensório (Glasgow 3) e morte encefálica após seis dias hospitalização apesar do adequado suporte clínico. O diagnóstico desta paciente foi realizado em líquido por RT-PCR, com extração do DNA, e análise filogenética confirmou YFV selvagem com sequência de pares nitrogenadas diferente do vírus vacinal (MARINHO et al, 2019).

1.3 Neuropatogênese

Os flavivírus podem invadir o sistema nervoso por diferentes mecanismos, que incluem transporte axonal do sistema nervoso periférico (SNP), via hematogênica, via sistema linfático dural, por infecção de células endoteliais da barreira hematoencefálica e através de leucócitos e monócitos de sangue periféricos infectados (PUCCIONI-SOHLER et al, 2009; LIANG et al, 2016; LI H et al, 2016; TANG et al, 2016; ZHANG et al, 2016; MUSTAFÁ et al, 2019).

LOUVEAU et al (2016), utilizando antígenos marcados específicos para células de vasos linfáticos e linfócitos T, conseguiram comprovar a presença de um sistema linfático dural no SNC em camundongos. ASPELUND et al (2015), utilizando camundongos knock-out para expressão de vasos linfáticos demonstrou como este sistema é importante para drenagem de macromoléculas do SNC. É possível que o sistema linfático no SNC seja uma importante via para entrada de linfócitos infectados com vírus, especialmente flavivírus que multiplicam e concentram-se em linfonodos.

A barreira hematoencefálica é composta por uma fina camada de células endoteliais cerebrais microvasculares, justapostas, associadas à astrócitos e células da micróglia que atuam regulando o fluxo de solutos, células e patógenos entre o sangue e o parênquima cerebral. A infecção pelos flavivírus dos astrócitos e das células endoteliais da barreira resultam em morte celular, produção de citocinas como IL-6 e TNF-alfa que atraem leucócitos. A inflamação leva à diminuição da expressão e organização de proteínas de junções deste endotélio, afetando a integridade da barreira, permitindo a entrada dos flavivírus no SNC (MUSTAFÁ et al 2019; MARINHO & KROON, 2019).

O DENV infecta, principalmente, monócitos e macrófagos. Estas células podem infiltrar o sistema nervoso carregando o vírus (PUCCIONI-SOHLER et al, 2009). Já foi demonstrado em culturas de células que os neurônios humanos são permissivos à infecção pelo DENV e são capazes de manter a multiplicação viral ativa (LIANG et al, 2016). A detecção de RNA ou antígeno viral no SNC, associado à pleocitose líquórica, infiltrado celular inflamatório e síntese intratecal de anticorpos específicos, confirmam a invasão ativa do DENV no SNC (PUCCIONI-SOHLER et al, 2009, SOLBRIG; PERNG, 2015).

O ZIKV penetra nas células hospedeiras, após interação entre glicoproteínas do envelope viral com receptores de superfície celular. Receptores de tirosina quinase da família TAM (TYRO3, AXL, MER), imunoglobulina de células T, receptores lecitina tipo-C, receptores de fosfatidilserinas e proteínas do domínio mucina (TIM) já foram descritos como facilitadores de penetração do ZIKV nas células humanas (LI H et al, 2016; LIANG et al, 2016).

Estudos realizados em camundongos, após administração intravenosa do ZIKV observaram infecção no SNC semelhantes à meningoencefalite em pacientes. Nesses experimentos, o ZIKV foi identificado, principalmente, em células tronco-neuronais, onde persiste a neurogênese no cérebro adulto: a zona subventricular (SVZ) do prosencéfalo anterior e zona subgranular (SGZ) do hipocampo. Foi observada redução da proliferação e morte nestes

nichos de células-tronco, demonstrando que não apenas as células neuronais embrionárias são susceptíveis à infecção pelo ZIKV (TANG et al, 2016; ZHANG et al, 2016).

O mecanismo através do qual o YFV rompe a barreira hematoencefálica e invade o SNC ainda é incerto (LIU; CHAMBERS, 2001; MARINHO; KROON, 2019). A neurovirulência do YFV tem sido investigada inoculando amostras neurotrópicas do vírus em camundongos, e o dano cerebral só foi observado quando altas doses de vírus foram inoculados diretamente no SNC, em camundongos adultos⁵¹. Liu et al. demonstraram, que camundongos deficientes em receptores de interferon (IFNAR^{-/-}, IFNLR^{-/-}), são altamente susceptíveis à infecção pelo YFV no SNC⁵¹. Estes camundongos knockout, infectados pelo YFV, evoluíram com infecção sistêmica grave e aumento da carga viral no SNC. Estes estudos detectaram que diferenças significativas no perfil de ativação de células T e nos níveis séricos de IFN- γ foram importantes para infecção do SNC pelo YFV (LIU; CHAMBERS, 2001, MUSTAFÁ et al, 2019).

A figura 2 abaixo ilustra esquematicamente os mecanismos de invasão dos flavivírus no SNC através da barreira hematoencefálica, já descritos em estudos realizados com modelos animais e celulares (MUSTAFÁ et al, 2019).

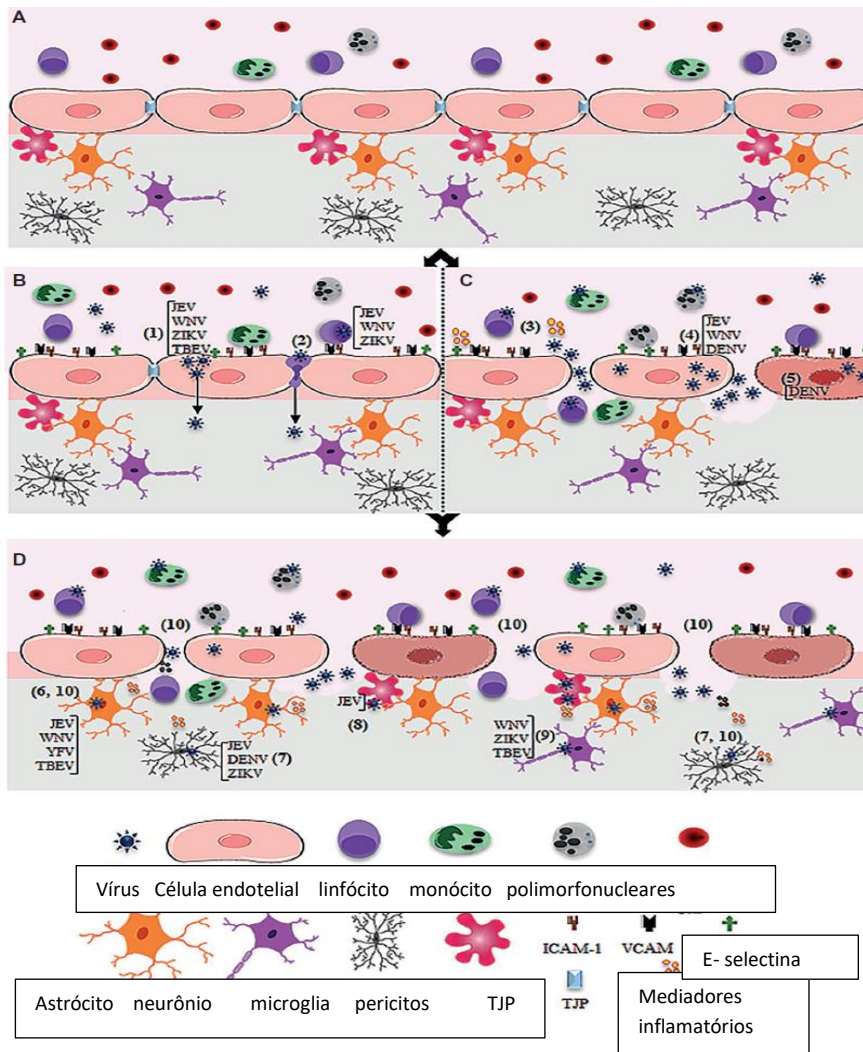


Figura 2: Ilustração esquemática de mecanismos de invasão dos flavivírus no SNC. Adaptado Mustafá et al, 2019.

- Barreira hematoencefálica intacta composta por células endoteliais fortemente aderidas por proteínas de junção (TJP) e associada à astrócitos e microglia.
- Depois de uma infecção sistêmica os flavivírus podem atravessar a barreira por via hematogênica, sem efeitos citopáticos. JEV, WNV, ZIKV e TBEV podem atravessar a barreira como vírus livres, não infectando células (1). JEV, WNV, DENV e ZIKV também podem atravessar a barreira endotelial associados a leucócitos infectados (2).
- Infeção sistêmica e inflamação e/ou infecção direta das células endoteliais pode induzir quebra da barreira por liberação de mediadores inflamatórios que alteram a permeabilidade da barreira (3); por replicação viral dentro das células endoteliais alterando a expressão de proteínas de junção (4); e morte celular (5).
- Após a entrada no SNC por qualquer uma das vias descritas (B e C), os flavivírus podem infectar os astrócitos (como descrito para JEV, WNV, YFV, TBEV) (6), microglia (como descrito para JEV, DENV, ZIKV) (7), pericitos (como descrito para JEV) (8) e neurônios (como descrito para DENV, WNV, ZIKV, TBEV) (9). A infecção dessas células, principalmente astrócitos e microglia, induz liberação de mediadores inflamatórios (IL-6, VEGF, TNF- α , IFN- γ , IL-1 β e IL-10, MCP-1) e metaloproteinasas (MMP2, MMP3, MM9) (10), que levam a regulação negativa de proteínas de adesão e junção (TJP), resultando em aumento da permeabilidade amplificando a invasão viral.

1.4 Diagnóstico

O Manual de Vigilância Sentinela de Doenças Neuroinvasivas por Arbovírus do Ministério da Saúde (BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017) define como critérios diagnósticos de arbovirose neuroinvasiva:

Caso SUSPEITO: pacientes com quadros agudos de encefalite, encefalomielite, meningite, polirradiculopatia (SGB), ou de outras síndromes neurológicas centrais ou periféricas diagnosticadas por neurologista ou infectologista, na ausência de explicação clínica mais provável.

Caso PROVÁVEL: caso suspeito que apresente anticorpo da classe IgM por metodologia ELISA.

Caso CONFIRMADO: caso suspeito que preencha um ou mais dos critérios: detecção viral por isolamento ou RT-PCR em tecidos, sangue, líquido ou outros líquidos corporais; detecção de aumento de pelo menos quatro vezes nos títulos de anticorpos IgG em amostras pareadas de soro; detecção de IgM (ELISA) no líquido; detecção de soroconversão para IgM (ELISA) entre amostras pareadas de soro ou imuno-histoquímica positiva.

Assim, de acordo com este manual do Ministério da Saúde, o diagnóstico etiológico das manifestações neurológicas, causadas por uma infecção por DENV, ZIKV ou YFV, pode ser confirmado por testes sorológicos: detecção de anticorpos IgM específicos no líquido, aumento de títulos anticorpos IgG ou soroconversão para IgM em amostras pareadas de soro (MS, 2017). Entretanto, todos os flavívirus, DENV, ZIKV e YFV, têm epítomos semelhantes nas proteínas do envelope, o que possibilita a reação cruzada em testes sorológicos (SOARES et al, 2006, SOUZA (org.), 2016).

Estudos que avaliaram a detecção de anticorpos no líquido, secundários à infecção pelo DENV no SNC, observaram uma sensibilidade para detecção de IgM pelo método ELISA de 46% e especificidade entre 95-97%, quando comparados ao padrão ouro de detecção do genoma viral no líquido (SOARES et al, 2016; PUCCIONI-SOHLER et al, 2009).

Estudos realizados com crianças e adolescentes com manifestações neurológicas secundárias à infecção por ZIKV adquirida, o diagnóstico foi realizado por RT-PCR em sangue ou líquido (MÉCHARLES et al, 2016; LANDAIS et al, 2017; FONG et al, 2017; MARINHO et al, 2019). Já os estudos que relataram manifestações neurológicas em pacientes com infecção por

YFV, o diagnóstico ocorreu durante surtos da doença, associado à sintomas clínicos e sorologia IgM (ELISA) ou RT-PCR sérica positiva (JONES; WILSON, 1972; ALHAKIMI et al, 2017; DINIZ et al, 2019).

1.5 Tratamento e prevenção

O tratamento baseia-se em suporte clínico, mas não há terapia antiviral específica para nenhuma destas arboviroses (VASCONCELOS, 2003; BECKHAM; TYLER, 2015; PATTERSON; SAMMON; GARG, 2016).

Como prevenção por imunização, apenas a vacina contra o vírus da febre amarela, disponível desde 1939, tem eficácia de 92-95%, protegendo contra esta infecção (STAPLES; BOCCHINI; LORRY RUBBIN, 2015).

A vacina contra o DENV atualmente disponível comercialmente, apresenta uma efetividade baixa em torno de 60%, com maior efetividade para formas graves na infecção secundária: 83,7% vs. 43,2% (VILLAR et al, 2015). Estudo de fase 3, em crianças menores de 9 anos, detectou um maior risco de internação por dengue grave nas crianças vacinadas, do que no grupo controle (RR=7,45; IC95% 1,15-313,8) e por isso a OMS tem recomendado a vacinação apenas em pacientes com infecção prévia por dengue (VILLAR et al, 2015; WICHMANN et al, 2017).

Há algumas vacinas, em fase pré-clínica, em desenvolvimento anti-ZIKV e a perspectiva é que, no futuro, manifestações graves causadas por este arbovírus sejam imunopreveníveis (SHAN et al, 2017) .

Medidas preventivas ambientais importantes devem ser realizadas por programas de saúde pública para controle do vetor para todas as arboviroses. Redução do desmatamento associada à maior preservação ambiental são medidas necessárias para controle biológico dos vetores pelos predadores naturais . Saneamento básico, coleta regular do lixo, limpeza de lotes vagos, disponibilização de água potável para todas as famílias são políticas essenciais para eliminar reservatórios de águas paradas, que são os criadouros de reprodução do *Aedes aegypti* (HOTEZ, 2016; ALI et al, 2017; WEAVER et al, 2017).

Por fim, dedetização de ruas, casas, utilização de larvicidas e cortinados em berços e camas, impregnados de repelentes, são medidas emergenciais de enfretamento de surtos, mas que auxiliam a reduzir a população de vetores, e assim, a transmissão das arboviroses (HOTEZ, 2016; ALI et al, 2017; WEAVER et al, 2017).

2. JUSTIFICATIVA

De acordo com os dados de morbidade do Datasus, entre 2014 e 2019, foram internadas 9.316 crianças e adolescentes menores de 14 anos com meningites não especificada, 10.489 com meningite viral, 5.160 com encefalite viral, 2.898 com paralisias flácidas e 5.074 com doenças inflamatórias do SNC sem diagnóstico etiológico definido (DATASUS, 2020).

Diversos estudos que avaliaram as etiologias das meningoencefalites virais no Brasil e no mundo detectaram aumento da incidência de manifestações neurológicas associadas ao aumento da incidência de dengue, Zika e febre amarela (ALHAKIMI et al, 2015; DIDIER MUSSO, 2016; HORWOOD et al, 2016; LOHITHARAJAH et al, 2017) . Entretanto, os dados, disponíveis no Datasus, extraídos dos diagnósticos realizados por médicos, nas internações hospitalares, não mostram a mesma associação (DATASUS, 2020). Isto ocorre porque, na maioria dos hospitais do Sistema Único de Saúde no Brasil, não é possível realizar o diagnóstico etiológico das manifestações neurológicas apresentadas pelos pacientes. Muitas vezes, ainda, os profissionais de saúde desconhecem as manifestações neurológicas como possíveis apresentações clínicas dos flavivírus.

Assim, uma das principais motivações para realização deste estudo foi enfatizar a importância do diagnóstico etiológico das diversas manifestações neurológicas apresentadas pelas crianças e adolescentes e visar melhorar a qualidade dos dados da Vigilância Epidemiológica no país. Também pretende ampliar o conhecimento dos gestores do SUS, dos pesquisadores, e todos que realizam assistência à saúde, em relação à caracterização das manifestações neurológicas e fatores preditivos para complicações, para melhor abordagem clínica, prevenção de sequelas e promoção de saúde.

Este foi o primeiro estudo prospectivo, com o objetivo de caracterizar em crianças as manifestações neurológicas aguda pelos flavivírus de maior incidência no país quanto à apresentação clínica e desfechos neurológicos associados à infecção imediata, e durante seguimento clínico, realizado em grande hospital pediátrico, referência no Estado de Minas Gerais para doenças infecto contagiosas.

3. OBJETIVOS

3.1 Gerais:

O presente estudo tem como objetivo caracterizar as manifestações neurológicas em crianças e adolescentes menores de 14 anos, com doença neuroinvasiva confirmada, por DENV, ZIKV ou YFV, quanto à apresentação clínica e seus desfechos neurológicos à alta hospitalar e durante seguimento ambulatorial, assim como identificar fatores de risco associados à complicações neurológicas e o tempo para resolução das complicações.

3.2 Específicos:

- Detectar por RT-PCR ou PCR o agente infeccioso em líquido de crianças e adolescentes com manifestações neurológicas e suspeita de infecção do SNC.
- Avaliar associação entre o vírus detectado no líquido às manifestações apresentadas pelos pacientes, durante a internação hospitalar e seguimento ambulatorial.
- Identificar fatores preditivos de risco associados à complicações da doença.
- Avaliar o tempo de resolução das complicações neurológicas presentes à alta hospitalar e que persistem em acompanhamento ambulatorial.
- Comparar tempo de resolução das sequelas entre DENV, ZIKV e YFV.

4. MÉTODOS

4.1 Conceitos clínicos ou definições diagnósticas

Todas as manifestações neurológicas avaliadas neste estudo seguiram critérios clínicos bem definidos que serão descritos à seguir.

Meningite é por definição uma inflamação das meninges, membranas que revestem e protegem o SNC, e classicamente, cursa com sintomas meníngeos como rigidez de nuca (SWANSON, 2015). Encefalite é definida como uma disfunção neurológica causada por inflamação aguda ou subaguda do encéfalo (MESSACAR et al, 2018). Quando ocorre uma inflamação simultânea do parênquima cerebral e das meninges, denominamos meningoencefalite (VENKATESAN et al, 2013). São mais comumente causadas por agentes infecciosos como vírus, fungos, protozoários e bactérias, mas também podem ser imunomediadas como na encefalite autoimune (SWANSON, 2015). As crianças com encefalites e/ou meningites virais podem evoluir com recuperação clínica completa, complicações neurológicas graves e até morte (VENKATESAN et al, 2013, SWANSON, 2015).

O Consórcio Internacional de Encefalite de 2013 definiu que o termo encefalite deve ser usado quando um paciente apresenta alteração do nível de consciência, ao menos por 24 horas, associado com no mínimo dois dos seguintes critérios: febre nas últimas 72 horas, convulsão, sinais neurológicos focais, pleocitose cerebral (número de células no líquido maior ou igual a 5), alteração de exame de imagem cerebral ou eletroencefalograma compatível com encefalite (VENKATESAN et al, 2013). Se o paciente apresentar dois dos critérios acima tem diagnóstico possível, três ou mais, diagnóstico provável. O diagnóstico de encefalite é confirmado se houver biópsia cerebral demonstrando inflamação ou evidência de infecção no SNC por um microorganismo causador de encefalite ou evidência laboratorial de uma doença autoimune (VENKATESAN et al, 2013).

Encefalopatia é um termo semiológico que indica uma disfunção cerebral, caracterizada por alteração do nível de consciência por pelo menos 24 horas, causada por uma injúria direta ao SNC, quando não há outros critérios para encefalite (MESSACAR et al, 2018).

Crises epiléticas se aplica ao evento neurofisiológico, causado por uma descarga excessiva ou hipsincrônica dos neurônios cerebrais (STAFSTROM; CARMANT, 2015). Esta atividade cerebral paroxística anormal é usualmente auto limitada, durando de segundos a poucos minutos. Uma crise epilética é definida como sintomática aguda quando provocada

por um evento agudo como intoxicação, febre, infecção, hiponatremia, hipoglicemia (STAFSTROM; CARMANT, 2015).

A encefalomielite aguda disseminada (ADEM) é uma inflamação imuno mediada que causa mais comumente, desmielinização multifocal da substância branca dos hemisférios cerebrais, cerebelo, nervo óptico e medula espinhal (GRAY; GORELICK, 2016). Pode ocorrer secundária à diversas infecções virais, bacterianas, parasitárias, pós vacinas, ou até sem uma causa definida. Pode ocorrer em todas as idades, mas é mais frequente em crianças e adolescentes, com pico de incidência entre cinco e oito anos (GRAY; GORELICK, 2016).

Radiculopatia é quando ocorre inflamação de uma raiz nervosa medular, e polirradiculopatia refere-se ao acometimento de múltiplas raízes nervosas, causando sintomas e sinais neurológicos, como dor, fraqueza muscular e perda sensorial seguindo a distribuição motora e sensitiva dos dermatomos correspondentes (NGUYEN; TAYLOR, 2019). A SGB é uma polirradiculopatia desmielinizante aguda inflamatória, caracterizada por paralisia flácida ascendente, arreflexia e alterações sensoriais (NGUYEN; TAYLOR, 2019).

Mielite viral aguda ocorre por invasão viral do corno anterior da medula, causando fraqueza muscular flácida assimétrica, com reflexos profundos ausentes e diminuídos e perda sensorial, que pode cursar com disfunções esfínterianas (SCOTT et al, 2011) . A ressonância magnética, frequentemente, evidencia hiperintensidade de sinal em T2 no corno anterior da medula espinhal, e a análise líquórica mostra pleocitose moderada (SCOTT et al, 2011). Estas alterações auxiliam a diferenciar da SGB, que cursa com paralisia ascendente simétrica, sem alterações na ressonância, e no líquido ocorre proteinorraquia sem pleocitose (SCOTT et al, 2011; NGUYEN; TAYLOR, 2019).

Doença neuroinvasiva por arbovírus: pacientes com quadros agudos de encefalite, encefalomielite, meningite, polirradiculopatia (SGB), ou de outras síndromes neurológicas centrais ou periféricas diagnosticadas por neurologista ou infectologista, na ausência de explicação clínica mais provável (BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017).

4.2 Delineamento

Trata-se de estudo prospectivo realizado com crianças e adolescentes, menores de 14 anos, internadas com manifestações neurológicas e suspeita de infecção no SNC, no Hospital Infantil João Paulo II, no período entre **março de 2014 e julho de 2019**.

4.3 Cenário do Estudo

O Hospital Infantil João Paulo II é um hospital da Rede FHEMIG, com todos os leitos e atendimentos financiados pelo Sistema Único de Saúde. Trata-se de um hospital, exclusivamente pediátrico, que atende crianças e adolescentes até 14 anos. O Hospital dispõe de atendimento de Urgência e Emergência com Pronto Atendimento, 100 leitos de internação hospitalar e 16 leitos de unidade intensiva. Também disponibiliza, para os pacientes, ampla rede de consultas especializadas no nível ambulatorial de atenção secundária. O hospital é referência do Estado de Minas Gerais em doenças infecto contagiosas, contando com sete enfermarias de isolamento respiratório, para atender pacientes com suspeita de meningite entre outras doenças infecciosas.

Entre 2014 e julho de 2019, somente o Hospital Infantil João Paulo II notificou 2.581 crianças com suspeita de dengue, 126 com suspeita de Zika, 140 por chikungunya, 177 crianças com suspeita de febre amarela e atendeu 505 crianças e adolescentes com manifestações neurológicas nas quais coletou líquido para pesquisa viral. Por estas características, foi o cenário escolhido para realização desta pesquisa.

4.4 Cálculo Amostral

Como há apenas relatos de casos de manifestações neurológicas em crianças pelo ZIKV e YFV, para estes arbovírus, foi realizada inclusão de amostra não probabilística de crianças e adolescentes com manifestações neurológicas e infecção do SNC diagnosticadas por RT-PCR no líquido, entre março de 2014 e julho de 2019.

A amostra para o DENV foi calculada levando-se em consideração à prevalência de manifestações neurológicas causadas pelo dengue, em crianças e adolescentes, reportada em estudos prévios.

Após ampla revisão da literatura foram encontrados sete estudos, que avaliaram conjuntamente 1672 crianças com manifestações neurológicas, nas quais o DENV foi identificado por RT-PCR, isolamento viral ou IgM no líquido em 3,2% dessas crianças (BENTES; KROON; ROMANELLI, 2019).

Assim, utilizando a prevalência de 3,2%, com nível de confiança de 95% e precisão de 5%, a amostra calculada para este estudo foi de 42 pacientes com manifestações neurológicas por

DENV. Foi utilizada a seguinte fórmula para cálculo amostral considerando uma população finita:

$$n = \frac{Z^2 \alpha/2 NP(1-P)}{\varepsilon^2 (N-1) + Z^2 \alpha/2 P(1-P)}$$

4.5 Critérios de inclusão

Foram incluídas no estudo crianças e adolescentes menores de 14 anos, admitidas no Hospital João Paulo II com manifestações neurológicas, que tiveram amostra de líquido coletada durante a internação para pesquisa viral, e que preenchiam os critérios de caso confirmado para doença neuroinvasiva por arbovírus (BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017). Todos os pacientes incluídos neste estudo foram diagnosticados por detecção de RNA viral por RT-PCR em líquido e os responsáveis assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido.

4.6 Critérios de exclusão

Foram excluídos pacientes com infecção congênita, imunossupressão congênita ou adquirida ou pacientes que faziam uso de imunossupressores ou corticoide sistêmico há mais de 15 dias, pacientes com morbidades neurológicas ou psiquiátricas prévias, pacientes portadores de doenças metabólicas, oncológicas, reumatológicas ou renais, cardiopatas ou pneumopatas crônicos. Pacientes com co-infecção bacteriana em SNC, comprovada por cultura ou PCR em líquido também foram excluídos da análise.

4.7 Desfechos

1. Morte decorrente de infecção aguda por DENV, ZIKV ou YFV em pacientes com manifestações neurológicas durante a internação hospitalar.
2. Complicações neurológicas à alta hospitalar ou detectadas no primeiro mês de seguimento ambulatorial:
 - Alta hospitalar com medicação anticrise convulsiva e que fez uso regular por no mínimo 1 mês pós alta.
 - Sequelas motoras persistentes pós alta: paresia, paralisia, fraqueza muscular, dificuldade para deambular, ataxia ou dor neuropática.

- Insônia: quando preenchia os critérios para insônia de acordo com a Classificação Internacional de Distúrbios de Sono (AASM, 2014).
- Cefaleia que iniciou pós quadro infeccioso e que persistiu por no mínimo 1 mês pós alta.

Foi considerado como desfecho com evento composto de complicações neurológicas quando o paciente apresentou um ou mais critérios de complicações neurológicas descritas: alta com medicação anti- crise epiléptica, sequelas motoras, insônia e cefaléia.

4.8 Variáveis preditoras

- Demográficas:

- Idade: em meses
- Sexo: feminino ou masculino

- Clínicas:

- Presença de encefalite definida pelo Consenso Internacional de Encefalite (2013): sim ou não
- Sinais meníngeos em maiores de 1 ano: sim ou não
- Presença de fontanela abaulada em menores de 1 ano: sim ou não
- Presença de crises convulsivas à admissão ou durante a internação hospitalar: sim ou não
- Presença de sinal ou sintoma de acometimento focal do SNC como crise convulsiva focal ou acometimento de par craniano: sim ou não
- Paresia ou paralisia associada à encefalite, encefalomielite aguda disseminada (ADEM) ou mielite viral aguda: sim ou não
- Acometimento sistema nervoso periférico: sim ou não
- Presença de ataxia: sim ou não
- Alteração em eletroencefalograma durante a internação: sim ou não
- Alteração nos exames de imagem do sistema nervoso (ressonância magnética encéfalo ou medula espinhal ou tomografia computadorizada do crânio) durante a internação: sim ou não
- Presença de exantema à admissão ou durante internação hospitalar: sim ou não
- Vacina de febre amarela até 30 dias antes da internação: sim ou não

- Laboratoriais:

- Alteração da celularidade líquórica de acordo com valores de referência por idade: sim ou não
- Alteração de proteína líquórica de acordo com valores de referência por idade: sim ou não

As variáveis demográficas, clínicas e laboratoriais foram avaliadas como preditoras para desfechos neurológicos à alta hospitalar, complicações neurológicas durante seguimento clínico e óbito. Os pacientes foram acompanhados em ambulatório de seguimento clínico pós alta hospitalar, no mínimo por 6 meses na ausência de complicações, ou até resolução completa das sequelas neurológicas, ou final do estudo em março de 2020.

4.9. Coleta e processamento de espécimes clínicos

4.9.1 Coleta de amostras clínicas

Todos os pacientes, incluídos nesta pesquisa, foram diagnosticados por RT-PCR para DENV, ZIKV ou YFV realizados no líquido cefalorraquidiano (LCR). Essas amostras foram analisadas por meio de técnicas de biologia molecular (JU J. et al., 1995; PATEL et al, 2013). O líquido cefalorraquidiano só foi coletado quando a equipe médica assistencial tenha indicado. O líquido foi coletado para pesquisa viral em criotubo e acondicionado, imediatamente após a coleta, em botijão de nitrogênio líquido. Estas amostras foram descongeladas no Laboratório de Vírus do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG onde foi feita extração de RNA e a detecção viral por RT-PCR (JU J et al, 1995; PATEL et al, 2013).

4.10 Instrumento para coleta de informações clínicas

Todas as informações demográficas e clínicas dos pacientes do Hospital Infantil João Paulo II foram obtidas durante a internação hospitalar, em consultas ambulatoriais de seguimento clínico e dos prontuários dos pacientes. O seguimento ambulatorial foi realizado por no mínimo 6 meses pós alta hospitalar na ausência de complicações neurológicas. Todos os pacientes com sequelas neurológicas pós infecção do SNC por flavivírus foram

acompanhados até resolução clínica ou final do estudo em março de 2020 pela médica pesquisadora responsável.

As crianças com qualquer alteração no exame neurológico, detectado durante o acompanhamento ambulatorial, as quais não estivessem em seguimento com a equipe de neurologia pediátrica do Hospital, foram encaminhadas para avaliação e acompanhamento.

4.10.1 Questionário Estruturado

O questionário estruturado para coleta de variáveis foi aplicado durante a internação hospitalar e seguimento clínico. Inicialmente o questionário foi preenchido com algumas informações sociodemográficas como sexo, data de nascimento, cidade de domicílio e habitação em zona urbana ou rural.

Foram anotados a história clínica de morbidades prévias, uso de medicamentos regulares, esquema vacinal completo para idade, vacina de vírus atenuado aplicada até 30 dias antes da internação e a data da vacinação de febre amarela.

Foi feita a identificação de sintomas clínico sugestivos de uma das arboviroses como exantema, hiperemia conjuntival, mialgia, artralgia ou artrite e se houve uso de antibióticos nas 24 horas, que antecederam a punção lombar. Também foi avaliado se os exames laboratoriais da admissão hospitalar apresentavam plaquetopenia, leucopenia, hemoconcentração, alteração do coagulograma, redução da albumina, aumento de transaminases, creatininafosfoquinase (CPK) ou função renal.

As manifestações neurológicas apresentadas pelo paciente que justificaram a punção lombar, o exame do líquido cefalorraquidiano (LCR) e glicemia capilar à punção foram anotados. Os exames de imagem ou EEG durante a internação e alterações nestes exames. Outros parâmetros também foram avaliados e anotados como a presença de outros quadros infecciosos concomitantes como: infecção de vias aéreas superiores, pneumonia, diarreia, hepatomegalia, alteração da função hepática ou renal, lesões de pele como petéquias, púrpuras, prova do laço positiva. As medicações administradas durante a internação: antibióticos, aciclovir ou anticonvulsivantes. As complicações neurológicas imediatas ou tardias. Informações sobre padrão de sono ou alteração do comportamento da criança durante a internação hospitalar e seguimento clínico da criança também foram anotados.

O questionário estruturado utilizado nesta pesquisa encontra-se no APÊNDICE B.

4.11 Metodologia utilizada para realização dos exames de imagem e EEG

Todos os pacientes da coorte que tiveram uma tomografia computadorizada de crânio (TC), realizaram este exame no Hospital João XXIII, que também é um hospital da Rede FHEMIG. Pela proximidade física entre os dois hospitais, eles foram unificados em um grande complexo de urgência em 2020.

O Hospital João XXIII conta com dois aparelhos de tomografia computadorizada de sexta geração ou multislice. Um deles da marca *General Eletric* de 16 canais e outro da marca *Toshiba* de 64 canais. São tomógrafos helicoidais com quatro bancos paralelos de detectores, capazes de obter quatro cortes de TC em uma rotação do tubo de raios X. Uma das vantagens desse método é a velocidade de obtenção de imagens, especialmente quando o movimento do paciente é um fator limitante. Essa obtenção mais rápida de imagens otimiza os exames pediátricos em que são necessários menor tempo de exposição.

Uma segunda vantagem relacionada à velocidade de obtenção de imagens é a capacidade de adquirir um grande número de cortes finos rapidamente. Essa velocidade, por exemplo, torna possível realização de exames com doses menores do contraste exigido; ou com cortes muito finos, de 2 a 3 mm, com um tempo de exame curto.

Todos os exames de ressonância magnética (RNM) realizados nos pacientes da coorte, foram realizados em clínicas de imagem particulares que possuem convênio com a Rede FHEMIG. Os exames foram realizados por médicos radiologistas e acompanhados por médicos anesthesiologistas, porque as crianças necessitam de sedação prolongada para realização destes exames de imagem. Durante os cinco anos da coorte, estes exames foram realizados em clínicas diferentes com aparelhos de marcas diferentes, mas todos eles foram aparelhos com campo magnético de 1,5 tesla.

Os exames de eletroencefalograma foram realizados no Hospital Infantil João Paulo II e laudados por neurofisiologistas. Todos os exames foram realizados no aparelho digital da marca EMSA de 32 canais. Todos os exames foram feitos em vigília e sono espontâneo ou apenas em sono espontâneo.

5. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Foi realizada análise descritiva e comparativa de variáveis clínicas e laboratoriais das crianças, que tiveram o diagnóstico positivo por RT-PCR para DENV, ZIKV ou YFV, comparando variáveis demográficas, clínicas e alterações de exames líquóricos e de imagem cerebral, realizados para os desfechos neurológicos definidos e óbito. Em análise descritiva, as variáveis categóricas foram quantificadas por percentual de frequência e as variáveis contínuas foram descritas pela média, desvio padrão ou mediana, de acordo com a distribuição normal ou não normal, avaliado pelo teste de normalidade Shapiro-Wilk.

Em análise univariada, as variáveis preditoras para desfechos neurológicos e óbito foram comparadas por teste de qui-quadrado ou teste exato de Fischer (se n em uma casela era menor que 5). Em casos de variáveis categóricas; teste t para comparação de duas médias de variáveis contínuas com distribuição normal, Mann Whitney para comparação de variáveis contínuas de distribuição não normal e Kruskal Wallis para comparar médias de variável numérica, de distribuição não normal, para mais de dois grupos.

Posteriormente, as variáveis com $p < 0,20$ em análise univariada foram inseridas em um ajuste multivariado em modelo de regressão logística ou Poisson, para avaliar associação em cada desfecho. A significância estatística da análise multivariada foi considerada quando $p < 0,05$ e o RR com intervalo de confiança de 95%.

Também foi realizado uma curva de sobrevida para avaliar se ocorreu diferença dos tempos de resolução das complicações neurológicas entre os pacientes com dengue, Zika e febre amarela.

6. ASPECTOS ÉTICOS

Este estudo faz parte do Projeto: **“DOENÇAS INFECCIOSAS DE SISTEMA NERVOSO CENTRAL: IDENTIFICAÇÃO DE AGENTES ETIOLÓGICOS E ANÁLISE DE RESPOSTA IMUNE DOS PACIENTES”** que já foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Infantil João Paulo II, Minas Gerais, Brasil, parecer 132/2009.

O projeto está inscrito na Plataforma Brasil sob número 09273012.9.0000.5149.

Todas as crianças que foram incluídas neste estudo tiveram o termo de Consentimento Livre e Esclarecido, assinado por seu responsável. As crianças maiores de sete anos e os adolescentes também assinaram termo de assentimento.

O parecer consubstanciado do CEP encontra-se no ANEXO A.

O termo de Consentimento Livre e Esclarecido encontra-se no ANEXO B.

O termo de Assentimento Livre e Esclarecido encontra-se no ANEXO C.

7. RESULTADOS E DISCUSSÃO

7.1 Dados epidemiológicos

Entre março de 2014 e julho de 2019, foram avaliadas 505 crianças e adolescentes com manifestações neurológicas e suspeita de infecção do sistema nervoso, dos quais foram coletados líquido para pesquisa viral, no Hospital Infantil João Paulo II, da Rede FHEMIG, na cidade de Belo Horizonte.

Neste período, foram detectadas no líquido por RT-PCR, 91 crianças com doença neuroinvasiva por arbovírus (18%): 71 crianças DENV positivas (14%), 14 crianças ZIKV positivas (2,8%) e seis YFV positivas (1,2%). Entretanto, foram excluídas das análises seis crianças com DENV e um lactente com YFV, nas quais também foram detectados bactérias no sangue ou líquido por cultura ou PCR. Foram excluídas seis crianças, nas quais foram detectados no líquido por RT-PCR DENV e duas crianças ZIKV positivas, mas que apresentavam doença neurológica prévias secundários à hiperinsulismo congênito, doença mitocondrial, agenesia de corpo caloso, encefalopatia hipóxico-isquêmica, acidente vascular encefálico e erro inato do metabolismo. Entre os 76 pacientes restantes com DENV, ZIKV ou YFV positivos no líquido, houve perda de 3 crianças durante seguimento clínico (4%).

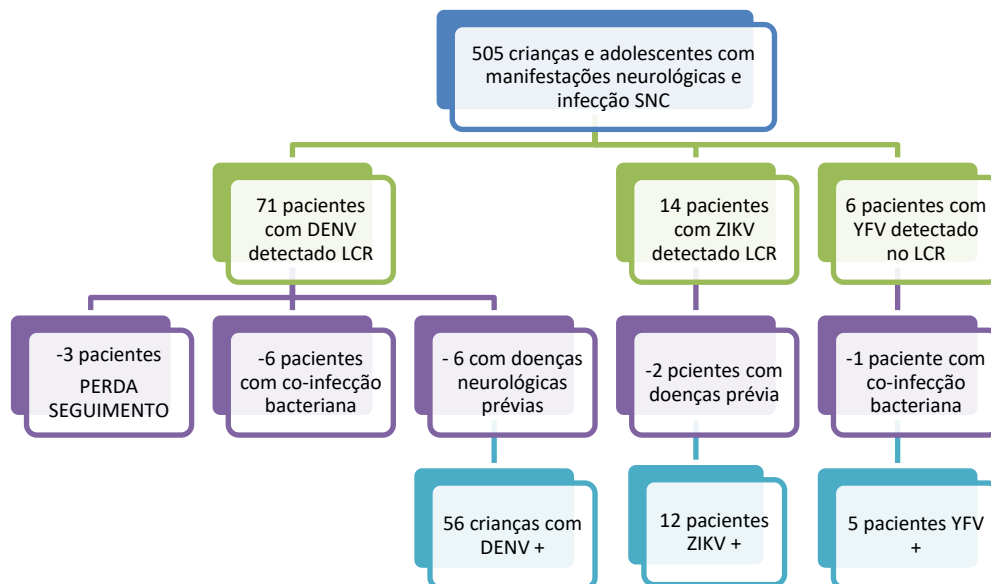


Figura 3: Fluxograma dos pacientes com manifestações neurológicas e DENV, ZIKV ou YFV detectado por RT-PCR em líquido, Hospital Infantil João Paulo II (Março 2014-Julho 2019).

A co-infecção bacteriana do SNC foi considerada um fator confundidor importante por alterar os parâmetros líquóricos e por ser causa bem definida de complicações neurológicas. Embora, seja possível que as infecções por DENV e YFV tenham facilitado a entrada das bactérias no SNC (MARINHO & KROON, 2019).

Os resultados de prevalência das manifestações neurológicas por DENV corroboram os resultados descritos na literatura. Estudos que avaliaram crianças com meningoencefalites no Camboja, China, Índia e Brasil encontraram uma prevalência de infecção por DENV entre 4,6 e 12% (HORWOOD et al, 2017; LOHITHARAJAH et al, 2017; OLIVEIRA et al, 2017; VASANTHAPURAN et al, 2019) . Nesta coorte, 14% das crianças e adolescentes apresentaram doença neuroinvasiva por DENV confirmada. Este é um dado de grande relevância ao avaliarmos pacientes com meningoencefalite viral no Brasil.

Na tabela 1 estão descritos a distribuição por faixa etária, sexo e local de moradia das crianças e adolescentes incluídos neste estudo, nas quais foram detectados por RT-PCR DENV, ZIKV ou YFV. Ocorreu uma maior incidência das manifestações neurológicas em crianças menores de quatro anos, com uma taxa de incidência de detecção de DENV, nesta faixa etária de 84%, de ZIKV de 69% e YFV de 80%. Para os casos de febre amarela a maior incidência nesta faixa etária pode ser explicada em crianças não vacinadas ou que tenham recebido apenas uma dose da vacina. Estudo randomizado, duplo-cego, multicêntrico, que avaliou a imunogenicidade pós dose de vacina de febre amarela, em 1966 crianças, de nove a 23 meses, detectou uma taxa de soroconversão de 82% em lactentes que receberam a vacina antes de um ano de idade (CAMACHO et al, 2015)

Publicações, de manifestações neurológicas em crianças com infecção adquirida por DENV, relatam que as mesmas podem ocorrer associadas à sintomas de dengue, como manifestações primárias ou como sintomas pós infecciosos, imunomediados (SOARES et al, 2006; SOLBRIG; PERNG, 2015; BENTES; KRONN; ROMANELLI, 2019). Os estudos que relatam sintomas neurológicos associados à sintomas de dengue, os pacientes apresentam dengue grave e a maioria dos pacientes tem mais de quatro anos de idade (CAM et al , 2001; SOARES et al, 2006; SIL et al, 2017) . Nestes pacientes as manifestações neurológicas estão com frequência associadas à encefalopatia e hemorragias no SNC (CAM et al, 2001). Já os estudos que avaliam diagnóstico etiológico de meningites e encefalites virais em crianças, os sintomas de dengue grave estão, muitas vezes, ausentes e predominam em pacientes menores de quatro anos, semelhante a esta coorte (MARINHO et al, 2017; HORWOOD et al, 2017; LOHITHARAJAH et al, 2017. Estes estudos sugerem que são diferentes os mecanismos

imunológicos que desencadeiam manifestações neurológicas associadas à infecção primária ou secundária pelo DENV (CAM et al, 2001; SIL et al., 2016; MARINHO et al, 2017).

Entre os pacientes ZIKV positivos, a prevalência de manifestações neurológicas não foi significativamente maior entre crianças menores de quatro anos. Estudos epidemiológicos, realizados em sete países, descrevem aumento da taxa de incidência de Guillain-Barré associados a surtos de ZIKV, principalmente em pacientes adultos (COUNOTTE et al, 2018). Em crianças e adolescentes com infecção adquirida por ZIKV em SNC há relatos de caso de encefalite com mielorradiculopatia (MARINHO et al, 2019), hemiparesia e mielite (MÉCHARLES et al, 2016), SGB (RABONI et al, 2017) e alteração do comportamento (ZUCKER et al, 2017). Os pacientes descritos nestes artigos tinham entre sete e quinze anos. É possível que a suscetibilidade ao ZIKV, ou seja, não ter anticorpos ao vírus, já predisponha à manifestações neurológicas durante a infecção (SOUZA; org., 2016).

Não houve diferença significativa entre os sexos nas crianças nas quais DENV foi detectado em líquido, contudo, a detecção do ZIKV foi maior entre as crianças do sexo masculino, enquanto YFV foi detectado em 80% em pacientes de sexo feminino.

Ocorreu maior detecção de DENV e ZIKV em crianças moradoras de áreas urbanas, enquanto o vírus da febre amarela foi encontrado, predominantemente, em pacientes moradores de áreas rurais.

Tabela 1: Distribuição por faixa etária, sexo e local de moradia das crianças com manifestações neurológicas com DENV, ZIKV ou YFV detectado por RT-PCR em líquido, Hospital Infantil João Paulo II (Março 2014-Julho 2019).

Características demográficas	Número e porcentagem de crianças com manifestações neurológicas diagnosticadas por RT-qPCR no LCR.					
	DENV (56)		ZIKV (12)		YFV (5)	
	N	%	N	%	N	%
Faixa Etária						
< 1mês	1	1,8	0	0	0	0
1m - 3m	8	14,3	2	16,7	1	20
4m – 11 meses	22	39,3	1	8,3	1	20
1ano -4 anos	16	28,6	5	41,7	2	40
> 4 anos	9	16	4	33,3	1	20
Sexo						
Masculino	33	58,9	9	75	1	20
Feminino	23	41,1	3	25	4	80
Local de moradia						
Área urbana	50	89,3	10	83,3	2	40
Área rural	6	10,7	2	16,6	3	60

Neste mesmo período, foram notificadas no Hospital, 2581 crianças, com suspeita de dengue, 126 por Zika e 177 crianças, com suspeita de febre amarela (Tabela 2).

Tabela 2: Número de crianças por ano notificadas com infecções por flavivírus no Hospital Infantil João Paulo II (Março 2014- Julho 2019)

ANO	DENV	ZIKV	YFV
2014	88	0	0
2015	266	1	0
2016	1044	1	0
2017	291	62	45
2018	320	53	125
2019	572	9	7
(Janeiro-Julho)			
TOTAL	2581	126	177

Quando se compara o número de crianças notificadas com infecções adquiridas por flavivírus, por ano no hospital (Tabela 2), com a incidência de detecção por RT-PCR no líquido das crianças dos três flavivírus (Tabela 3) é possível detectar alguns dados relevantes.

Dentre estes, os primeiros casos detectados por RT-PCR no líquido de manifestações neurológicas pelo ZIKV, ocorreram em 2015, com uma taxa de incidência de 4,8% das

amostras analisadas, enquanto neste mesmo ano, apenas um caso de infecção por ZIKV foi notificado no Hospital. Este dado reforça a importância da detecção viral no líquido de pacientes com sintomas neurológicos, como instrumento eficaz de vigilância da circulação de vírus neurotrópicos no país.

Também pode ser observado que, todos os casos de manifestações neurológicas pelo YFV, ocorreram durante os meses de surtos de febre amarela no Estado de Minas Gerais, entre 2016 e 2019, isso reforça a importância do diagnóstico etiológico em pacientes com sintomas neurológicos, durante epidemias de vírus neurotrópicos para qualificar os dados da Vigilância, melhorar o controle dos surtos e abordagem clínica dos pacientes (SES-MG, 2018).

A incidência de manifestações neurológicas por DENV variou de 0-32%, entre os anos do estudo, associados a epidemias de dengue e circulação de sorotipos com maior ou menor neurotropismo.

Quando foram comparadas as taxas de incidência de detecção de DENV em líquido do estudo, com os dados de notificação de dengue do Hospital Infantil João Paulo II, onde os casos foram diagnosticados e com os dados do Datasus (DATASUS, 2020) de internações hospitalares, por dengue no Brasil, foi observado um aumento da taxa média de incidência de manifestações neurológicas por DENV de 3,2% para 17,6% nos anos de epidemias. Estudos que avaliaram diagnóstico etiológico de meningites, encefalites e mielites virais na Índia (VASANTHAPURAN et al, 2019), Sri Lanka (LOHITHARAJAH et al, 2017), Cambodja (HORWOOD et al, 2017) e Brasil (OLIVEIRA et al, 2017; MARINHO et al, 2017) também detectaram um aumento de incidência das manifestações neurológicas associadas aos surtos de dengue. (Tabela 3).

Tabela 3: Incidência de crianças e adolescentes com manifestações neurológicas diagnosticadas com DENV, ZIKV ou YFV por RT-PCR no líquido, Hospital Infantil João Paulo II (Março 2014- Julho 2019)

ANO	Total de amostras analisadas	Incidência detecção viral por RT-PCR em líquido					
		DENV		ZIKV		YFV	
		N	%	N	%	N	%
2014	94	6	6,3	0	0	0	0
2015	42	7	16,6	2	4,8	0	0
2016	41	2	4,8	0	0	0	0
2017	90	0	0	3	3,3	3	3,3
2018	149	27	17,5	6	4	2	1,3
2019	89	30	33,7	3	3,4	1	1,1
(Janeiro-Julho)							
TOTAL	505	71	14	14	2,8	6	1,2

Quando foi avaliada a distribuição sazonal das manifestações neurológicas pelos três flavivírus estudados, observa-se que a incidência de DENV e ZIKV ocorreu o ano todo, mas foi maior nos meses chuvosos. Entretanto, ocorreram casos mesmo nos meses secos do ano, o que possivelmente está relacionado à manutenção de criadouros do *Aedes aegypti*. (Fig.4)

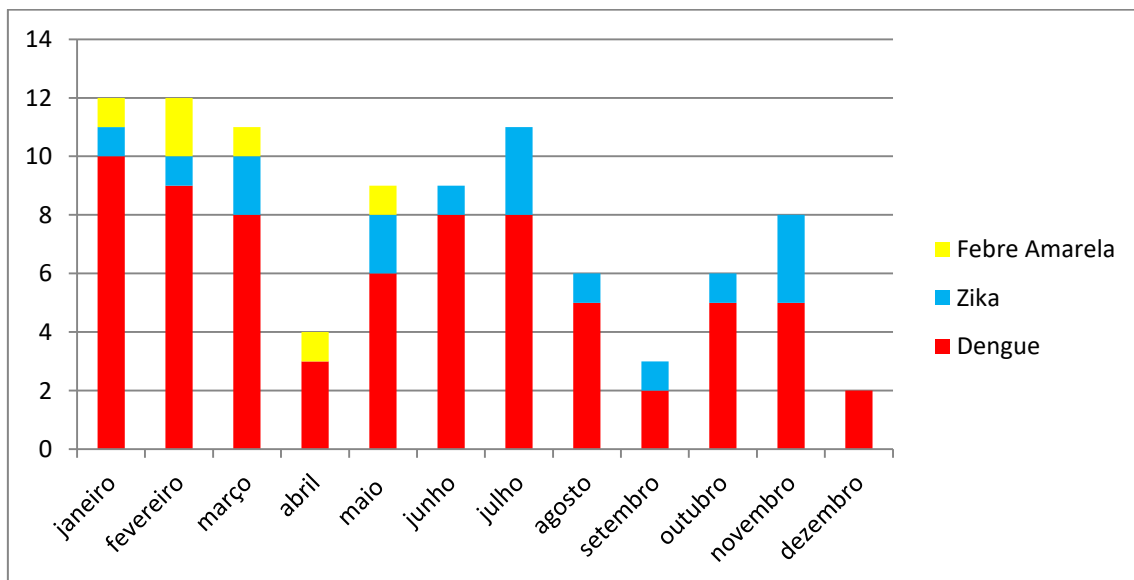


Figura 4: Distribuição mensal dos casos de crianças com manifestações neurológicas e detecção em líquido por RT-PCR de DENV (representado na cor vermelha), ZIKV (em cor azul) e YFV (em cor amarelo) no Hospital Infantil João Paulo II (Março 2014- Julho 2019)

O Hospital Infantil João Paulo II é um hospital 100% financiado pelo Sistema Único de Saúde, e sendo referência de Minas Gerais para doenças infecto contagiosas, recebe crianças e adolescentes, de todo o Estado. Não obstante, a maioria dos pacientes atendidos são de Belo

Horizonte e região metropolitana. Deste modo, o maior número de crianças com manifestações neurológicas, nas quais os flavivírus de interesse foram detectados em líquido, também foram crianças que moravam em Belo Horizonte ou região metropolitana (Figura 5).

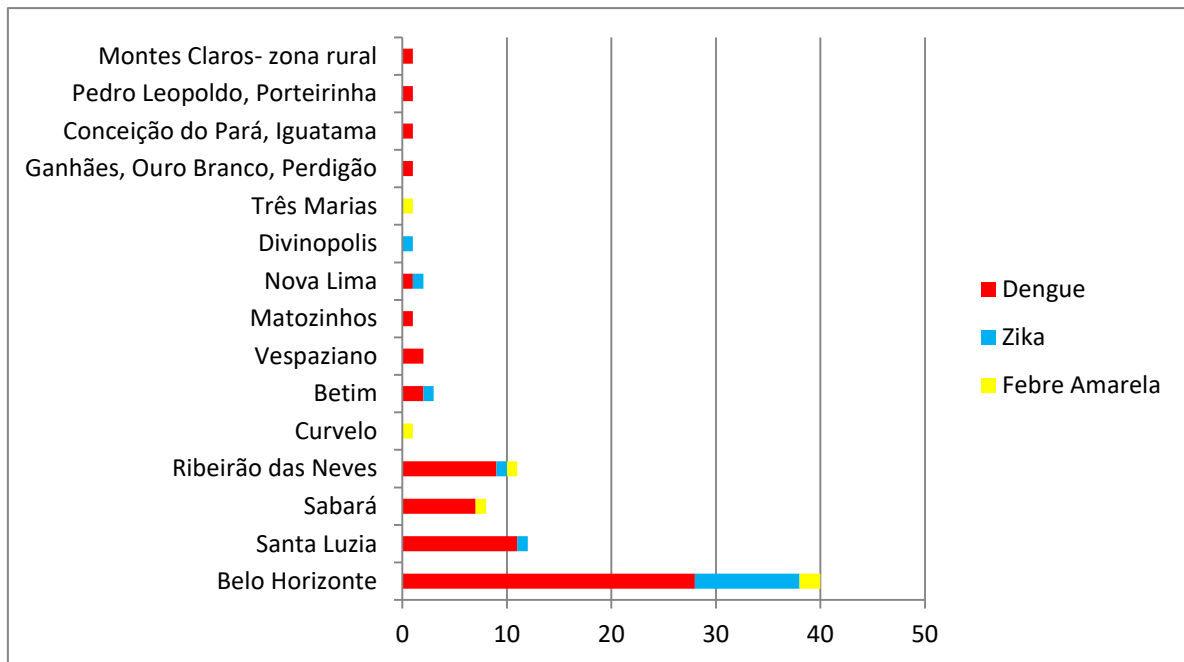


Figura 5: Distribuição espacial pelo local de moradia dos casos de crianças com manifestações neurológicas e detecção em líquido por RT-PCR de DENV (representado na cor vermelha), ZIKV(em cor azul) e YFV (em cor amarelo) no Hospital Infantil João Paulo II (Março 2014- Julho 2019)

7.2 Sintomas clínicos e exames laboratoriais

Entre as 56 crianças e adolescentes, nas quais o DENV foi detectado no líquido, as manifestações clínicas apresentadas foram: 93% febre, 44.6% vômitos, 14.3% exantema e nas 25 crianças maiores de 1 ano que poderiam referir dor, 36% apresentou cefaleia e 16% queixou mialgia ou artralgia. Apenas uma criança apresentou plaquetopenia, 11.5% apresentou leucopenia e nenhuma criança apresentou hematócrito acima do valor de referência para faixa etária (Tabela 4). Ao considerar que os sintomas são muito inespecíficos e as alterações laboratoriais não foram típicas de dengue, entre as 56 crianças avaliadas, a suspeita clínica de dengue foi feita apenas para três delas (MALAVIGE; OGG, 2013; SOUZA org., 2016)

A frequência de manifestações clínicas entre as 12 crianças com manifestações neurológicas e RT-PCR ZIKV positivo no líquido foram: febre (100%), vômitos (50%), exantema (25%) e nas crianças maiores de 1 ano, 56% queixou cefaleia à admissão hospitalar e 22% mialgia ou artralgia (Tabela 4). Ocorreu suspeição clínica de infecção por ZIKV apenas nos pacientes que cursaram com exantema.

Entre as cinco crianças nas quais o YFV foi detectado no líquido, as manifestações clínicas apresentadas foram: febre (80%), cefaleia (33.3%) e vômitos (20%) (Tabela 4). Cerca de 40% das crianças cursaram com alteração das enzimas hepáticas e 20% evoluiu com alteração significativa da função hepática com albumina de 2.0 e atividade de protrombina de 28%. Em 80% das crianças ocorreram manifestações neurológicas graves com necessidade de internação em centro de terapia intensiva (CTI) e 40% evoluíram para óbito. Entretanto, como há poucos relatos de manifestações neurológicas pelo vírus selvagem da febre amarela, o diagnóstico clínico não foi realizado para nenhum dos pacientes, mesmo que todos os casos tenham ocorrido durante o surto de febre amarela no Estado (SES-MG, 2018).

De dezembro de 2016 a maio de 2019, apenas no Estado de Minas Gerais, ocorreram 467 casos confirmados de YFV com 155 (33%) óbitos. Entre os casos confirmados 18 ocorreram na faixa etária pediátrica com 4 óbitos (22%) (SES-MG, 2018).

Estes resultados devem alertar pediatras e neurologistas para maior suspeição clínica de infecção por estes flavivírus em pacientes com doença neuroinvasiva, especialmente durante surtos destas arboviroses.

Quando foram avaliados os resultados da proteína C reativa, à admissão hospitalar destas crianças, como um marcador de resposta inflamatória, o valor médio foi de 36.5mg/dl com mediana de 9 mg/dl para DENV e média de 43 mg/dl com mediana de 17.5 mg/dl para ZIKV. O que reforça a hipótese de que as meningoencefalites virais por DENV e ZIKV apresentam baixa resposta inflamatória. Entretanto, 80% das crianças com manifestações neurológicas por YFV evoluíram de forma grave e necessitaram de internação em CTI. À admissão destas crianças com YFV, a média da proteína C reativa foi de 98 mg/dl com mediana de 41.3 mg/dl. Embora, um valor baixo da proteína C reativa auxilie os médicos à diferenciar infecções virais de bacterianas, este é um exame pouco específico, e alguns pacientes apresentaram valores mais elevados desta proteína inflamatória (SOUZA org., 2016).

O tempo médio entre o início da febre e coleta do exame do líquido, no qual o vírus foi detectado por RT-PCR foi de 3.7 dias para DENV, 2.8 dias para ZIKV e 2.6 dias para YFV. Entretanto, o momento de coleta do líquido variou muito entre as crianças. Houve pacientes que tiveram amostra coletada, no primeiro dia de febre e pacientes com DENV detectado no líquido, no 14º dia de sintoma neurológico, e pacientes com ZIKV detectado por RT-PCR em amostra de LCR coletada, com 11 dias de evolução. Estes resultados sugerem que estes vírus podem persistir no líquido por mais de sete dias.

Tabela 4: Sintomas clínicos e exames laboratoriais das crianças com manifestações neurológicas, diagnosticadas por RT-PCR em líquido, com DENV, ZIKV ou YFV. Hospital Infantil João Paulo II (Março 2014- Julho 2019)

	DENV	ZIKV	YFV	Valor -p*
Febre %	93	100	80	0.325*
Cefaleia %	36	55.5	33	0.571*
Vômitos %	44.6	50	20	0.508*
Mialgia %	16	22	0	0.663*
Exantema %	14.3	25	0	0.399*
Hemoglobina*** (g/dl)	10.8 6,9-13,7	10.5 8,2-14,1	10.3 6,7-11,9	0.412**
Leucócitos*** (/mm3)	13.363 3.410-38.100	10.546 2.950-18.200	9.398 6.800-13.940	0.574**
Plaquetas*** (/mm3)	372.053 84.000-736.000	332.583 203.000-597.000	261.800 80.000-327.000	0.130**
Células LCR*** (/mm3)	87.7 1-1640	54.6 1-490	20.4 1-61	0.289**
Glicose LCR*** (mg/dl)	52.5 38-88	57.2 39-86	73.6 51-117	0.413**
Proteína LCR*** (mg/dl)	42.3 9-237	91.3 9-723	133 22-434	0.019**

*Teste qui-quadrado e **teste Kruskal-Wallis

*** Valor médio, mínimo e máximo

Os valores de referência, por faixa etária, para os exames laboratoriais, encontram-se no ANEXO D.

7.3 Manifestações neurológicas em crianças com DENV, ZIKV ou YFV detectado em líquido por RT-PCR

Entre as 56 crianças com manifestações neurológicas, o DENV-1 foi detectado por RT-PCR no líquido em 16 crianças, o DENV-2 foi detectado no líquido de 12 crianças, o DENV-3 em 18 e o DENV-4 foi detectado no líquido de três crianças. Também foram detectados no líquido por RT-PCR: DENV 1, 2 e 3 em duas crianças; DENV 1 e 3 em três; DENV 1 e 2 em uma, DENV 2 e 3 em uma delas. (Figura 6).

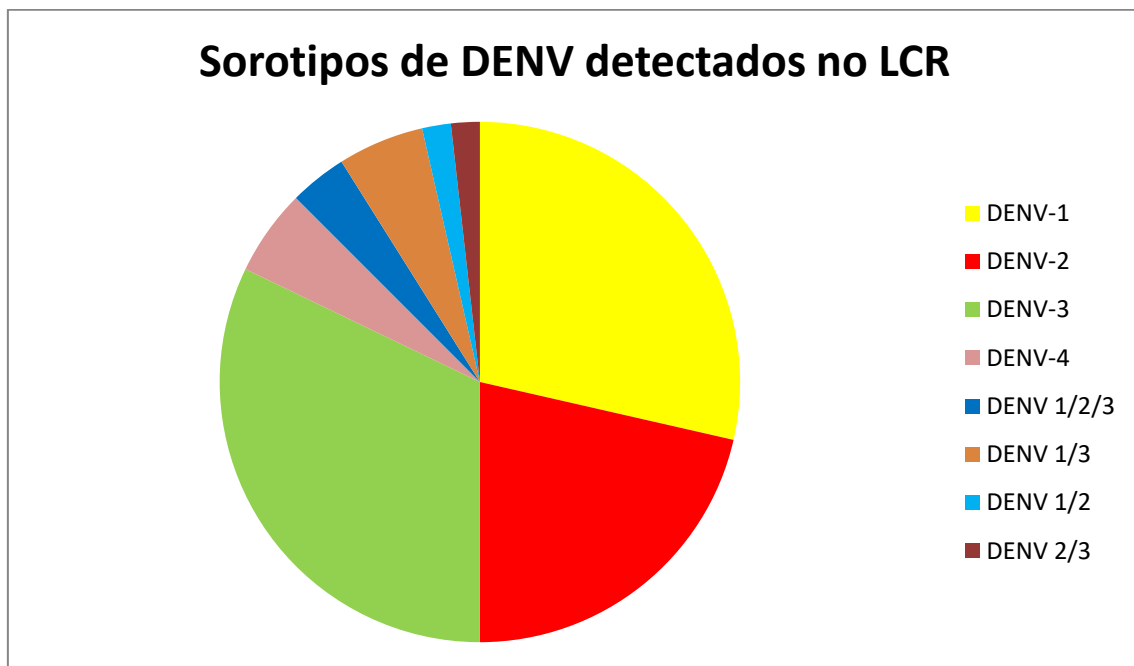
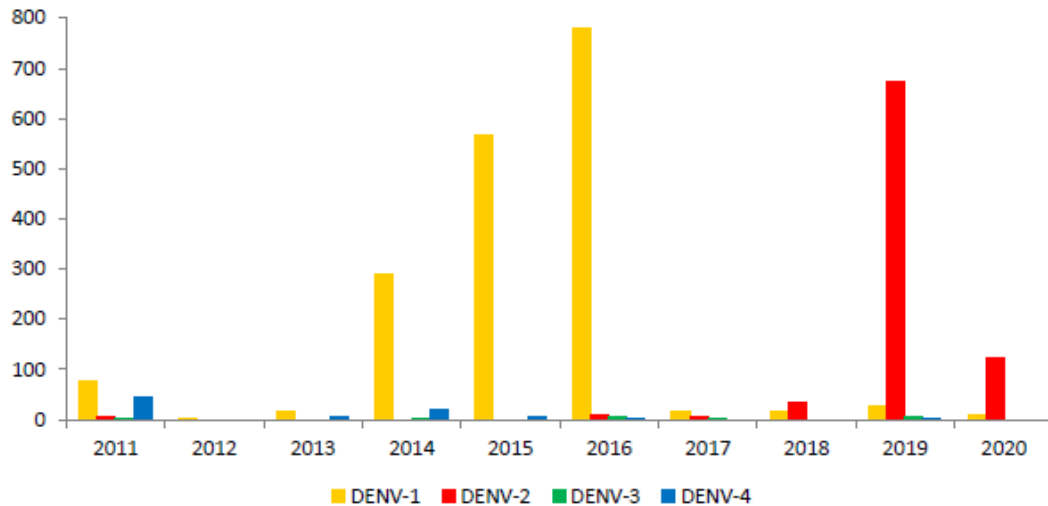


Figura 6: Sorotipos de DENV identificados por RT-PCR no líquido das crianças com manifestações neurológicas entre Março 2014 e Julho 2019.

De acordo com o Boletim Epidemiológico das doenças transmitidas pelo Aedes: dengue, chikungunya e Zika, de Minas Gerais, desde 2011, foram identificados os quatro sorotipos da dengue no estado, com predominância do DENV-1 até 2017 e DENV-2 a partir de 2018 (Figura 7) (SES-MG, 2020). Para a vigilância laboratorial da dengue foram utilizados sorologia para pesquisa de anticorpos (IgM) e biologia molecular (RT-PCR). Em 2019, 3071 amostras foram analisadas por RT-PCR no Estado e os quatro sorotipos de dengue foram identificados, especialmente na região metropolitana de Belo Horizonte, como pode ser visualizado na figura 9 (SES-MG, 2020).

Se compararmos os dados extraídos do Boletim Epidemiológico (SES-MG, 2020) com a detecção dos sorotipos de dengue na nossa coorte, é possível indentificarmos a importância dos sorotipos DENV-2 e DENV-3 desde 2014 em crianças com doenças neuroinvasivas por

dengue (Figura 8). Estes resultados sugerem que mesmo quando estes sorotipos circulam em menor proporção na região, o pouco que circula é capaz de causar doença neuroinvasiva em crianças susceptíveis, o que reforça outros estudos que identificaram os sorotipos DENV-2 e 3 como mais neurovirulentos.



Fonte: GAL/Funed – Acesso em: 18/052020

Figura 7: Detecção dos sorotipos de dengue (DENV 1-4) por PCR em pacientes com suspeita de dengue em Minas Gerais, 2011-2020 (SES-MG, 2020).

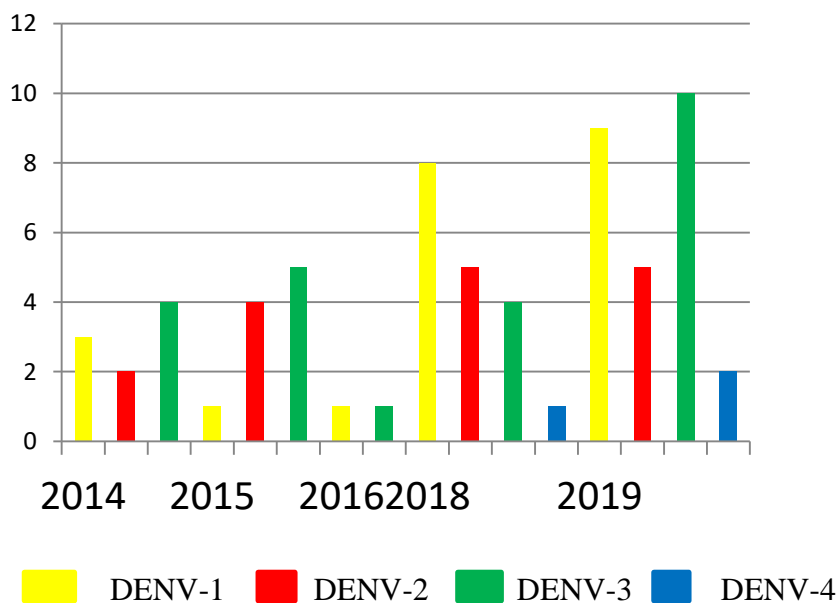
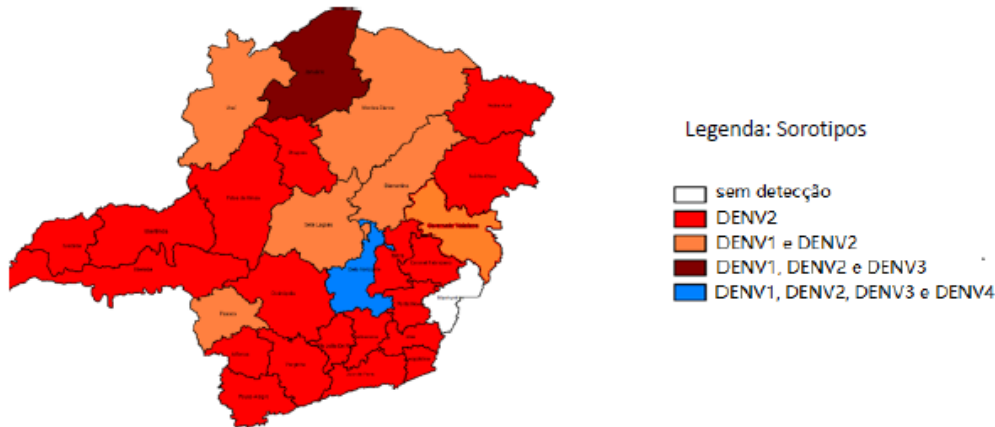


Figura 8: Detecção sorotipos de dengue por RT-PCR no líquido de crianças internadas no Hospital Infantil João Paulo II (Março 2014-Julho 2019)



Fonte: GAL/Funed – Acesso em: 18/05/2020

Figura 9: Mapa da distribuição dos sorotipos de dengue em Minas Gerais, 2019-2020 (SES-MG, 2020).

As manifestações neurológicas apresentadas pelas 56 crianças e adolescentes nas quais DENV foi detectado por RT-PCR em líquido foram: meningite ou abaulamento de fontanela (39.3%), crises convulsivas (34%), encefalite (26.8%), ataxia (8.9%), sinais focais (8.9%), hipertensão intracraniana (3.5%). Paresia, fraqueza muscular ou dificuldade para deambular secundários à meningoencefalite ou encefalomielite aguda disseminada (ADEM) foram detectadas em 9% das crianças, durante a internação. Paresia ou dor neuropática pós radiculite ou polirradiculite foi observado em 5.4%.

Uma criança de 5 anos foi diagnosticada com ADEM, após ser admitida no Hospital com história de 1 semana de febre e exantema, evoluindo com perda de força muscular, hiperreflexia patelar à direita, sinal de Babinsky, incontinência urinária e engasgo ao alimentar-se. A ressonância magnética (RNM) de medula espinhal evidenciou hipersinal em T2 em medula, mielite de C7 a T8 e RNM de encéfalo com hipersinal em T2 em tálamo bilateral e restrição de difusão em substância branca. No líquido coletado foi detectado por RT-PCR o DENV-2.

Na análise do LCR desses pacientes foi evidenciado que, 35.7% não apresentou nenhuma alteração. Em 100% dos casos a glicose no líquido estava dentro dos valores de referência (2/3 da glicemia sérica) e em 69.6%, a proteína líquórica estava dentro dos valores de referência para idade. A celularidade média foi de 87.7 e variou entre 1-1640 células, com predomínio de mononucleares em 87.5% (Tabela 4).

Como alguns pacientes com manifestações neurológicas por DENV evoluíram com crises epilépticas persistentes, 19.6% recebeu alta hospitalar com medicação anticrise. Durante a internação hospitalar, 28.6% recebeu antibióticos por 7 dias ou mais devido a impossibilidade de excluir infecção bacteriana e 9% foi medicado com aciclovir por tempo igual ou maior que 14 dias. Duas crianças foram medicadas com imunoglobulina humana venosa, devido diagnóstico de ADEM e outra por suspeita de SGB (não confirmada em eletroneuromiografia). Uma criança recebeu pulsoterapia com metilprednisolona, devido meningoencefalite grave, com Glasgow 3. Nenhuma das crianças DENV positivas evoluiu para óbito durante a internação hospitalar ou seguimento clínico.

Revisão de literatura dos estudos publicados de crianças e adolescentes com doença neuroinvasiva confirmada por dengue encontrou manifestações neurológicas semelhantes à desta coorte: encefalite (58,3%), meningite (18,8%), crises epilépticas (27%), hipertensão intracraniana (10,4%), fraqueza muscular (6,3%). Entretanto, 5,7% dos pacientes avaliados foram à óbito, e apenas 3,8% receberam alta hospitalar com alguma complicação neurológica: espasticidade, paresia, fraqueza muscular e dificuldade deambulação (BENTES et al, 2019). É possível que as diferenças encontradas, em relação à prevalência das complicações pós alta, esteja associada à metodologia dos estudos da revisão, que não realizaram seguimento clínico dos pacientes.

Foram diagnosticadas, entre março de 2014 e julho de 2019, 12 crianças com manifestações neurológicas sem morbidades prévias, nas quais o ZIKV foi detectado em líquido por RT-PCR. As manifestações neurológicas apresentadas por estas crianças durante a internação hospitalar foram: meningite ou abaulamento de fontanela (33.3%), crises convulsivas (33.3%), encefalite (25%), ataxia (8.3%). Fraqueza muscular ou paresia pós encefalite foram observadas em 8.3% das crianças, dor com dificuldade para deambular pós radiculite em 16.6% e 8.3% evoluiu com algum sinal focal (Tabela 5).

Na análise de líquido dos pacientes com ZIKV, 58% dos pacientes evoluiu sem alteração deste exame. A glicose no líquido estava dentro dos valores de referência (2/3 da glicemia sérica) em 100% das crianças e a proteína estava dentro dos valores de referência, por idade, em 67%. A celularidade no líquido variou entre 1 e 490 células com predomínio de linfomonucleares em 100% das crianças. Como poucos pacientes apresentaram alteração líquórica, apenas três crianças receberam antibiótico, por período maior ou igual a 7 dias e uma criança recebeu aciclovir por 14 dias. Nenhum dos pacientes evoluiu para óbito, mas

33% dos pacientes da coorte evoluíram com complicações neurológicas persistentes pós alta: crises epiléticas e dificuldade para deambular associado à mielorradiculopatia crônica.

Após extensa revisão de literatura foram encontrados apenas seis relatos de casos de manifestações neurológicas em crianças e adolescentes com doença neuroinvasiva por ZIKV fora do período neonatal. As manifestações neurológicas reportadas foram hemiparesia, mielite, Guillain-Barre e alteração do comportamento. Entre os seis pacientes, um deles também não apresentou nenhuma alteração líquorica (25%) e três deles (50%) apresentou alguma complicação neurológica persistente (MÉCHARLES et al, 2016; RABONI et al, 2017; LANDAIS et al, 2017; MARINHO et al, 2019).

Entre 2014 e 2019, todas as crianças, que apresentaram manifestações neurológicas pelo YFV, foram diagnosticadas durante o surto da doença no Estado de Minas Gerais e destas, 80% das crianças apresentaram crises convulsivas persistentes, sendo medicadas com anticonvulsivantes e evoluíram com rebaixamento do sensório importante_ Glasgow 3-6. Destas, 60% apresentaram também instabilidade hemodinâmica com necessidade de aminas vasoativas. Assim, 80% delas necessitaram de internação no CTI e 40% evoluíram em poucos dias para óbito, mesmo com suporte adequado (Tabela 5). Entre as crianças com YFV detectado em líquido, 80% apresentou alteração líquórica.

Foram encontrados dois estudos que reportaram uma prevalência de crises epiléticas entre 15.6-25% em crianças e adolescentes internadas com febre amarela durante surto da doença na Nigéria e no Sudão (JONES & WILSON, 1972; ALHAKIM, 2015). E outros dois relatos de caso de doença neuroinvasiva confirmada por YFV silvestre em que as duas crianças apresentaram com crises convulsivas persistente (DINIZ et al, 2019; MARINHO et al., 2019).

Tabela 5: Manifestações neurológicas em crianças nas quais DENV, ZIKV ou YFV foi detectado em líquido por RT-PCR. Hospital Infantil João Paulo II (Março 2014- Julho 2019)

Manifestações neurológicas em crianças	DENV (%)	ZIKV (%)	YFV (%)	Valor-p*
Sinais meníngeos > 1 ano de idade	48	33	0	0,190
Abaulamento de fontanela < 1 ano de idade	31,2	25	20	0,955
Crises convulsivas	32	33	80	0,167
Encefalite	26,8	25	80	0,042
Paresia ou fraqueza muscular pós encefalite ou ADEM	9	8,3	0	0,766
Paresia ou dor pós radiculite	5,4	16,6	0	0,342
Ataxia	9	8,3	0	0,766
Sinais focais	9	8,3	0	0,808
Hipertensão intracraniana	3,5	0	20	0,172
Usou ATB por mais de 7 dias	28,5	25	20	0,941
Usou aciclovir > 14 dias	9	8,3	0	0,766
Foi medicado com imunoglobulina e/ou metilprednisolona	5,4	8,3	0	0,799
Exame de imagem SNC alterado	39	66,6	40	0,658
EEG alterado	3,5	25	0	0,020
Recebeu vacina de febre amarela até 1 mês antes da internação	21,4	0	20	0,152
COMPLICAÇÕES NEUROLÓGICAS				
Complicações neurológicas	39	33,3	80	0,173
Uso de medicação anticrise	19,6	25	66	0,160
Complicação motora	10,7	16,7	0	0,715
Cefaleia	5,4	0	0	0,636
Insônia	14,3	0	0	0,223

*Teste Z de comparação de proporções

7.4 Exames de imagem e eletroencefalograma (EEG) em crianças com manifestações neurológicas por DENV, ZIKV ou YFV

Durante a internação hospitalar, onze crianças com crises convulsivas, nas quais o DENV foi detectado em LCR, realizaram eletroencefalograma (EEG), devido crises persistentes e duas crianças apresentaram EEG alterado. Uma criança apresentou ao EEG, lentificação em região frontal esquerda com ritmo de base desorganizado, e a outra criança apresentou ondas delta intermitentes bilaterais, de maior amplitude a esquerda.

Estudos que avaliaram EEG de pacientes com doença neuroinvasiva por dengue descreveram alterações semelhantes e detectaram resolução destas alterações 15 dias pós alta hospitalar. Na nossa coorte, os pacientes realizaram EEG de controle apenas um ano pós internação hospitalar e os novos exames não apresentaram alteração. É possível que as alterações eletroencefalográficas ocorram apenas durante fase aguda da doença, mas são necessários mais estudos para comprovar estes achados (KALITA; MISRA, 2006; MISRA et al, 2006).

Vinte e três pacientes foram submetidos à tomografia de crânio (TCC) e ou ressonância magnética de encéfalo e oito crianças (34.8%) apresentaram alteração em exame de imagem. Em uma criança, foi observado à TCC discreto edema com apagamento de corno anterior dos ventrículos, e em outra criança, hidrocefalia obstrutiva com impregnação de contraste em base de crânio. Cinco pacientes realizaram ressonância magnética: um deles apresentou áreas de atenuação de sinal em substância branca dos centros semi-ovais em regiões frontais e parietais, de aspecto inespecífico, outra criança apresentou restrição de difusão em hipocampo à esquerda. Um criança apresentou sinais de polirradiculite em RNM de coluna e outra mielite entre C7 e T8. Uma criança apresentou à RNM de encéfalo hipersinal em T2, em tálamo bilateralmente, com restrição de difusão em substância branca sugestivo de ADEM. Outra criança apresentou múltiplas áreas de hipersinal, com microsangramentos em região parietal esquerda e outra criança apresentou à RNM de encéfalo hipodensidade em substância branca posterior. As alterações de imagem do SNC observadas na coorte foram semelhantes às alterações descritas em outros estudos (WASAY et al, 2008).

Durante a internação hospitalar das crianças com manifestações neurológicas pós infecção por ZIKV, três crianças realizaram tomografia de crânio e 1 apresentou atrofia cortical leve à TCC. Devido a crises convulsivas persistentes, durante a internação hospitalar, três crianças realizaram EEG e todas apresentaram alteração ao EEG seja durante a internação ou até 2 anos depois. As alterações em EEG descritas por médicos neurofisiologistas foram:

lentificação, atividade delta rítmica intermitente occipital (OIRDA) e lentificação em lobos temporais. Apenas uma criança foi submetida à ressonância magnética da medula espinhal (RNM), que demonstrou espessamento de raízes da cauda equina e 2 anos depois da encefalite, nova RNM evidenciou mielorradiculopatia crônica.

Entre os 12 pacientes com manifestações neurológicas pós ZIKV, 25% recebeu alta com medicação anticrise epiléptica por crises convulsivas persistentes e alteração no EEG. As crianças com doença neuroinvasiva por ZIKV, diferente das crianças DENV positivas, apresentaram alteração em EEG e exames de imagem persistentes por até dois anos pós alta hospitalar.

Todas as crianças com diagnóstico de encefalite pelo YFV realizaram tomografia de crânio e em 40% delas, a imagem evidenciou edema cortical difuso e perda da diferenciação córtico subcortical. As crianças com alteração em exames de imagem dos pacientes YFV positivos evoluíram para óbito.

7.5 Fatores preditores para complicações neurológicas em crianças com DENV, ZIKV ou YFV detectado em líquido

As crianças foram avaliadas para fatores preditivos para complicações neurológicas à alta hospitalar, ou detectadas no primeiro mês pós alta, e que persistiram durante seguimento clínico. Os desfechos clínicos avaliados foram: óbito, complicações neurológicas, uso de medicações anticrise convulsiva, sequelas motoras, cefaleia e insônia. Estas complicações foram observadas em 39% das crianças com RT-PCR positivo no líquido para DENV, 33.3% das crianças com RT-PCR ZIKV positivo e 80% das crianças YFV RT-PCR positivo.

Na análise univariada os fatores de risco associados à complicações neurológicas à alta hospitalar, ao uso de medicações anticrise convulsiva pós alta, a presença de sequelas motora, insônia ou cefaleia persistentes pós alta em crianças infectadas por um dos flavivírus de interesse foram sumarizadas na Tabela 6.

Tabela 6: Análise univariada de fatores preditores para óbito, complicações neurológicas à alta, uso de medicação anticonvulsivante pós alta hospitalar, sequelas motoras, insônia ou cefaleia persistentes pós alta em crianças com DENV, ZIKV ou YFV detectados em líquido cefalorraquidiano, Hospital Infantil João Paulo II. (Março 2014-Julho 2019)

Fatores preditivos	Uso anticonvulsivante pós alta	sintomas motores	Alteração sono	Cefaleia	Óbito	Complicações neurológicas à alta
Idade	0,624	0,076	0,071	0,028	0,320	0,561
Sexo	0,049	0,709	1,00	0,264	0,166	0,094
Tipo vírus	0,408	0,793	0,489	1,00	0,004	0,222
Sorotipos	0,761	0,947	0,190	0,847	0,005	0,434
Encefalite	< 0,001	0,232	0,691	1,00	0,088	< 0,001
Fontanela abaulada	0,057	0,338	0,611	1,00	1,00	0,106
Sinais meníngeos	0,165	1,00	1,00	0,105	1,00	0,567
Convulsão	< 0,001	0,457	1,00	1,00	0,134	< 0,001
Sintomas motores	< 0,001	< 0,001	1,00	1,00	1,00	0,003
Radiculite	0,300	0,008	1,00	1,00	1,00	0,396
Ataxia	0,115	0,001	0,515	0,230	1,00	0,003
Sinais focais	0,002	0,015	1,00	1,00	1,00	0,003
Exantema	1,00	0,598	1,00	0,392	1,00	1,00
Vacina febre amarela <1m	0,463	0,626	0,029	1,00	1,00	0,023
Celularidade LCR alterada	0,009	0,130	1,00	1,00	1,00	0,003
Proteína LCR alterada	0,016	0,099	0,701	0,232	0,534	0,001
Imagem SNC alterada	< 0,001	0,029	0,336	0,450	0,030	< 0,001
EEG alterado	< 0,001	0,450	0,450	1,00	1,00	0,009

Teste qui-quadrado de Pearson ou Teste exato de Fisher

Na análise multivariada, considerando os três flavivírus juntos, os fatores preditivos de risco para complicações neurológicas pós alta foram: ter apresentado encefalite durante a internação o que aumentou o risco 64% (IC95% 1,28-2,10), líquido cefalorraquidiano com alteração da celularidade, aumentou o risco 24% (IC95% 1,02-1,52) e ter EEG alterado, aumentou o risco para complicações em 24% (IC95% 1,02-1,51).

Em modelo ajustado para os três vírus, foram fatores de risco para complicações neurológicas pós alta: ter apresentado durante a internação paresia ou dificuldade para deambular secundário à encefalite, mielite, ou ADEM, o que aumentou o risco em 39% (IC95% 1,01-1,92), ter apresentado ataxia durante a internação aumentou o risco de complicações em 76% (IC95% 1,40-2,20), EEG alterado aumentou o risco 61% (IC95% 1,26-2,06), imagem alterada aumentou o risco 47% (IC95% 1,12- 1,93), ter o YFV detectado em líquido cefalorraquidiano por RT-PCR durante a internação aumentou o risco em 53% (IC:1,02-2,30). (Tabela 7).

Tabela 7: Análise multivariada de fatores preditivos para complicações neurológicas pós alta hospitalar em crianças com RT-PCR de líquido positivo para DENV, ZIKV ou YFV, Hospital Infantil João Paulo II. (Março 2014-Julho 2019)

TODOS OS FLAVIVÍRUS			AJUSTADO POR TIPO VIRAL		
Fatores preditivos	RR	IC95%	Fatores preditivos	RR	IC 95%
Encefalite	1,64	1,28-2,10	Sintomas motores*	1,39	1,01-1,92
Celularidade LCR alterada	1,24	1,02-1,52	Ataxia	1,75	1,40-2,20
EEG alterado	1,24	1,02-1,51	EEG alterado	2,04	1,65-2,52
			Imagem SNC alterada	1,47	1,12-1,93
			DENV	1,00	-
			YFV	1,53	1,02-2,30
			Zika	0,89	0,71-1,12

*paresia, hipertonia, alteração marcha associado encefalite, mielite ou ADEM

Para o desfecho uso de medicações anticrise pós alta hospitalar, ter EEG alterado durante a internação hospitalar aumentou o risco em 2 vezes (IC95% 1,94-2,54), ter celularidade líquorica alterada aumentou o risco em 1,25 vezes (IC95% 1,10-1,45) (Tabela 8).

Tabela 8: Fatores preditivos para uso de medicação anticrise pós alta hospitalar em crianças com RT-PCR de líquido positivo para DENV, ZIKV ou YFV, Hospital Infantil João Paulo II. (Março 2014-Julho 2019)

FATORES PREDITIVOS	RR	IC 95% (RR)
EEG alterado	2,22	1,94-2,54
Celularidade LCR alterada	1,25	1,10-1,45

Estudos de neurofisiologia conseguiram demonstrar a presença de um sistema linfático no SNC que segue junto ao sistema vascular na dura-mater (ASPELUND et al, 2015; LOUVEAU et al, 2016). Como, os flavivírus infectam os linfócitos T e multiplicam-se nos linfonodos, é possível que o sistema linfático presente na dura-mater seja uma via para invasão viral no SNC (LOUVEAU et al, 2016). Este possível mecanismo de invasão viral explicaria porque 35.7% das crianças DENV positivas, 58% das crianças ZIKV+ e 20% das crianças com YFV detectado no líquido não apresentaram alteração líquorica.

Há estudos em modelos animais e celulares demonstrando que os flavivírus podem atravessar a barreira hematoencefálica por vias transcelulares (MUSTAFÁ et al, 2019), através de leucócitos e monócitos infectados (MARINHO & KROON, 2019), ou infectar o SNC pela via linfática dural (ASPELUND et al, 2015; LOUVEAU et al, 2016). Segundo estas teorias, a multiplicação viral no SNC levaria à inflamação, e a quebra da barreira seria uma consequência e não causa da invasão viral (MUSTAFÁ et al, 2019). Na nossa coorte foi observado que crianças, que apresentaram alteração de celularidade líquórica, tiveram um risco 24% maior para complicações neurológicas pós alta e 25% maior de serem tratados com medicações anticrise. Estes resultados sugerem que a quebra da barreira hematoencefálica levando à pleocitose líquórica esteja relacionada a um maior processo inflamatório que leve à complicações neurológicas persistentes.

As alterações nos exames de imagem e eletroencefalograma, encontradas nos pacientes desta coorte, foram semelhantes àquelas descritas em estudos prévios, de crianças infectadas por DENV, ZIKV ou YFV (BENTES et al., 2019). Tomografia de crânio com edema difuso, ressonância magnética (RNM) de encefalo demonstrando áreas de atenuação de sinal em substância branca, RNM de medula espinhal sugestivas de mielite ou radiculite, eletroencefalogramas com lentificação das ondas e ritmo de base desorganizados (KALITA & MISRA, 2006; MISRA et al, 2006; WASAY et al, 2008; FONG et al., 2017; MARINHO et al., 2019) . Em análise multifatorial, as alterações nestes exames foram bons preditores para complicações neurológicas. As alterações nos exames de imagem do SNC aumentou o risco para complicações neurológicas pós alta hospitalar em 47% (IC95% 1,12-1,93). A alteração no EEG aumentou o risco de complicações neurológicas pós alta em 61% (IC95% 1,26-2,06) e aumentou o risco do uso de medicações anticrise convulsiva pós alta hospitalar em duas vezes (IC95% 1,94-2,54).

Na análise de fatores preditivos para complicações neurológicas pós alta hospitalar, crianças que tiveram o YFV detectado em líquido por RT-PCR, tiveram um risco 53% maior para desenvolverem complicações quando comparado com crianças DENV positivas. Estudo realizado durante surto de febre amarela, na Nigéria, detectou que 25% dos pacientes apresentaram manifestações neurológicas (JONES; WILSON, 1972). Estudo realizado no Sudão que avaliou 844 pacientes hospitalizados por febre amarela, sendo 181 pacientes menores de 15 anos, descreveu que 15,6% apresentaram crises convulsivas (ALHAKIMI et al, 2015). Nesta coorte 80% das crianças apresentaram crises convulsivas e 40% evoluíram com encefalite grave, Glasgow 3 e óbito em poucos dias pós internação.

Há pouco estudos de manifestações neurológicas pelo YFV, mas pela gravidade das manifestações neurológicas apresentadas pelas crianças YFV positivas, com 40% de letalidade, é possível que seja um dos flavivírus de maior neurovirulência em humanos (JONES & WILSON, 1972; ALHAKIMI et al, 2015; DINIZ et al, 2019; MARINHO et al, 2019) . Considera-se que seja pouco estudado, porque há uma vacina com alta efetividade para proteção contra a febre amarela (STAPLES et al, 20015) . Infelizmente, nos países onde ainda ocorrem surtos desta infecção há poucos recursos para o diagnóstico etiológico viral das manifestações neurológicas (GARSKE et al, 2017; PAULES; FAUCI, 2017; KRAEMER et al., 2017).

Na análise multivariada, os fatores preditivos para apresentar sequelas motoras, como dificuldade de deambulação, fraqueza muscular ou paresia em membros, foram ter apresentado, durante a internação hospitalar, sintomas motores pós encefalite, mielite ou ADEM, o que aumentou o risco 2 vezes (IC95% 1,41- 2,80) e ter apresentado ataxia, aumentou o risco 1,6 vezes (IC95% 1,04-2,37) (Tabela 9).

Tabela 9: Fatores preditivos para sequelas motoras pós alta hospitalar em crianças com RT-PCR de líquido positivo para DENV, ZIKV ou YFV, Hospital Infantil João Paulo II. (Março 2014-Julho 2019)

FATORES PREDITIVOS	RR	IC 95% (RR)
Sintomas motores*	1,99	1,41 - 2,80
Ataxia	1,57	1,04 – 2,37

*paresia, hipertonia, alteração marcha associado encefalite, mielite ou ADEM

Para o desfecho insônia pós alta hospitalar, o único fator preditivo com significância estatística, na análise multivariada, foi ter sido vacinado para febre amarela até um mês antes da internação, o que aumentou o risco 5 vezes (IC95% 1,10-25,95).

Para os desfechos: uso de medicações anticrise epiléptica pós alta hospitalar, sequela motora, insônia e cefaleia persistente pós alta hospitalar o risco de complicações não foi estatisticamente diferente entre os três flavivírus avaliados neste estudo. O número pequeno de pacientes ZIKV e YFV positivos pode ter sido um fator limitante para não detecção de diferença estatística entre estes flavivírus.

7.6 Fatores preditores para complicações neurológicas em crianças com sorotipos DENV-1, DENV-2, DENV-3, DENV-4 detectado em líquido

Posteriormente, foram avaliados os fatores preditivos para complicações neurológicas à alta hospitalar e durante seguimento clínico, apenas nas crianças nas quais o DENV foi detectado no líquido por RT-PCR. As manifestações neurológicas apresentadas durante a internação e complicações pós alta das crianças, nas quais foram detectados os diferentes sorotipos de DENV foram sumarizadas na tabela abaixo (Tabela 10).

Como pode ser observado na tabela 10, não foi detectado diferença estatística entre a prevalência das manifestações neurológicas e complicações pós alta, entre as crianças, nas quais foram detectados no líquido DENV-1, DENV-2, DENV-3, DENV-4 e no grupo com co-infecções entre os diferentes sorotipos de dengue. É provável que o pequeno número de pacientes detectado com cada sorotipo ou co-infecção tenha sido um fator limitante para detectar diferença estatística entre os diferentes sorotipos e avaliar maior neurovirulência dos sorotipos DENV-2 e DENV-3 como reportado por outros estudos (SOARES et al., 2006; SALAZAR et al., 2013; SOLBRIG; PERNG, 2015; OLIVEIRA et al., 2017).

Nesta coorte de crianças e adolescentes foram detectados no líquido de sete pacientes co-infecções entre os diferentes sorotipos de DENV: duas crianças com os sorotipos DENV 1, 2 e 3; três com os sorotipos DENV 1 e 3, uma com sorotipos 1-2 e outra com DENV 2 e 3. Não foi detectado maior gravidade clínica ou maior risco para complicações persistentes pós alta hospitalar nas crianças com co-infecção entre os diferentes sorotipos de dengue. Embora, seja necessário estudo com um maior número amostral para confirmar estes achados, é possível que a resposta imunológica que desencadeia uma tempestade de citocinas levando a maior gravidade clínica nas infecções secundárias por dengue não ocorram nas co-infecções (SOUZA org., 2016).

Tabela 10: Prevalência das manifestações neurológicas em crianças, nas quais os diferentes sorotipos de DENV, foram detectados em líquido por RT-PCR, Hospital Infantil João Paulo II. (Março 2014-Julho 2019).

Manifestações neurológicas em crianças (%)	DENV-1	DENV-2	DENV-3	DENV-4	DENV 1/2/3	p-valor*
Crises convulsivas	31,2	41,6	27,8	33,3	42,8	0,921
Encefalite	31,2	26,7	27,8	33,3	28,6	0,928
Sinais meníngeos	18,7	8,3	27,8	33,3	28,6	0,702
Abaulamento de fontanela	18,7	16,7	22,2	33,3	0	0,687
Sintomas motores pós encefalite	6,2	26,7	11,1	0	0	0,715
Sintomas SNP	0	0	11,1	0	14,3	0,402
Sinais focais	6,2	16,7	5,6	0	14,3	0,769
Ataxia	6,2	8,3	11,1	0	14,3	0,939
Instabilidade hemodinâmica	12,5	8,3	0	0	14,3	0,579
Hipertensão intracraniana	0	0	5,5	0	14,3	0,450
Usou ATB mais de 7 dias	43,7	25	22,2	66,7	0	0,127
Aciclovir mais de 14 dias	5,2	8,3	11,1	33,3	0	0,535
Foi medicado com imunoglobulina e/ou pulsoterapia com metilprednisolona	0	8,3	11,1	0	0	0,582
Realizou exame de imagem SNC	25	50	44,4	33,3	42,8	0,694
Exame de imagem SNC alterado	25	33,3	37,5	100	66,7	0,580
Realizou EEG	12,5	16,7	22,2	33,3	28,6	0,849
EEG alterado	50	0	0	0	50	0,369
Vacina de febre amarela até 1 mês antes da internação	25	16,7	11,1	33,3	42,8	0,465
COMPLICAÇÕES PÓS ALTA HOSPITALAR						p-valor*
Alta com algum sintoma neurológico	37,5	50	27,8	66,7	28,7	0,582
Uso de medicação anticrise	12,5	25	16,7	33,3	28,6	0,818
Sequela motora	6,2	16,7	11,1	0	14,3	0,872
Cefaleia	6,2	0	11,1	0	0	0,654
Insônia	25	16,7	5,6	33,3	0	0,316

*Teste Z comparação de proporções

Na tabela 11, foram sumarizadas análise univariada dos fatores de risco associados à complicações neurológicas à alta hospitalar, ao uso de medicação anticrise pós alta, sequelas motoras, alteração do sono ou cefaleia persistentes pós alta.

Tabela 11: Análise univariada de fatores preditores para complicações neurológicas à alta, uso de medicação anticrise pós alta hospitalar, sequelas motoras, insônia ou cefaleia persistentes pós alta em crianças com DENV detectado em líquido, Hospital Infantil João Paulo II. (Março 2014-Julho 2019)

Fatores preditivos	Uso medicação anticrise pós alta	Sequelas motoras	Insônia	Cefaleia	Complicações neurológicas à alta
Idade	0,582	0,235	0,152	0,017	0,845
Sexo	0,170	0,215	1,00	0,261	0,275
Sorotipos	0,731	0,879	0,262	0,875	0,630
Encefalite	< 0,001	0,326	0,668	1,00	< 0,001
Fontanela abaulada	0,183	0,578	0,623	1,00	0,168
Sinais meníngeos	0,424	0,323	0,672	0,113	0,634
Convulsão	< 0,001	0,397	1,00	1,00	0,001
Sintomas motores	< 0,001	< 0,001	1,00	1,00	0,007
Radiculite	0,488	0,293	1,00	1,00	1,00
Ataxia	0,251	<0,001	0,552	0,249	0,007
Sinais focais	0,004	0,007	1,00	1,00	0,007
Exantema	0,649	0,200	1,00	0,376	0,698
Vacina febre amarela <1m	0,689	0,599	0,055	1,00	0,045
Celularidade alterada LCR	0,036	0,386	1,00	1,00	0,012
Proteína alterada LCR	0,071	0,062	0,688	0,216	0,003
Imagem SNC alterada	< 0,001	0,046	0,329	0,415	0,002
EEG alterado	0,036	1,00	0,268	1,00	0,150

Teste qui-quadrado de Pearson ou Teste exato de Fisher

Na análise multivariada, as variáveis preditoras para complicações neurológicas persistentes pós alta nas crianças DENV positivas foram: ter encefalite, o que aumentou o risco em 49% (IC95% 1,10-2,03), ter apresentado durante a internação paresia, dificuldade para deambular associados à encefalite, mielite ou ADEM, o que aumentou o risco em 56% (IC1,17-2,09) e ter apresentado EEG alterado, que aumentou o risco 44% (IC95% 1,08-1,93). (Tabela 12).

Tabela 12: Fatores preditivos para complicações neurológicas à alta hospitalar em crianças com RT-PCR de líquido positivo para DENV. Hospital Infantil João Paulo II. (Março 2014-Julho 2019)

FATORES PREDITIVOS	RR	IC 95%
Encefalite	1,49	1,10 - 2,03
Sintomas motores*	1,56	1,17 - 2,09
EEG alterado	1,44	1,08 - 1,93

*paresia, hipertonia, alteração marcha associado encefalite, mielite ou ADEM

Para o desfecho sequelas motoras pós alta como dificuldade para deambular, parestesia, fraqueza muscular, ataxia, o único fator preditivo encontrado foi ter apresentado sintomas motores associado à inflamação no SNC como encefalite, mielite ou ADEM durante a internação hospitalar, o que aumentou o risco em 2 vezes (IC95% 1,50-3,05).

Nesta coorte, pacientes que apresentaram encefalite, mielite e ADEM durante a internação tiveram um risco maior de evoluir com complicações persistentes pós alta. Estes resultados corroboram os achados de VAN TAN et al (2010) e SOLOMON et al (2000). Estes pesquisadores reportaram que 11-14% das crianças com encefalite e mielite, nas quais o DENV foi detectado por isolamento viral ou PCR no líquido, evoluíram com complicações pós alta hospitalar.

Para o desfecho uso de medicação anticrise pós alta hospitalar, os fatores preditivos de risco, foram ter apresentado durante a internação ou seguimento clínico EEG alterado, o que aumentou o risco 84% (IC95% 1,15-2,93) e ter imagem do sistema nervoso alterada, o que aumentou o risco em 89% (IC95% 1,41-2,54).

Tabela 13: Fatores preditivos para uso de medicação anticrise pós alta hospitalar em crianças com RT-PCR de líquido positivo para DENV, Hospital Infantil João Paulo II. (Março 2014-Julho 2019)

Fatores preditivos	RR	IC 95%
EEG alterado	1,84	1,15 - 2,93
Imagem sistema nervoso alterada	1,89	1,41 - 2,54

Para o desfecho insônia pós alta hospitalar, ter recebido a primeira dose de vacina de febre amarela, até 30 dias antes da internação, aumentou o risco 29% (IC95% 1,01-1,65) e ter sido

detectado DENV-1 no líquido, aumentou o risco para esta complicação em 34% (IC95% 1,08-1,67).

Tabela 14: Fator preditivo para insônia pós alta hospitalar em crianças com RT-PCR de líquido positivo, para os sorotipos de DENV. Hospital Infantil João Paulo II. (Março 2014-Julho 2019)

FATORES PREDITIVOS	RR	IC 95%
DENV-1	1,34	1,08 - 1,67
DENV-2	1,26	0,98 - 1,62
DENV-3	1,15	0,97 - 1,35
DENV-4	1,43	0,95 - 2,16
DENV-1/2/3	-	-
Ter recebido vacina YFV < 30 dias da internação	1,29	1,01 - 1,65

BESEDOVSKY; LANGE e HAACK publicaram em 2019, uma revisão em que descrevem estudos realizados em voluntários e cobaias explicando a fisiopatologia da interação entre os sistemas nervoso, endócrino, imune e o sono. Eles descrevem como diversos patógenos, entre eles os vírus, são capazes de manter um baixo processo inflamatório por meses após uma infecção aguda. Este processo inflamatório não resolvido, leva à uma ativação imune crônica, estimulando a produção e liberação de citocinas, que ativa mensageiros neuroendócrinos e leva à distúrbios do sono. Embora, nenhum outro estudo tenha avaliado sono após infecção do SNC pelos flavivírus, a partir destas evidências científicas, é possível que o YFV atenuado presente na vacina ative o sistema imunológico e este previamente sensibilizado mantenha um baixo grau de inflamação pós infecção do DENV no SNC desencadeando o distúrbio de sono observado nas crianças.

7.7 Análise de sobrevivência em crianças com complicações neurológicas por DENV, ZIKV e YFV detectado em líquido

As crianças com manifestações neurológicas, nas quais DENV, ZIKV ou YFV foi detectado por RT-PCR em líquido, foram acompanhadas pós alta hospitalar em ambulatório de seguimento. O tempo médio de acompanhamento clínico das crianças, nas quais DENV foi detectado em líquido, foi de 16 meses. O tempo médio de acompanhamento clínico das crianças ZIKV positivas foi de 19,3 meses e das crianças YFV positivas foi de 14,3 meses.

Algumas crianças não compareceram às consultas de seguimento clínico, mesmo após intensa busca ativa. As perdas de seguimento foram de três (4%) crianças que receberam alta sem complicações neurológicas.

Considerando todas as 73 crianças com manifestações neurológicas, nas quais foram detectadas no líquido um dos flavivírus de interesse, o tempo médio para melhora clínica foi de 2,8 meses para as crianças DENV positivas, variando entre 0 e 32 meses. O tempo médio foi de 6,3 meses para as crianças ZIKV positivas, variando entre 0 e 41,3 meses. E foi de 2,5 meses para as crianças nas quais o YFV foi detectado por RT-PCR em líquido, variando entre 0,1 e 10,2 meses (Figura 10).

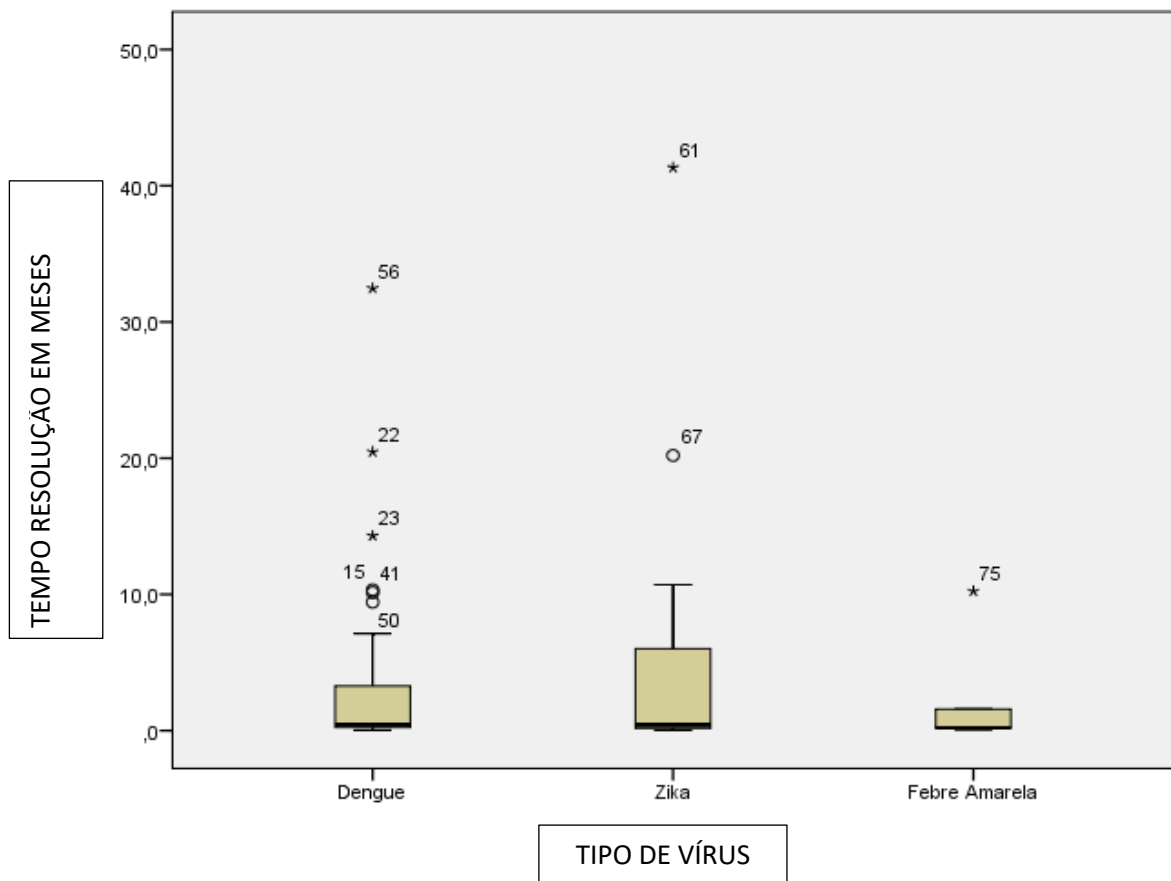


Figura 10: Histograma do tempo de resolução das complicações neurológicas nas crianças, nas quais DENV, ZIKV ou YFV foi detectado por RT-PCR no líquido, Hospital Infantil João Paulo II (Março 2014-Julho 2019).

Em análise de sobrevida, para avaliar o tempo de resolução das complicações neurológicas, detectou-se que não houve diferença estatística (p-valor 0,574) entre as crianças DENV, ZIKV ou YFV positivas (Figura 11).

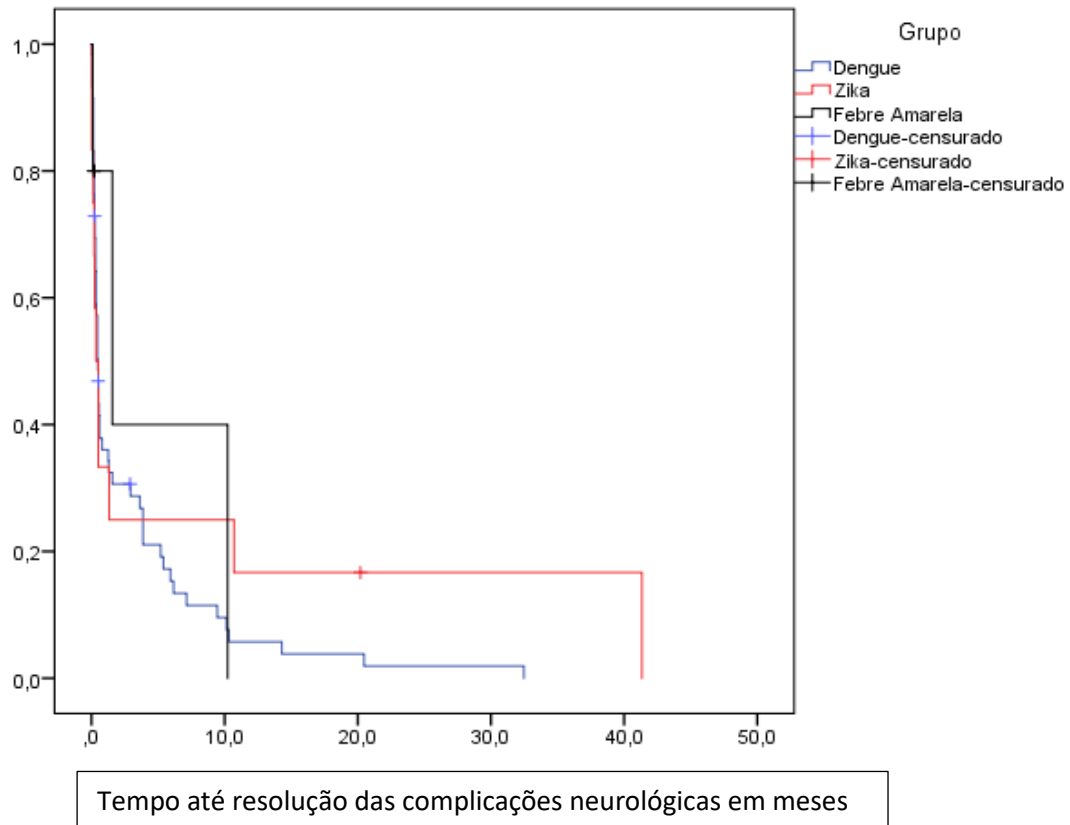


Figura 11: Tempo em meses até resolução das complicações neurológicas pós alta hospitalar em crianças com RT-PCR de líquido positivo para DENV, ZIKV e YFV. Hospital Infantil João Paulo II. (Março 2014-Julho 2019)

Estudos realizados em culturas celulares e cobaias que avaliaram os mecanismos de infecção dos flavivírus no SNC e imunopatologia descrevem maior semelhança do que diferença entre eles (MUSTAFÁ et al, 2019; MARINHO; KROON, 2019). Os resultados desta coorte em crianças e adolescentes com doença neuroinvasiva confirmada por estes três flavivírus também encontrou muitas semelhanças entre as manifestações neurológicas apresentadas, entre a prevalência dos desfechos à alta e durante seguimento clínico e no tempo para resolução destas complicações.

8. CONCLUSÃO

Este foi o primeiro estudo prospectivo que avaliou crianças e adolescentes com doença neuroinvasiva confirmada pelos flavivírus de maior incidência no país, realizado em hospital pediátrico de referência do Estado de Minas Gerais para doenças infecto contagiosas.

Neste estudo foram avaliadas 505 crianças com sintomas neurológicas, DENV foi detectado por RT-PCR em líquido em 14% dos pacientes, ZIKV em 2,8% e YFV 1,2%. Assim, de todas as crianças que tiveram exame de líquido coletado para pesquisa viral, 18% foram positivas para um dos flavivírus. O que é de extrema relevância na avaliação de crianças com manifestações neurológicas, especialmente durante os meses de maior pluviosidade nos quais ocorre um aumento da proliferação do *Aedes aegypti* e durante surtos destes arbovírus (BECKHAM; TYLER, 2015; PATTERSON; SAMMON; GARG, 2016).

Alterações laboratoriais esperadas em pacientes com infecção por DENV, como hemoconcentração, leucopenia e plaquetopenia foram pouco prevalentes nos pacientes deste estudo (Tabela 4) (SOUZA org. 2016). Também não foram prevalentes nos pacientes desta coorte, alterações laboratoriais sugestivas de gravidade clínica, como acidose metabólica, elevação das transaminases, alteração de coagulograma, evidenciando que não apenas pacientes clinicamente graves ou instáveis apresentam sintomas neurológicos. O diagnóstico presuntivo de dengue foi realizado apenas para três crianças nesta coorte. Estes resultados devem alertar os médicos que avaliam estas crianças, para pouca sensibilidade destes exames laboratoriais. Assim, como reforça a evidência já reportada em outros estudos que as manifestações neurológicas podem ser uma manifestação primária da infecção pelo DENV e não apenas secundário à gravidade clínica da infecção (OLIVEIRA et al, 2017; MARINHO et al, 2017).

Houve baixa prevalência de crianças que apresentaram exantema durante à infecção aguda por DENV (14,6%) e ZIKV (25%). A presença de exantema em um paciente com doença neuroinvasiva deve sempre levantar a possibilidade de uma arbovirose, mas lembrando que este é um dado clínico de baixa sensibilidade (SOUZA org. 2016).

Não houve alteração liquorica em 35,7% das crianças com DENV, 58% das crianças com ZIKV e 20% das crianças com YFV detectados no líquido, embora todas elas apresentaram doença neuroinvasiva confirmada (BRASIL, MINISTÉRIO DA SAUDE, 2017). Estes resultados, também são de grande relevância na prática clínica, pois alertam os médicos para a

possibilidade deste diagnóstico em crianças com manifestações neurológicas, hemograma pouco alterado, proteína C reativa baixa e líquido com ou sem alteração.

Na análise de fatores preditivos para complicações neurológicas pós alta hospitalar, crianças que tiveram o YFV detectado em líquido por RT-PCR, tiveram um risco 53% maior para desenvolverem complicações. O que reforça a importância do diagnóstico etiológico viral para melhor compreensão e abordagem das manifestações neurológicas infecciosas (DINIZ et al, 2019; MARINHO et al, 2019).

Este estudo correlacionou sintomas clínicos, parâmetros líquidos, alterações em exames de imagem do SNC e alteração em EEG, que podem auxiliar os médicos na avaliação dos pacientes com maior risco de persistência das complicações neurológicas pós alta.

Em países e hospitais onde não seja possível realizar o diagnóstico etiológico, esperamos que os resultados encontrados forneçam evidências, para que os médicos mantenham o acompanhamento clínico de crianças com acometimento do SNC e suspeita de infecção por flavivírus, para adequada abordagem das complicações neurológicas.

Este foi o primeiro estudo prospectivo que avaliou fatores de risco para persistência das complicações neurológicas pós alta hospitalar em crianças com doença neuroinvasiva confirmada para três flavivírus. O tamanho da amostra, especialmente para o ZIKV e YFV, pode ter sido um fator limitante para detectar outros fatores de risco, entretanto, devido à eficácia da vacina de febre amarela, manifestações neurológicas por este vírus é um evento extremamente raro (STAPLES; BOCCHINI; LORRY RUBBIN, 2015; CAMACHO et al, 2015). Assim, esperamos que os resultados encontrados contribuam para uma maior compreensão e abordagem clínica das manifestações neurológicas por estes flavivírus.

REFERÊNCIAS

- AASM. AMERICAN ACADEMY OF SLEEP MEDICINE. **International Classification of Sleep Disorders**. 3. ed. Darien IL: American Academy of Sleep Medicine, 2014.
- ALHAKIMI, A., H. et al. Epidemiological, Clinical and Entomological Characteristics of Yellow Fever Outbreak in Darfur 2012. **AIMS Public Health**, v. 2, n. 1, p. 132–141, 2015.
- ALI, S. et al. Environmental and Social Change Drive the Explosive Emergence of Zika Virus in the Americas. **PLoS Neglected Tropical Disease**, v. 17, n. 494, p. 1-7, 9 fev. 2017.
- ASPELUND, A. et al. A dural lymphatic vascular system that drains brain interstitial fluid and macromolecules. **Journal of Experimental Medicine**, v. 212, n. 7, p. 991–999, 2015.
- BAHIA, M.; FROEDE, M.L.J.; DELGADO, R.B. **Valores de referência de exames laboratoriais**. In: *Pediatria Ambulatorial*. 5ed. Belo Horizonte: Coopmed, 2013.
- BECKHAM, J.D.; TYLER, K.L. Arbovirus Infections. **Continuum (Minneapolis, Minn), Neuroinfectious Disease**, v. 21, n.6, p. 1599–1611, 1 dez, 2015.
- BENTES, A. A.; KROON, E. G.; ROMANELLI, R. M. DE C. Neurological manifestations of pediatric arboviral infections in the Americas. **Journal of Clinical Virology**, v. 116, n. April, p. 49–57, 2019.
- BESEDOVSKY, L.; LANGE, T.; HAACK, M. The sleep-immune crosstalk in health and disease. **Physiological Reviews**, v. 99, n. 3, p. 1325–1380, 2019.
- BHATT, S. et al. The global distribution and burden of dengue. **Nature**, v. 496, n. 7446, p. 504–507, 25 abr. 2013.
- BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância de Doenças Transmissíveis. **Manual de Vigilância Sentinela de Doenças Neuroinvasivas por Arbovírus**. Brasília, 44p., 2017.
- CAM, B. V. et al. Prospective case-control study of encephalopathy in children with dengue hemorrhagic fever. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 65, n. 6, p. 848–851, 2001.
- CAMACHO, L. A. B. et al. A randomised double-blind clinical trial of two yellow fever vaccines prepared with substrains 17DD and 17D-213/77 in children nine-23 months old. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 110, n. 6, p. 771–780, 2015.

CAO-LORMEAU, V.M. et al. Guillain-Barré Syndrome outbreak associated with Zika virus infection in French Polynesia: A case-control study. **Lancet**, v.386, n. 10027, p.1531-1539, 9 abr. 2016.

COUNOTTE, M. J. et al. Zika virus infection as a cause of congenital brain abnormalities and Guillain-Barré syndrome: From systematic review to living systematic review [version 1; referees: 2 approved, 1 approved with reservations]. **F1000Research**, v. 7, n. 0, p. 1–20, 2018.

DATASUS. Ministério da Saúde. Departamento de Informática do SUS - DATASUS [homepage na internet]. **Informações de Saúde, Epidemiológicas e Morbidade: banco de dados; 2020** [citado em 2020 fev. 23]. Disponível em: <http://tabnet.datasus.gov.br>

DICK, G. W. A.; KITCHEN, S. F.; HADDOW, A. J. ZIKA Virus (I). Isolations and serological specificity. **Transactions of the royal society of tropical medicine and hygiene**, v. s7-V, n. 116, p. 509–520, 1952.

DIDIER MUSSO, A D. J. G. Zika Virus. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 29, n. 3, p. 487–524, 2016.

DINIZ, L.M.O. et al. Perinatal Yellow Fever: A Case Report. **Pediatric Infectious Disease Journal**, v. 38, n.3, p. 300-301, 2019.

DUFFY, M. R. et al. Zika virus outbreak on Yap Island, Federated States of Micronesia. **New England Journal of Medicine**, v. 360, n. 24, p. 2536–2543, 2009.

FONG, C.Y. et al. Mild encephalitis/encephalopathy with reversible splenic lesion (MERS) due to dengue virus. **Journal Clinical Neuroscience**, v.36, p. 73–75, 1 fev. 2017.

GARSKE, T. et al. Eliminate Yellow fever Epidemics (EYE): a global strategy, 2017-2026. **World Health Organization**, n. 16, p. 193–204, 2017.

GRAY, M.P.; GORELICK, M.H. Acute Disseminated Encephalomyelitis, **Pediatric Emergency Care**, v. 32, n. 6, p. 395-400, jun 2016.

HENNESSEY, M.; FISCHER, M.; STAPLES, J. E. Zika Virus Spreads to New Areas - Region of the Americas, May 2015-January 2016. **American Journal of Transplantation**, v. 16, n. 3, p. 1031–1034, 2016.

HERRING, R. et al. Pediatric West Nile Virus-Associated Neuroinvasive Disease: A Review of the Literature. **Pediatric Neurology**, v. 92, p. 16–25, 2019

HORWOOD, P.F., et al. Aetiology of acute meningoencephalitis in Cambodian children, 2010-2013. **Emerging Microbes and Infections**, v.6 , n.5, 24 maio 2017.

HOTEZ, P.J. What does Zika virus mean for the children of the Americas? **JAMA Pediatrics**, v. 170, n. 8, p. 787-789, 1 ago. 2016.

IOOS, S. et al. Current Zika virus epidemiology and recent epidemics. **Medecine et Maladies Infectieuses**, v. 44, p. 302–307, 2014.

JONES, E.M.M.; WILSON, D.C. Clinical features of yellow fever cases at Vom Christian Hospital during the 1969 epidemic on the Jos Plateau, Nigeria. **Bulletin of the World Health Organization**, n 46, p. 653-657, 1972.

JU, J. et al. Fluorescence energy transfer dye-labeled primers for DNA sequencing and analysis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 92, n. 10, p. 4347–4351, 1995.

KALITA, J.; MISRA, U.K. EEG in dengue virus infection with neurological manifestations: a clinical and CT/MRI correlation. **Clinical Neurology**, 117, p. 2252-56, 2006.

KRAEMER, M. U. G. et al. Spread of yellow fever virus outbreak in Angola and the Democratic Republic of the Congo 2015–16: a modelling study. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 17, n. 3, p. 330–338, 2017.

LANDAIS, A. et al. ZIKA vasculitis: A new cause of stroke in children? **Journal of the Neurological Science**, v. 383, p.211-213, 15 dez. 2017.

LI, H. et al. The Neurobiology of Zika Virus. **Neuron Cell Press**, 7 dez. 2016.

LIANG, Q. et al. Zika Virus NS4A and NS4B Proteins Deregulate Akt-mTOR signaling in Human Fetal Neural Stem Cells to Inhibit Neurogenesis and Induce Autophagy. **Cell Stem Cell**, v. 19, n. 5, p. 663–671, 2016.

LIU, T.; CHAMBERS, T. J. Yellow Fever Virus Encephalitis: Properties of the Brain-Associated T-Cell Response during Virus Clearance in Normal and Gamma Interferon-Deficient Mice and Requirement for CD4+ Lymphocytes. **Journal of Virology**, v. 75, n. 5, p. 2107–2118, 1 mar. 2001.

LOHITHARAJAH, J. et al. Viral aetiologies of acute encephalitis in a hospital-based South Asian population. **BMC Infectious Disease**, v.17, n.1, p.1-10, 2017.

LOUVEAU, A. et al. Structural and functional features of cns lymphatics. **Nature**, v. 523, n. 7560, p. 337–341, 2016.

MALAVIGE, G. N.; OGG, G. S. T cell responses in dengue viral infections. **Journal of Clinical Virology**, v. 58, n. 4, p. 605–611, 2013.

MARINHO, P. E. S. et al. Meningitis associated with simultaneous infection by multiple dengue virus serotypes in children, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 23, n. 1, p. 115–118, 1 jan. 2017.

____ et al. Wild-Type Yellow Fever in RNA Cerebrospinal Fluid of Child. **Emerging Infectious Disease**, v. 25, n. 8, p. 1567-70, 2019.

____ et al. Central and peripheral nervous system involvement in Zika virus infection in a child. **Journal of NeuroVirology**, v. 25, n. 6, p. 893-896, 2019.

____; KROON, E.G. Flaviviruses as agents of childhood central nervous system infections in Brazil. **New Microbes New Infect**, n. 30, v. 100539, 4 abril, 2019.

MARQUES, V. DE M. et al. Neurological Complications of Congenital Zika Virus Infection. **Pediatric Neurology**, v. 91, p. 3–10, 2019.

MÉCHARLES, S. et al. Acute myelitis due to Zika virus infection. **The Lancet**, v. 387, n. 10026, p. 1481, 2 abr. 2016.

MESSACAR, K. et al. Encephalitis in US Children. **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 32, n. 1, p. 145–162, 2018.

MISRA, U.K. et al. Neurological manifestations of dengue virus infection. **Journal of Neurological Sciences**. 224, p. 117-122. 2006.

MURTHY, J.M. Neurological complications of dengue infection. **Neurology India**, v. 58, n.4, p. 581–584, 2010.

MUSTAFÁ, Y.M. et al. Pathways exploited by flaviviruses to counteract the blood-brain barrier and invade the central nervous system. **Frontiers in Microbiology**, n. 10, p.1-14, 2019.

NGUYEN, T.P.; TAYLOR, R.S. Guillain Barre Syndrome. Stat Pearls [periódico na Internet]. 2019 **Treasure Island (FL): Stat Pearls Publishing** [acesso em 15 fev 2020]. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK532254/>

OLIVEIRA, D. 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, p. 390–394, 15 abr. 2017.

PAHO. PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION. **Zika cases and congenital syndrome associated with Zika virus reported by countries and territories in the Americas, 2015 - 2018**. Cumulative cases. Washington, DC: PAHO/WHO; 2018.

PATEL, P. et al. Development of one-step quantitative reverse transcription PCR for the rapid detection of flaviviruses. **Virology Journal**, v. 10, n. 58, p. 1, 2013

PATEL, H.; SANDER, B.; NELDER, M. P. Long-term sequelae of West Nile virus-related illness: A systematic review. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 15, n. 8, p. 951–959, 2015.

PATTERSON, J.; SAMMON, M.; GARG, M. Dengue, zika and chikungunya: Emerging arboviruses in the new world. **West Journal of Emergency Medicine**, n.17, p. 671–79, 2016.

PAULES, C.I, FAUCI, A. Yellow Fever _Once again on the Radar Screen in the Americas. **The new england journal of medicine**, p. 1–3, 2017.

POMAR, L. et al. Maternal-fetal transmission and adverse perinatal outcomes in pregnant women infected with Zika virus: Prospective cohort study in French Guiana. **BMJ (Online)**. v. 363, p. 1-17, 2018.

PUCCIONI-SOHLER, M. et al. Neurologic dengue manifestations associated with intrathecal specific immune response. **Neurology**, v. 73, n. 17, p. 1413–1417, 2009.

RABONI, S. M. et al. Flavivirus cross-reactivity in serological tests and Guillain-Barré syndrome in a hematopoietic stem cell transplant patient: A case report. **Transplant Infectious Disease**, v. 19, n. 4, 1 ago. 2017.

REITER P. Oviposition, dispersal, and survival in *Aedes aegypti*: Implications for the efficacy of control strategies. *Vector-Borne and Zoology Disease*; n.7, p. 261–73, 2007.

SALAZAR, M.I. et al. Dengue virus type 2: Protein binding and active replication in human central nervous system cells. **The Scientific World Journal**, v. 2013, 2013.

SANGUANSEMRI, T; PONEPRASERT, B.; PHORNPHURKEL, B. Acute Encephalopathy Associated with Dengue Infection, Seameo Tropmed, Bangkok, pp. 10–11, 1976.

SCOTT, T.F. et al. Evidence based guideline: clinical evaluation and treatment of transverse myelitis. Report of the therapeutics and technology assessment subcommittee of the American Academy of Neurology. **Neurology**, v.77, n. 24, p. 2128-34, 2011.

SEJVAR, J. J. et al. Clinical manifestations and outcomes of West Nile virus infection. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 15, n. 8, p. 16–25, 2015.

SES-MG. Febre Amarela Silvestre em Minas Gerais. **Secretaria do Estado de Saúde de Minas Gerais.**, v. 2017, p. 1–12, 2018.

- SES-MG. Subsecretaria de Vigilância em Saúde. **Boletim Epidemiológico das Doenças Transmitidas pelo Aedes: dengue, chikungunya e zika**. Belo Horizonte, MG, p.1-20, 2020.
- SHAN, C. et al. A single-dose live-attenuated vaccine prevents Zika virus pregnancy transmission and testis damage. **Nature Communications**, v. 8, n. 1, 1 dez. 2017.
- SIL, A. et al. Neurological manifestations in children with dengue fever: an Indian perspective. **Tropical Doctor**, v. 47, n. 2, p. 145–149, 1 abr. 2017.
- SOARES, C. N. et al. Dengue infection: neurological manifestations and cerebrospinal fluid (CSF) analysis. **Journal of the Neurological Sciences**, v. 249, n. 1, p. 19–24, 1 nov. 2006.
- SOLBRIG, M.V.; PERNG, G.C. Current neurological observations and complications of dengue virus infection. **Current Neurology and Neuroscience Reports**, v. 15, n.6, p. 29, jun 2015
- SOLOMON, T. et al. Neurological manifestations of dengue infection. **The Lancet**, v. 355, n. 9209, p. 1053–1059, mar. 2000.
- SOUZA, L.G. (org.). **Dengue, Zika e Chikungunya. Diagnóstico, tratamento e prevenção**. 1ed. Rio de Janeiro: Rubio, 2016.
- STAFSTROM, C.E.; CARMANT, L. Seizures and Epilepsy: as overview for neuroscientists. **Cold Spring Harbor Perspectives Medicine**, v.5, n. 6, p. 1-18, 2015.
- STAPLES, J.E.; BOCCHINI, J.R.; LORRY RUBBIN, M.F. Yellow Fever Vaccine Booster Doses: Recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices, 2015. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, v. 60, n. 26, p. 892-905, 2015.
- SWANSON, D. Meningitis. **Pediatrics in Review**, v. 36, n. 12, p.514-524, 2015.
- TANG, H. et al. Zika virus infects human cortical neural progenitors and attenuates their growth. **Cell Stem Cell**, v. 18, n. 5, p. 587–590, 2016.
- VAN TAN, L. et al. Viral etiology of encephalitis in children in Southern Vietnam: Results of a one-year prospective descriptive study. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 4, n. 10, out. 2010.
- VASANTHAPURAN, R. et al. Dengue virus is an under-recognised agent of acute encephalites syndrome (AES): Results from a four year AES surveillance study of Japanese encephalitis in selected states of India. **International Journal Infectious Disease**, v. 84, S:S19-S24, 2019.

VASCONCELOS, P.F.C. Febre Amarela. **Revista da Sociedade Brasileira Medicina Tropical**, v. 36, n. 2, p. 275-93, 2003.

VENKATESAN, A. et al. Case definitions, diagnostic algorithms, and priorities in encephalitis: Consensus statement of the international encephalitis consortium. **Clinical Infectious Diseases**, v. 57, n. 8, p. 1114–1128, 2013.

VILLAR, L. et al. Efficacy of a Tetravalent Dengue Vaccine in Children in Latin America. **The New England Journal of Medicine**, v. 372, n. 2, p. 113–123, 1 mar. 2015.

WASAY, M. et al. Encephalitis and myelitis with dengue viral infection clinical and neuroimaging features. **Clinical Neurology and neurosurgery**. 110, p. 635-40. 2008.

WEAVER, S. C. et al. Zika Virus: History, Emergence, Biology, and Prospects for Control. **Antiviral Research**. p. 69–80, 2017.

WICHMANN, O. et al. Live-attenuated tetravalent dengue vaccines: The needs and challenges of post-licensure evaluation of vaccine safety and effectiveness. **Vaccine**, v.35, n. 42, p. 5535-5542, 9 out. 2017.

XIMENES, R. et al. Health outcomes associated with Zika virus infection in humans: a systematic review of systematic reviews. **BMJ Open**, v. 9, n. 11, p. 1–11, 2019.

ZANLUCA, C. et al. First report of autochthonous transmission of Zika virus in Brazil. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 110, n. 4, p. 569–572, 2015.

ZHANG, N. et al. Zika Virus Disrupts Neural Progenitor Development and Leads to Microcephaly in Mice. **Cell Stem Cell**, v. 19, n. 1, p. 120–126, 2016.

ZUCKER, J. et al. Zika virus associated cognitive impairment in adolescent, 2016. **Emerging Infectious Disease**, v. 23, n. 6, p.1047-8, 1 jun. 2017.

APÊNDICE A – ARTIGO DE REVISÃO

Journal of Clinical Virology 116 (2019) 49–57



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Clinical Virology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jcv



Neurological manifestations of pediatric arboviral infections in the Americas

Aline Almeida Bentes^{a,c,1}, Erna Geessien Kroon^{b,*}, Roberta Maia de Castro Romanelli^{a,1}

^a Professor Departamento de Pediatria, Universidade Federal de Minas Gerais-Minas Gerais, Brazil

^b Professor Laboratório de Vírus, Departamento de Microbiologia, Universidade Federal de Minas Gerais, Minas Gerais, Brazil

^c Hospital Infantil João Paulo II, FHEMIG, Minas Gerais, Brazil



ARTICLE INFO

Keywords:
Neurological manifestations
Dengue virus
Zika virus
Chikungunya virus
Yellow fever virus

ABSTRACT

Dengue, Zika, Chikungunya and yellow fever viruses are arboviruses transmitted by the mosquito *Aedes aegypti*. These viruses exhibit marked neurotropism but have rarely been studied. Here, we conduct an integrative review of the neurological manifestations caused by these arboviruses in the pediatric population. Data on patients under 18 years of age were extracted from literature databases. The most frequently reported neurological manifestations were encephalitis, meningitis, seizures, hypotonia, paresis, and behavioral changes. This review highlights the importance of accurately diagnosing these arboviral infections in children and adolescents with neurological manifestations.

1. Introduction

Arboviruses are viruses transmitted by arthropods, such as mosquitoes. There are four arboviruses of increasing epidemiological importance in the Americas: Zika virus (ZIKV), Dengue virus (DENV), Chikungunya virus (CHIKV) and Yellow fever virus (YFV). All of these can be transmitted by the *Aedes* mosquito [1,2].

Due to accelerated urbanization, climate change and deforestation over the recent decades, outbreaks of arboviral infections transmitted by *Aedes* have become more frequent in the Americas, strongly impacting public health [3].

DENV is among the arboviral infections most frequently affecting humans. It is estimated that 3.9 billion people are at risk of DENV infection [4] and more than 390 million are infected annually [5].

CHIKV was initially detected in the Americas in 2013, responsible for 1 million confirmed cases in the region [6]. The ZIKV epidemic of 2015 caused more than 500,000 suspected and confirmed cases in 40 countries and territories throughout the Americas [3].

YFV is endemic in 47 countries throughout Africa, Central and South America, where localized outbreaks result in 84,000–170,000 severe cases and 29,000–60,000 deaths per year, according to the World Health Organization. [7]

All of these arboviruses cause neurological manifestations in children. Studies evaluating viral etiologies of meningoencephalitis in the

Cambodian, Chinese, Indian and Brazilian pediatric populations reported a 4.6–12% prevalence of DENV infection [8–11].

Studies performed during CHIKV outbreaks reported a 4.7–46% prevalence of pediatric neurological manifestations. [12–15] Neurological manifestation prevalence studies have not described children with ZIKV or YFV infections. However, experimental animal studies and well-documented case reports have detailed the neurotropic nature of these viruses [16–19].

Arboviral infections are increasingly important causes of neurological complications worldwide, both in cases of endemic transmission and travel-associated infections. This article analyzes the pediatric neurological complications of four arboviruses that have been reported to exhibit neurotropism.

Here, we conduct an integrative review to systematize the neurological manifestations in children and adolescents infected with clinically important arboviruses that circulate throughout the Americas and are transmitted by *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*.

We extensively searched the PUBMED, EMBASE, LILACS, MedCaribe, IBMCS, and BVS databases. Articles were searched without applying restrictions of language or date of publication. Search strategies used were always as shown in Fig. 1, which depicts a flowchart detailing our article selection and exclusion criteria.

In total, 196 manuscripts describing neurological manifestations resulting from any one of the four arboviral infections were identified;

* Corresponding author at: Laboratório de Vírus, Departamento de Microbiologia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil. Av. Antônio Carlos, 6627 - Pampulha - Belo Horizonte - MG, CEP 31270-901

E-mail addresses: alinebentes2000@gmail.com (A. Almeida Bentes), kroone@icb.ufmg.br (E.G. Kroon), rmromanelli@gmail.com (R.M.d.C. Romanelli).

¹ Address: Faculdade de Medicina, Departamento de Pediatria, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil. Av. Prof. Alfredo Balena, 190-Santa Efigênia - Belo Horizonte - MG, CEP 30130-100, Telephone: 55 31 99774 0438.

<https://doi.org/10.1016/j.jcv.2019.04.006>

Received 8 February 2019; Received in revised form 21 April 2019; Accepted 23 April 2019
1386-6532/ © 2019 Elsevier B.V. All rights reserved.

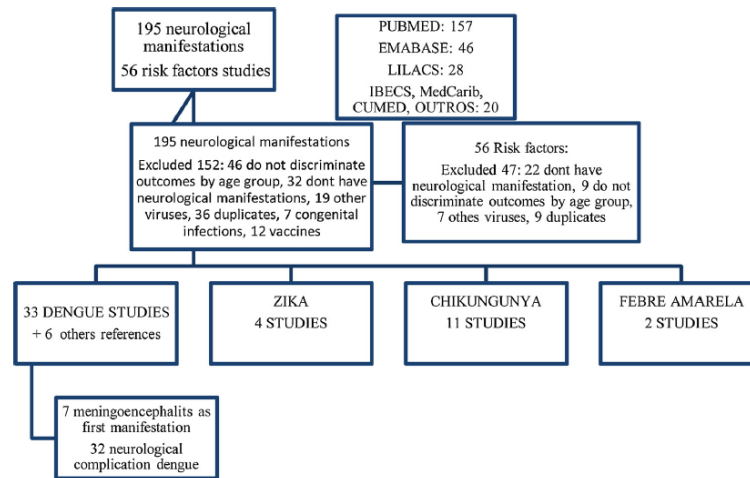


Fig. 1. Flowchart of selection of articles.

56 discussed risk factors, yet no descriptions of biomarkers for pediatric neurological complications were noted.

2. Dengue Virus (DENV)

DENV is an RNA virus of the *Flaviviridae* family. Four serotypes (DENV1-5) are transmitted by the *Aedes* mosquito and infection most frequently causes a febrile rash syndrome that lasts for about seven days. [20]

Since 1976, encephalopathy has been described as a complication of severe dengue. [21] However, recent studies have described meningitis, encephalitis, and seizures as neurological manifestations of DENV infection in patients without symptoms of classical or hemorrhagic dengue [8–10].

Murthy et al. [22] and Solbrig et al. [20] classified the neurological complications caused by DENV based on three neuropathogenic mechanisms: (1) invasion of the central (CNS) and peripheral (PNS) nervous systems leading to meningitis, encephalitis, myelitis and paresis; (2) metabolic and vascular disorders leading to encephalopathy, vasculitis and bleeding in the CNS and (3) immune-mediated dengue syndromes including acute disseminated encephalomyelitis (ADEM), neuromyelitis optica, neuritis, myelitis, encephalopathy and Guillain-Barre syndrome [20,22,23].

The neurological manifestations caused by DENV have been described mainly in case reports and series across a rather variable clinical spectrum. Thus, in order to systematize the published literature evaluating pediatric neurological complications of this virus, we classify reports into three groups.

2.1. Neurological symptoms as primary manifestations of infection

For this group, only articles that evaluated primary neurological manifestations without signs or symptoms of dengue prior to manifestations associated with nervous system invasion, at which point DENV was detected in the cerebrospinal fluid (CSF) by (RT)-qPCR, by viral isolation, or by the detection of IgM antibodies in the CSF using an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) (Table 1) were selected. [8,10,24–27].

DENV mainly infects monocytes and macrophages which can infiltrate the nervous system carrying the virus. Cell culture studies have shown that human neurons are permissive to DENV infection and

maintain active viral replication. The detection of RNA or viral antigen in CSF, inflammatory cell infiltrates and intrathecal synthesis of specific antibodies confirm active DENV CNS invasion [20,28,29].

Studies evaluating the detection of CSF DENV antibodies in the setting of DENV CNS infection reported a sensitivity of 46% and specificity of 95–97% for ELISA detection of IgM when compared to the gold standard CSF viral genome detection [29–31].

Of all children evaluated in these seven studies (1672), 3.2% (53) of those with neurological manifestations were diagnosed for dengue by detection of specific CSF IgM antibodies (18.9%) or by PCR of or viral isolation from the CSF (81.1%). The most frequent neurological manifestations in these children during their hospital stay were meningeal signs (18.8%), seizures (27%), signs of intracranial hypertension (10.4%), muscle weakness (6.3%) and encephalitis characterized by a decreased level of consciousness (58.3%). CSF analysis of all children suffering neurological manifestations of DENV revealed discrete pleocytosis with normal protein and glucose levels. Among these children, 5.7% died and 3.8% suffered neurological sequelae at hospital discharge. The most frequently reported sequelae were spasticity, paresis, muscle weakness and difficulty walking (Table 1).

2.2. Neurological manifestations associated with dengue symptoms

In this second group, all 25 publications that described neurological symptoms in patients with signs and symptoms of classical or hemorrhagic DENV were included. In total, 7685 children with dengue symptoms were studied, of which 271 (3.5%) suffered neurological manifestations. Of these patients, 76.7% were diagnosed using serological tests, non-structural protein 1 (NS1) detection or serum sample PCR; 14.2% were diagnosed by CSF PCR or viral isolation from the CSF; 9.2% were found to have CSF positive for DENV IgM (Table 2).

Among children with dengue and neurological symptoms evaluated using CSF PCR (82 children), positivity was found to be 39%. Among children in whom detection of specific CSF IgM antibodies was performed (95), positivity was found to be 26.3%. Methodology, however, differed among these 25 studies. In six studies, CSF was not evaluated in another six, no CSF changes were found. The remainder of the studies described CSF pleocytosis or elevated protein levels.

Computed tomography (CT) or magnetic resonance imaging (MRI) was performed in 12 studies; the most commonly reported finding was cerebral edema in 33 children. [33–37] Signal hyper intensity was also

Table 1
Neurological manifestations associated with CNS invasion by DENV in children^a.

Neurological manifestations	Liquor ^{**}	Diagnostic method	Number + dengue / children number with neurological manifestation	Outcomes/ complications	Reference / Country
Meningitis, encephalitis, signs of intracranial hypertension	Leuk < 200 PMN Prot normals	PCR	5 / 70	All recovered at discharge	Oliveira et al, 2017 [10] Brasil
Meningitis, seizure	Leuk: 1-176 PMN; 1-86 Gluc; 45-75 Prot; 11-97	PCR	7 / 22	Not rated complications at discharge	Marinho et al, 2017 [24] Brasil
Encephalitis	Leuk > 4 Prot > 40	13 PCR + 5 IgM +	18 / 1160	Not rated complications by etiological agents	Horwood et al, 2017 [8] Cambodja
Meningitis or encephalitis	pleocytosis	IgM +	3 / 24	Not rated complications at discharge	Bernández et al, 2011 [32] Venezuela
Seizure, glasgow < 9, meningitis muscle weakness	No alteration	PCR	9 / 194	11% death and 11% serious complication	Le van Tan et al, 2010 [25] Vietna
Encephalitis, myelitis, seizure	Prot > 45	2 viral isolation, 3 PCR + 2 IgM +	7 / 150	14% paresis and spasticity at discharge	Soloman et al, 2000 [26] Vietna
Encephalitis	Leuc: 14-140	PCR	4 / 52	2 deaths	Srey et al, 2002 Cambodja [27]

^a Proven by DENV-specific IgM antibody detection, RT-PCR, or CSF virus isolation.

^{**} Leuk: leukocytes, PMN: polymorphonuclear, Gluc: glucose (mg / dl), Prot: protein (mg / dl).

reported in the temporal lobes, corpus callosum or globus pallidus in four patients, subarachnoid hemorrhage in two children and laminar cortical necrosis in one [38–42]. Studies that included autopsy findings reported moderate cerebral edema and subarachnoid hemorrhages [43,44].

Electroencephalographic findings of children with seizures subsequent to DENV infection were evaluated in five studies which reported the onset of slow theta and delta waves with complete resolution 15–30 days later. [33,37,42,45,46] The most frequent neurological manifestations with which patients presented during hospitalization, as shown in Table 2, were encephalitis or encephalopathy (56.5%), generalized or focal seizures (42.8%), coma (12.2%), meningitis (7.4%), motor alterations, hyporeflexia (7%) and cranial nerve palsies (3.3%).

Of all patients suffering neurological manifestations of DENV infection in these studies, 17.3% died and 3.3% continued to suffer neurological sequelae at discharge or even months after initial symptoms. Patients with systemic dengue symptoms associated with neurological complications were found likely to mount a more exacerbated inflammatory response to viral infections and have a higher probability of death [29,31].

As the inflammatory response exacerbated by DENV infection triggers a cascade of cytokines and inflicts marked vascular, metabolic and hepatic damage, neurological manifestations in this group of patients may be due to both the neurotropism of this virus, which results in direct neuronal injury, as well as secondary to metabolic disturbances subsequent to vasculitis or CNS bleeding [29,31,47].

2.3. Immunologically-mediated neurological manifestations subsequent to dengue infection

Acute disseminated encephalomyelitis, Guillain-Barre syndrome and transverse myelitis are neurological manifestations described after DENV infections that are immune-mediated. Nonspecific activation of auto reactive T cells leads to the destruction of the myelin sheath subsequent to molecular mimicry mechanisms of DENV infection in some patients. Neuropathogenic mechanisms involved in such neuroimmune disorders are complex and include activation of the inflammatory cascade [33].

Seven reports of cases concerning immune-mediated conditions subsequent to DENV infections were identified. All patients described suffered dengue symptoms days before any neurological manifestations and were diagnosed by serological tests. None of these cases resulted in death. Although all of these patients received treatment (e.g. immunoglobulin or corticosteroid therapy), all manifested with neurological sequelae on discharge or months after initial clinical assessment. The most commonly reported sequel was muscle weakness with difficulty walking (Table 3).

One of the limitations of this review was that most studies included were case reports or case series describing neurological manifestations noted in patients infected with DENV. The 11 studies described 24 children with neurological complications who were identified weeks or months after discharge. However, 10 of these studies were solely descriptive and it was not possible to infer if the neurological complications after DENV were significant when compared to other viral encephalitis. Only the study by Chokepharkbuil⁵⁵ that compared children suffering different viral encephalitis and followed them for six months described a better prognosis in patients with dengue encephalitis; all children recovered completely within two weeks.

Laboratory results and clinical symptoms were evaluated in three publications that described the risk factors for neurological complications in children suffering DENV. Cam et al. (2001) [36] compared 27 children infected with DENV that suffered neurological symptoms with a control group matched for age and symptom severity but without these complications. Transaminase, bilirubin, alkaline phosphatase, and D dimer elevation, as well as a reduction of prothrombin activity, were statistically significant in relation to the control group.

Table 2
Neurological manifestations in children with signs and symptoms of dengue.

Dengue symptoms	Neurological manifestation	Liquor**	Diagnostic method	Number children with neurological manifestation/ Number dengue	Outcomes/ Complications	Reference; Country
Leukopenia, Thrombocytopenia, increased transaminases and fever	Encephalitis with cortical laminar necrosis	No alteration	+ serum IgM	1 case report	Recovered at discharge	Garg et al., 2017 [38] India
Dengue shock	Hemicontusion-hemiplegia and epilepsy (HHE)	Not described	+ serum NSI	1 case report	Focal seizures for 1 year	Saini et al., 2017 [35] India
Dengue fever (DF) or hemorrhagic dengue fever (DHF)	Encephalitis, motor weakness, transverse myelitis, ADEM and Guillain-Barré	pleocytosis, Prot > 45	+ serum IgM or NSI + CSF IgM in 2 children	20 / 71	25% death in the group with neurological symptoms	Sil et al., 2016 [34] India
DF	Encephalopathy, delirium, ophthalmoplegia	Not described	+ serum PCR, IgM or NSI + CSF PCR	1 case report	Recovered at discharge	Choong Yi Fong et al., 2016 [39] Malaysia
Fever and headache	Meningitis, oculomotor nerve palsy, diplopia	No alteration	+ serum IgM	1 case report	After 2 weeks partial ptosis	Biswas et al., 2014 [40]
Fever, headache, arthralgia	Meningitis and encephalopathy	Leuk 133-460 Prot:45-53	+ CSF IgM e NSI	4 cases reports	50% óbito	Anuj et al., 2012 [30] Brasil
Fever, headache and thrombocytopenia	Meningitis	Leuk: 86 Prot: 116	+ CSF and serum IgM, + serum NSI	1 case report	All recovered at discharge	Goswami et al., 2011 [48] India
Rash, bleeding, thrombocytopenia, edema and hepatomegaly	Convulsion, meningitis, cranial nerve palsy, neurological deficits, Encephalopathy; change in level of consciousness and mental confusion	pleocytosis, Prot > 40	21 + CSF PCR, 9 + serum PCR, 10 + serum IgM or HI + CSF PCR	39 children	23% death in the group with neurological symptoms	Kumar et al., 2008 [49] India
All DF or DHF	Encephalopathy, ADEM, subarachnoid hemorrhage	No alteration	+ CSF PCR	4 cases report	Sequelae not reported	Domingues et al., 2008 [50] Brasil
DHF		Pleocytosis	+ serum IgG or IgM	24/109	3 deaths, 2 evolved with permanent neurological sequelae	Kamath et al., 2006 [51] India
Fever, headache, myalgia and thrombocytopenia	Encephalitis with ptosis and ataxia	Leuk:10 Prot: 11	Serum and CSF IgM	1 case report	Recovered at discharge	Muzaffar et al., 2006 [41] India
All with dengue fever (DF) or hemorrhagic dengue fever (DHF)	Seizures and hyporeflexia	Leuk: 0-350 Prot: 24-128	+ serum IgM	4 cases report	25% partially recovered	Misra et al., 2006 [42] India
Febre e plaquetopenia	Encephalitis and seizures	Leuk:0 Prot:744	+ serum and CSF IgM	1 case report	death	Wiyathawornwong P et al., 2005 [52] Tailândia
DHF	Flaccid paralysis	Not done	+ serum IgM	2 cases report	After 3 months a child can not walk	Kohita et al., 2005 [53] India
DHF	Coma, seizures hemiplegia	No alteration	14 + CSF IgM, only one children + PCR	27/ 5400	22% death in the group with neurological symptoms	Cam et al., 2001 [36] Vietná
DHF or dengue shock	Encephalitis, convulsion, spasticity, hemiplegia	Leuk:0-40	+ serum IgM	80/1493	5% death, 1 patient with spasticity and permanent muscular weakness	Pancharoen C et al., 2001 [54]
DHF	Encephalitis, meningitis	No alteration	+ serum IgM or PCR, 2 blood viral isolation	8 cases report	All recovered at discharge	Chokphar-bulkit et al., 2001 [55] Tailândia
Hemoconcentration, leukopenia thrombocytopenia	seizure, cranial nerve palsy, meningism, papilledema	Prot > 40	4 + serum PCR, 2 blood viral isolation, 2 + serum IgM	8 / 44	All recovered at discharge	Kankirawatana et al., 2000 [56] Tailândia
DHF	Encephalopathy, encephalitis, hepatic encephalopathy	Leuk > 5 Prot: > 45	1 + CSF IgM, 1 + serum IgM, 1 blood viral isolation	3 cases report	33% febril seizure 20 months after encephalitis	Solomon et al., 2000 [26] Vietná
DHF	Seizure and coma	Not done	+ PCR brain tissue	1 case report	death	Ramos et al., 1998 [43] México
DHF	Encephalitis	Not done	Monoclonal antibody in brain tissue	3 cases report	deaths	Bhoopat L et al., 1996 [57] Tailândia
Dengue shock	Seizure and meningitis	Pleocytosis	CSF Viral isolation	6 cases report	16,7% death 16,7% residual palsy	Lum et al., 1996 [37] Malaysia
DHF	Focal seizure, fever and headache	pleocytosis	blood viral isolation	1 case report	Recovered at discharge	Sistayananarian et al., 1996 [58] Tailândia
Dengue shock	Encephalitis, convulsion	Not done	IgM + sangue	12/ 505	25% death	Thiyakorn et al., 1994 [59] Tailândia

(continued on next page)

Table 2 (continued)

Dengue symptoms	Neurological manifestation	Liquor**	Diagnostic method	Number children with neurological manifestation/ Number dengue	Outcomes/ Complications	Reference; Country
DHF	Encephalitis, convulsion, coma, spasticity	No alteration in five children	IgM + sangue, 4 isolamentos virais tecidos	18 children	55,5% death	Nimmanya-ia et al 1987, [44]Tailândia

* diagnosis made by RT-PCR, viral isolation or serology in blood or CSF

** Leuk: leukocytes, PMN: polymorphonuclear, Gluc: glucose (mg / dl), Prot: protein (mg / dl).

Table 3

Neurological manifestations in children post DENV infection.

Neurological manifestation/ Age	Liquor**	Time between dengue and neuro symptoms	Treatment	Outcomes/ complications	Reference/ Country
Transverse myelitis 12 years	Not done	8 days	Methylprednisolone, immunoglobulin and plasmapheres	Muscle weakness with walking difficulty for 6 months	Fong et al, 2016 [39]Malasia
Encephalitis with Parkinsonism 6 years seizures and difficulty of ambulation 12 years	No alterations High leukocytes and proteins	11 days No reported	3d Methylprednisolone dexamethasone 7d Risperidone 1 mg/dia	No neurological deficits after 7 weeks Persistent behavioral change 60 days later	Fong et al, 2014 [45]Malasia Baldeacana et al, 2013 [60]
ADEM 13 years	Leuk: 60 Prot: 360 Gluc: 45	5 days	3d Methylprednisolone dexamethasone 2wks + prednisolone 6 wks	At discharge he still had ataxia and dysarthria	Chowdhury et al 2011 [61] India
Guillain-Barre 6 years	Leuk: 60 Prot: 360 Gluc: 45	20 days	immunoglobulin 400 mg/kg for 5 days	5 months later still had tetraparesis, sensorial alterations and hyporeflexia	Gonçalves et al, 2011 [62] Brasil
tetraparesis, dysphagia, behavioral change + optic atrophy 10 years	Pleocytose	1 week	No reported	4 months still dependent on walker and maintained behavioral change	Palma da Mata et al, 2004 [63]Brasil
Guillain-Barre 14 years	Leuk: 2 Prot: 56	10 days	No reported	8 months after wandering without support, but remained with deep arreflexia	Palma da Mata et al, 2004 [63] Brasil

** Leuk: number of leukocytes, Gluc: glucose (mg / dl), Prot: protein (mg / dl).

However, the cross-sectional study by Sil et al. (2016) [34] found no statistically significant difference between 20 children with dengue who suffered neurological symptoms and 51 children with dengue who did not in relation to thrombocytopenia, hemorrhage, elevated transaminase levels, hepatomegaly and jaundice.

Kumar et al. (2008) [49] compared 39 children admitted with dengue and neurological complications to 130 children with acute febrile encephalopathy but without dengue symptoms. Rash, gastric and other bleeding, edema, hepatomegaly, hypoalbuminemia, elevated prothrombin time and pleural effusion were significantly more prevalent in the dengue group.

Such conflicting results indicate that a greater number of studies are needed to accurately compare cases with control-matched neurological outcomes and better define risk factors as well as biomarkers for neurological complications in DENV patients. In addition, prospective studies are necessary to evaluate the prognosis of neurological manifestations. Studies that evaluated infants exposed to perinatal mother-to-child dengue virus infection did not report neurological manifestations in these children. Perinatal dengue infection was associated with increased maternal and perinatal mortality, prematurity, low birth weight, thrombocytopenia and sepsis symptoms in the newborns [64–68].

3. Zika virus (ZIKV)

ZIKV is a single-stranded RNA virus of the Flavivirus genus and the Flaviviridae family. ZIKV was first isolated from the Zika forest of Uganda in 1947. As early as 1952, experimental inoculation of rats with the virus revealed its neurotropism as evidenced by cerebral edema and neuronal degeneration [69].

ZIKV infection during pregnancy has been associated with fetal loss, microcephaly, subcortical calcifications, cerebellar hypoplasia, congenital contractures, arthrogyposis and retinal changes [70]. However, there are few reports of neurological manifestations secondary to ZIKV infection acquired among pediatric patients.

An extensive search of the literature identified only four reports of cases concerning pediatric ZIKV acquired infection with neurological manifestations [71–74]. Although reports were scarce and described few cases, the diversity of neurological manifestations was remarkable and included hemiparesis, myelitis, Guillain-Barre syndrome, cortical infarction and behavioral changes. CSF analysis revealed pleocytosis with normal protein and glucose levels in three of the four cases.

ZIKV was detected by PCR in the CSF of only one patient, yet all suffered persistent neurological symptoms for at least one month after initial manifestations. In other cases, diagnoses were made with PCR analyses of other specimens (i.e. blood and urine) or positive IgM. None of the children infected with ZIKV died (Table 4).

4. Chikungunya virus (CHIKV)

CHIKV is a single-stranded RNA virus of the *Alphavirus* genus and the *Togaviridae* family [75]. The pathophysiology of the neurological complications caused by CHIKV is not fully understood. Studies evaluating the histopathology of neuronal lesions have reported cerebral edema; frontal, occipital and internal capsule ischemia; hemorrhages; demyelination and periventricular cavitation [76,77]. Minimal microgliosis was reported to occur in cortical gray matter and the diencephalon along with periventricular lymphocytic infiltrate [15,76–78].

The 11 studies that assessed children with neurological manifestations subsequent to CHIKV infection were found to have applied varying methodologies. Of these studies, six were retrospective and five cross-sectional. In nine of these publications the studied children presented with clinical symptoms of CHIKV infection and those that manifested neurological features were evaluated. Only six studies evaluated neurological sequel; one evaluated children 3 years after discharge. Of the 554 children treated for CHIKV infection 24% were

Table 4
Neurologic manifestations in children associated with ZIKV infection.

Zika symptoms	Neurological Manifestations/ Age	Liquor**	Diagnostic method	Outcomes/ complication	Reference/ Country
Fever, rash, conjunctivitis	Hemiparesis, cortical infarction 10 months	Leuk: 8 Prot:18 Gluc: 61	+ PCR serum	Arm weakness after 3 months, walked at 1 year and 3 months	Landais et al., 2017 [71] Guadeloupe Island
No symptoms	Guillain-Barre 9 years	High leukocytosis and protein in CSF	+ serum IgM, + PRNT CSF	No sequelae after 4 months	Raboni et al., 2017 [72] Brazil
Sore throat, headache, rash, arthralgia	Recent memory loss, slowed speech, impulsivity, regression 13 years	Leuk: 8 Prot:30 Gluc: 55	+ urine PCR, + CSF IgM	15 weeks after symptoms still persisted	Zucker et al., 2016 [73] United States
Headache, arthralgia and conjunctivitis	Hemiparesis, myelitis 15 years	No alterations	+ PCR CSF, blood and urine	1 month afterwards maintained moderate weakness in the legs	Mécharles et al., 2016 [74] Guadeloupe Island

** Leuk: number of leukocytes, Gluc: glucose (mg / dl), Prot: protein (mg / dl).

found to suffer neurological complications. Two other studies that together evaluated 1118 children with meningoencephalitis reported a CHIKV prevalence of 2.8% as the etiological agent. The prevalence of pediatric neurological manifestations subsequent to CHIKV infection varied according to the methodology used in the study.

All studies were performed during epidemic periods of infection and 90% of children were diagnosed by PCR. Among the studies that utilized CSF analysis, leukocytosis and high protein levels were reported in 48.7% of cases.

Electroencephalography was performed in 45 children and revealed changes such as slowing waves and paroxysmal peaks in 68.9%. [12–15] Cranial CT was performed in 51 children and cranial MRI was performed in 45 children. CT and MRI changes were found to be present in 23.5% and 20% of children, respectively. The most commonly described changes on imaging were cerebral edema and T2-weighted white matter and limbic area signal intensity [12–15,79,80].

The most common neurological manifestations found in these children were seizures (56.3%), encephalitis (41.7%), meningism (19.4%) and behavioral changes (8.7%). Of these children, 5.6% died and 8.5% developed neuronal sequelae. The commonest sequelae were seizures, hypertonia, hypotonia, behavioral disturbances, developmental delay and finger gangrene (Table 5). The CHIMERE Cohort Study on Reunion Island compared the cognitive development of 33 chikungunya-infected children during the perinatal period with 135 uninfected pairs [81]. They found that 51% of infected children had cognitive developmental delay at 2 years of age, compared to only 15% of uninfected children. In the multivariate analysis, perinatal CHIKV infection was an independent factor for delayed child development, increasing by about three times the risk of delay, after controlling for microcephaly, maternal social status and restricted intrauterine growth [81]. Children who at birth had severe encephalopathy evolved with more significant developmental delays. Among the 12 cases of children with neonatal encephalopathy, five evolved with microcephaly and four with cerebral palsy. The main developmental delays detected in children with perinatal chikungunya virus infection were language and coordination (57%), sociability (36%) and movement / posture (27%) [81].

5. Yellow fever virus (YFV)

YFV is an RNA virus of the *Flavivirus genus* and the *Flaviviridae* family that causes a highly lethal febrile illness. This virus is endemic in the tropical regions of Africa and South America. [2] We identified only two studies that included children and reported neurological complications subsequent to wild-type YFV infection.

Over the course of a 1969 yellow fever outbreak in Nigeria, 103 patients were evaluated. Of these, 14 were aged less than 19 years old. Signs of CNS involvement were described in 25% of the patients during the epidemic and 8 were reported to have suffered generalized seizures [17].

A descriptive, cross-sectional, multicenter study conducted in Sudan during the 2012–2013 outbreak evaluated a total of 844 hospitalized patients and detailed patients suspected of suffering from yellow fever, including 181 patients younger than 15 years of age. This study did not discriminate outcomes by age group, but described that 15.6% of all patients suffered seizures [There is one case of perinatal infection by the sylvatic virus of yellow fever. The 22-year-old mother with no prior immunization history was admitted to the intensive care unit with symptoms of severe yellow fever at 38 weeks' gestation and the cesarean section was taken. The 6-day-old infant evolved with jaundice, hemodynamic instability, encephalopathy, and seizures. Mother and baby were diagnosed by PCR in the blood and unfortunately they evolved to death in a few days [85].

6. Limitations

Although the main limitation of this review is that most studies

Table 5
Neurological manifestations in children associated with CHIKV infection.

CHIKV symptoms	Neurological Manifestations/ Number children	Liquor**	Diagnostic method	Outcomes/ complication	Reference/ Country
Fever, rash	Convulsions, encephalitis, bulging fontanelle 11 of 235 (4.7%)	Pleocytosis and high protein	+ PCR serum	EEG and CT alteration in 7 children. RMI alteration in 5. 1 death	Samma et al., 2017 [12] Honduras
Fever, rash and arthralgia	Meningoencephalitis, behavioral changes and seizures 5 of 48 (10.4%)	No reported	4 + PCR serum, 1 + IgM serum	1 death 1 child remained with behavioral change for 4 weeks	Singh et al., 2017 [80] India
Fever, rash, arthralgia, vomiting, headache	Convulsive crisis, diffuse cerebral edema 1 child 5 years	Not done	+ IgM serum	death	Sá et al., 2017 [78] Brazil
1160 Children with encephalitis	23 children encephalitis by CHIKV	Leuk > 4 Prot > 40	11 + PCR serum 6 + IgM CSF 6 + IgM serum	Not reported	Horwood et al., 2017 [8] Cambodia
Fever, rash	Encephalitis with seizures in 3 infants	Leuk: 12-70	IgM sérico + . Mães negativas	Not reported	Gupta et al., 2015 [82] India
Fever and vomiting for 2 days	Encephalitis, seizures, hyporeflexia, coma and death in children 12 years	No reported	+ PCR CSF and blood	Death	Shaikh et al., 2015 [79] India
Fever, rash and hepatomegaly	Baby 4 months with irritability, bulging fontanelle and seizure	No alterations	+ PCR and IgM serum	Without complications	Lee et al., 2010 [83] Singapore
58 children with neurological symptoms	8 children with encephalitis, meningitis, or seizures	Pleocytosis only in 2 cases	+ PCR CSF and serum	Aphasia, tardiness at school, hearing loss, gangrene fingers	Lewthwait et al., 2009 [84] India
Fever, rash and severe pain	Hypotonia, meningitis, seizures 23 of 50 (46%)	No alterations or only high protein	+ PCR CSF and serum	2 deaths and 1 child maintained eye sequelae	Bomin et al., 2008 [13] Mayotte Island
Fever, arthralgia and rash	Seizure, behavioral disorders meningism 23 of 86 (27%)	Pleocytosis with moderate protein	+ PCR or IgM 8 children with + PCR CSF	1 death	Ernoult et al., 2008 [14] La Reunion Island
Fever, arthralgia and rash	Encephalitis, seizures, encephalopathy, meningitis 26 of 103 (25%)	1 CSF with leukocytosis e 1 CSF with high protein	+ PCR serum or CSF	2 deaths 3 children with neurological sequelae at discharge	Robin et al., 2008 [15] La Reunion Island

** Leuk: number of leukocytes; Gluc: glucose (mg / dl), Prot: protein (mg / dl), CSF: liquor.

included were case reports, case series and retrospective studies, several studies reported viral detection in the CSF either by viral isolation or RT-PCR, underscoring the neurological effects these viruses produce in the pediatric population. Further studies concerning etiological detection of different viral agents that cause neurological manifestations in children, case-control studies assessing risk factors and biomarkers, and prospective studies evaluating long-term neurological sequel are required.

7. Conclusion

No specific antiviral therapies are available for any of the arboviral infections discussed in this review. Only the yellow fever vaccine, available since 1939, has a 92–95% efficacy in protecting against severe forms of this infection [86]. The commercially available DENV vaccine has a low effectiveness of around 60%, with a greater effectiveness for severe forms of the secondary infection at 83.7% vs. 43.2%. A phase 3 study in children younger than 9 years of age revealed a higher risk of hospitalization for severe dengue in vaccinated children when compared to the control group (RR = 7.45, 95% CI, 1.15–313.8). Therefore, World Health Organization (WHO) has recommended vaccination only in patients with previous dengue infection [87,88].

Vaccines for ZIKV [89,90] and CHIKV [91,92] are in the pre-clinical stages of development with the eventual aim of preventing the severe complications of these infections via immune modulation. Arboviruses are major public health issues worldwide. Recent studies have increased our understanding of the neurological complications caused by these infections. Epidemiological factors, population displacements and increasingly alarming climate changes highlight how necessary it is for pediatricians and neurologists to readily recognize neurological manifestations caused by these viruses and provide accurate and timely diagnoses that will, in turn, result in effective infection management and patient treatment.

Funding

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors. EGK is a fellow Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG).

Acknowledgements

We thank colleagues from the Virology Lab of Minas Gerais Federal University for their excellent technical support. We thank all the workers at the João Paulo II Hospital and the children who were treated at this hospital with neurological manifestations that inspired us to carry out this review.

References

- [1] J. Patterson, M. Sammon, M. Garg, Zika Dengue, Chikungunya, Emerging arboviruses in the new world, *Western J. Emerg. Med.* XVII (November (6)) (2016).
- [2] P.F.C. Vasconcelos, Yellow fever, *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 36 (March (2)) (2003) 275–293.
- [3] S. Ali, O. Guglielmi, S. Harber, A. Harrison, L. Houle, J. Ivory, et al., Environmental and social change drive the explosive emergence of zika virus in the Americas, *PLoS Negl. Trop. Dis.* 11 (2017).
- [4] O.J. Brady, Pw Gething, S. Bhatt, Jp Messina, Js Brownstein, et al., Refining the global spatial limits of dengue virus transmission by evidence based consensus, *PLoS Negl. Trop. Dis.* 6 (8) (2012) e1760.
- [5] G. Bhatt, V. Bondre, G. Sapkal, T. Sharma, S. Kumar, M. Gore, K. Kushwaha, A. Rath, Changing clinico-laboratory profile of encephalitis patients in the eastern Uttar Pradesh region of India, *Trop. Doct.* 42 (April (2)) (2012) 106–108.
- [6] Pan American Health Organization, Number of Reported Cases of Chikungunya Fever in the Americas, by Country or Territory 2013–2014—EW 52, Available at: <http://www.paho.org> Accessed 22, September 2018 (2018).
- [7] C.I. Paules, A.S. Fauci, Yellow fever — once again on the radar screen in the Americas, *N. Engl. J. Med.* (2017).
- [8] P.F. Horwood, V. Duong, D. Laurent, M. Mey, H. Sothy, K. Santy, et al., Aetiology of Acute Meningoencephalitis in Cambodian Children, 2010–2013. *Emerging Microbes & Infections*, (2017).
- [9] Junhong Ai, Z. Xie, G. Liu, Z. Chen, Y. Yang, J. Chen, G. Zheng, K. Shen, Etiology and prognosis of acute viral encephalitis and meningitis in Chinese children: a multicentre prospective study, *BMC Infect. Dis.* 17 (2017) 494.
- [10] D.B. Oliveira, T.M. Candiani, A.P.M. Franco-Luiz, Gm.F. Almeida, J.S. Abrahão, M. Rios, R.S. Coimbra, E.G. Kroon, Etiological agents of viral meningitis in children from a dengue-endemic area, Southeast region of Brazil, *J. Neurol. Sci.* 375 (2017) 390–394.
- [11] P. Jain, A. Jain, A. Kumar, S. Prakash, D.N. Khan, K.P. Sing, R.K. Gasrg, R. Kumar, A. Kumar, Epidemiology and etiology of acute encephalitis syndrome in North India, *Jpn. J. Infect. Dis.* 67 (2014) 197–203.
- [12] J.A. Samra, N.L. Hagood, A. Summer, M.T. Medina, K.R. Holden, Clinical features and neurologic complications of children hospitalized with Chikungunya virus in Honduras, *J. Child Neurol.* 32 (8) (2017) 712–716.
- [13] A. Le Bomin, J.C. Hebert, P. Marty, P. Delaunay, Confirmed chikungunya in children in Mayotte. Description of 50 patients hospitalized from February to June 2006, *Medecine Tropicale* 68 (5) (2008) 491–495.
- [14] S. Ernould, H. Walters, J.L. Alessandri, B. Ilanas, M.C. Jaffar, S. Robin, T. Attali, D. Ramful, J.C. Combes, Chikungunya in paediatrics: epidemic of 2005–2006 in Saint-Denis, reunion island, *Arch. Pediatr.* 15 (2008) 253–262.
- [15] S. Robin, D. Ramful, F. Le Seach, Mc Jaffar-Bandejee, G. Rigou, J.L. Alessandri, Neurologic manifestations of pediatric chikungunya infection, *J Child Neurol.* Sep 23 (9) (2008) 1028–1035.
- [16] H.A. Alhakimi, O.G. Mohamed, H.S.E. Khogaly, K.A.O. Arafa, W.A. Ahmed, Epidemiological, clinical and entomological characteristics of yellow fever outbreak in Darfur 2012, *AIMS Public Health* 2 (1) (2015) 132–141.
- [17] E.M.M. Jones, D.C. Wilson, Clinical features of yellow fever cases at Vom Christian Hospital during the 1969 epidemic on the Jos Plateau, Nigeria, *Bull. World Health Org* 46 (1972) 653–657.
- [18] T. Liu, T.J. Chambers, Yellow fever virus encephalitis: properties of the brain associated T-Cell response during virus clearance in normal and gamma interferon-deficient mice and requirement for CD41 lymphocytes, *J. Virol.* 75 (5) (2001) 2107–2118.
- [19] Hongda Li, L. Saucedo-Cuevas, S. Shresta, J.G. Gleeson, The neurobiology of zika virus, *Neuron* 92 (December 7) (2016).
- [20] M.V. Solbrig, G.C. Perng, Current neurological observations and complications of dengue virus infection, *Curr. Neurol. Neurosci. Rep.* 15 (2015) 29.
- [21] T. Sanguanersmsri, B. Poneprasert, B. Phornphutkel, Acute Encephalopathy Associated with Dengue Infection, *SEAMEO TROPMED*, Bangkok, 1976, pp. 10–11.
- [22] J.M. Murthy, Neurological complications of dengue infection, *Neurol. India* 58 (4) (2010) 581–584.
- [23] P.K. Mauraya, D. Kulshrestha, A.K. Singh, A.K. Thacker, Rapidly resolving weakness related to hypokalemia in patients infected with dengue virus, *J. Clin. Neuromuscul. Dis.* 18 (2016) 72–78.
- [24] P.E.S. Marinho, D.B. Oliveira, T.M. Candiani, A.P.M. Crispim, P.P.M. Alavrenga, F.C.S. Castro, J.S. Abrahao, M. Rios, R.S. Coimbra, E.G. Kroon, Meningitis associated with simultaneous infection by multiple dengue virus serotypes in children, Brazil, *Emerg. Infect. Dis.* 23 (January (1)) (2017).
- [25] Tan Lv, Qui Pt, Ha Dq, Hue Nb, Bao Lq, et al., Viral etiology of encephalitis in children in southern Vietnam: results of a one-year prospective descriptive study, *PLoS Negl. Trop. Dis.* 4 (10) (2010).
- [26] T. Solomon, N.M. Dung, D.W. Vaughn, R. Kneen, L.T.T. Thao, B. Raengsakulrach, H.T. Loan, N.P.J. Day, et al., Neurological manifestations of dengue infection, *Lancet* 355 (2000) 1053–1059.
- [27] V.H. Srey, H. Sadones, S. Ong, M. Mam, C. Yim, S. Sor, P. Grosjean, J.M. Reynes, Etiology of encephalitis syndrome among hospitalized children and adults in Takeo, Cambodia, 1999–2000, *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 66 (2) (2002) 200–207.
- [28] M.I. Salazar, M. Perez-Garcia, M. Terreros, et al., Dengue virus type 2: protein binding and active replication in human central nervous system cells, *Transfus. Apher. Sci.* (2013).
- [29] M. Puccioni-Sohler, C.N. Soares, R. Papaiz-Alvarenga, et al., Neurologic dengue manifestations associated with intrathecal specific immune response, *Neurology* 73 (2009) 1413–1417.
- [30] F. Araujo, R. Nogueira, M.S. Araujo, A. Perdigão, L. Cavalcanti, R. Brillante, et al., Dengue in Patients with Central Nervous System Manifestations, Brazil, *Emerging Infect. Dis.* 18 (April (4)) (2012).
- [31] C.N. Soares, L.C. Faria, J.M. Peralta, M.R.G. Freitas, M. Puccioni-Sohler, Dengue infection: neurological manifestations and cerebrospinal fluid (CSF) analysis, *J. Neurol. Sci.* 249 (2006) 19–24.
- [32] F. Bermúdez, E. John, G. Levy, C. Alegria, C. Gonzalez, Kelita, et al., Frecuencia de agentes virales en niños con afectación del sistema nervioso central en el estado Zulia, Venezuela: durante el año 2007 / Incidence of viral agents in children with central nervous system affection in the state of Zulia, Venezuela: during 2007, *Kasmera* 39 (1) (2011) 49–58 ene.-jun.
- [33] L. Saini, B. Chakrabarty, H. Pastel, A. Israni, A. Kumar, S. Gulati, Dengue fever triggering hemiconvulsion hemiplegia epilepsy in a child, *Neurol. India* 65 (2017) 636–638.
- [34] A. Sil, T. Biswas, M. Samanta, M.C. Konar, A. Kumar, J. Chaudhuri, Neurological manifestations in children with dengue fever: an Indian perspective, *Trop. Doct.* 0 (0) (2016) 1–4.
- [35] R. Shishu, Kamath, S. Ranjit, Clinical Features, Complications and Atypical Manifestations of Children with Severe forms of Dengue Hemorrhagic Fever In South India, *Indian J. Pediatr.* 73 (October) (2006).
- [36] B.V. Cam, L. Fonsmark, N.B. Hue, N.T. Phuong, A. Poulsen, E.D. Heegaard,

- Prospective case-control study of encephalopathy in children with dengue hemorrhagic fever, *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 65 (6) (2001) 848–851.
- [37] L.C.S. Lum, K. Lam, Y.S. Choy, R. George, F. Harun, Dengue encephalitis: a true entity? *Am. J. Trop. Hyg.* 54 (3) (1996) 256–259.
- [38] R.K. Garg, I. Rizvi, R. Ingole, A. Jain, M.H. Singh, N. Kumar, D. Batra, Cortical laminar necrosis in dengue encephalitis—a case report, *BMC Neurol.* 17 (2017) 79.
- [39] C.Y. Fong, M.M.K. Khine, A.B. Peter, W.K. Lim, F.I. Rozalli, K. Rahmat, Mild encephalitis/encephalopathy with reversible splenic lesion (MERS) due to dengue virus, *J. Clin. Neurosci.* (2016) 1–4.
- [40] N.M. Biswas, S. Pal, Oculomotor nerve palsy in dengue encephalitis - a rare presentation, *Indian J. Med. Res.* 140 (2014) 793–794.
- [41] J. Musafar, K.P. Venkata, N. Gupta, P. Kar, Dengue encephalitis: why we need to identify this entity in a dengue-prone Region, *Singapore Med. J.* 47 (11) (2006) 975.
- [42] U.K. Misra, J. Kalita, U.K. Syan, T.N. Dhole, Neurological manifestations of dengue virus infection, *J. Neurol. Sci.* 244 (2006) 117–122.
- [43] C. Ramos, G. Sanchez, R.H. Pando, J. Baquera, D. Hernandez, J. Mota, J. Ramos, A. Flores, E. Llausas, Dengue virus in the brain of a fatal case of hemorrhagic dengue fever, *J. Neurovrol.* 4 (1998) 465–468.
- [44] S. Nimmamniya, U. Thisyakorn, V. Hemsrichart, Dengue hemorrhagic fever with unusual manifestations, *Southeast Asian J. Trop. Med. Pub. Health* 18 (3) (1987) 398–406.
- [45] C.Y. Fong, C.S. Hlaing, C.G. Tay, L.C. Ong, Post-dengue encephalopathy and parkinsonism, *Pediatr. Infect. Dis. J.* 33 (October (10)) (2014).
- [46] J. Kalita, U.K. Misra, Eeg in dengue virus infection with neurological manifestations: a clinical and CT/MRI correlation, *Clin. Neurophysiol.* 117 (2006) 2252–2256.
- [47] Dengue, zika e chikungunya: diagnóstico, tratamento e prevenção. Org Luiz José de Souza, 1 ed., Rubio, Rio de Janeiro, 2016 204 p.
- [48] R.P. Goswami, A. Mukherjee, T. Biswas, P.S. Karmakar, A. Gosh, Two cases of dengue meningitis: a rare first presentation, *J. Infect. Dev. C.* 6 (2) (2012) 208–211.
- [49] R. Kumar, S. Tripathi, J.J. Tambe, V. Arora, A. Srivastva, V.L. Nag, Dengue encephalopathy in children in Northern India: clinical features and comparison with non dengue, *J. Neurol. Sci.* 269 (2008) 41–48.
- [50] R.B. Domingues, G.W. Kuster, F.L. Onuki-Castro, V.A. Souza, J.E. Levi, C.S. Pannuti, Involvement of the central nervous system in patients with dengue virus infection, *J. Neurol. Sci.* 267 (2008) 36–40.
- [51] S.R. Kamath, S. Ranjit, Clinical features, complications and atypical manifestations of children with severe forms of dengue hemorrhagic fever in South India, *Indian J. Pediatr.* 73 (October) (2006).
- [52] P. Witayathawornwong, Fatal dengue encephalitis, *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health* 36 (January 1) (2005).
- [53] J. Kalita, U.K. Misra, A. Mahadevan, S. Shankar, Acute pure motor quadriplegia: is it dengue myositis? *Electromyogr. Clin. Neurophysiol.* 45 (2005) 357–361.
- [54] C. Pancharoen, U. Thisyakorn, Neurological manifestations in dengue patients, *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health* 32 (2001) 341–345.
- [55] K. Chokepharbulkit, P. Kankirawatana, S. Apintanapong, et al., Viral etiologies of encephalitis in Thai children, *Pediatr. Infect. Dis. J.* 20 (2001) 216–218.
- [56] P. Kankirawatana, K. Chokepharbulkit, P. Puthavathana, S. Yoksan, S. Apintanapong, V. Pongthapisit, Dengue infection presenting with central nervous system manifestation, *Journal of Child Neurology* 15 (8) (2000).
- [57] L. Bhoopat, S. Khunamornpong, Immunohistochemical characterization of a new monoclonal antibody reactive with dengue virus-infected cells in frozen tissue using immunoperoxidase technique, *Asian Pac. J. Allergy Immunol.* 14 (1996) 107–113.
- [58] A. Systayanarian, N. Maneeakarn, B. Polprasert, V. Sirisanthana, Y. Makino, T. Furkunaga, N. Sittisombute, Primary sequence of the envelope glycoprotein of a dengue type 2 virus isolated from patient with dengue hemorrhagic fever and encephalopathy, *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health* 27 (June(2)) (1996) 221–227.
- [59] U. Thisyakorn, C. Thisyakorn, W. Limpitkul, A. Nisalak, Dengue infection with central nervous system manifestations, *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health* 30 (3) (1999) 504–506.
- [60] L. Baldaçara, J.R. Ferreira, L.C.P. Seixas Filho, R.R. Venturini, O.M.V.C. Coutinho, W.C. Caramço, C.C. Fernandes, E. Vasques Junior, Behavior disorder after encephalitis caused by dengue, *J. Neuropsychiatry Clin. Neurosci.* 25 (2013) 1.
- [61] R.N. Chowdhury, M.R. Siddiqui, O.S.I. Hasan, A. Talukder, S. Nabi, T. Miah, Dengue fever as a cause of acute disseminated encephalomyelitis (ADEM), *J. Med.* 12 (2011) 185–187.
- [62] E. Gonçalves, Acute inflammatory demyelinating polyradiculopathy (guillain-barré syndrome) following dengue fever, *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo* 53 (July–August (4)) (2011) 223–225.
- [63] A.P. Cunha-Mata, S.A. Soares-Moreno, A.C. Almeida, V.A. Freitas, F.J. Carod-Artal, Complicaciones neurológicas de la infección por el virus del dengue, *Rev. Neurol.* 39 (3) (2004) 233–237.
- [64] I. Adam, A.M. Juma, H.M. Elbasher, M.S. Karsany, Maternal e perinatal outcomes of dengue in PortSudan, *Easter Sudan, Virol. J.* 7 (2010) 153.
- [65] V.P. Sinhabahu, N.R. Sathanantah, G.N. Malavje, Perinatal transmission of dengue: a case report, *BMC Res. Notes* 7 (2014) 795.
- [66] S. Sharma, S. Jain, S. Rajaram, Spectrum of maternal outcomes during dengue infection in pregnancy: an insight, *Infect. Dis. Obstetrics Gynecol.* 16 (2015).
- [67] R.M. Núñez, J.A. Zapata, H.A. García-Perdomo, D.A. Gomez, M.A.S. Velasco, Perinatal dengue: a case report, *Rev. Chil. Pediatr.* 88 (6) (2017) 765–770.
- [68] H.A.C. Feitoza, S. Koifman, R.J. Koifman, V. Saraceni, Dengue infection during pregnancy and adverse maternal, fetal, and infant health outcomes in Rio Branco, Acre State, Brazil, 2007–2012, *Cad. Saúde Pública* 33 (2017) 5.
- [69] H. Li, L. Saucedo-Cuevas, S. Shresta, J.G. Gleeson, The neurobiology of zika virus, *Neuron* 92 (December (7)) (2016).
- [70] W.J. Britt, Adverse outcomes of pregnancy-associated Zika virus infection, *Semin. Perinatol.* (2018) 1–13.
- [71] A. Landais, A. Cesaires, M. Fernandez, S. Breurec, C. Hermann, F. Delion, P. Desprez, Zika vasculitis: A new cause of stroke in children? *J. Neurol. Sci.* (2017).
- [72] S.M. Raboni, C. Bonfim, B.M. Almeida, C. Zanluca, A.C. Koish, P.R.R.P. Rodrigues, K. Kay, L.L. Ribeiro, C.N.D. Santos, Flavivirus cross-reactivity in serological tests and Guillain-Barré syndrome in a hematopoietic stem cell transplant patient: a case report, *Transpl. Infect. Dis.* 19 (August (4)) (2017).
- [73] J. Zucker, N. Neu, C.A. Chiriboga, V.J. Hinton, M. Leonardo, A. Sheikh, K. Thakur, Zika virus–Associated cognitive impairment in adolescent, *Emerging Infect. Dis.* 23 (June (6)) (2016) 2017.
- [74] S. Merchants Mécharles, C. Herrmann, P. Poullain, T.H. Tran, N. Deschamps, G. Mathon, A. Landais, S. Breurec, A. Lannuzel, Acute myelitis due to Zika virus infection, *Lancet.* 387 (10026) (2016) 1481. Apr 2.
- [75] M. Ludlow, J. Kortekaas, C. Herden, B. Hoffmann, D. Tappe, C. TREBST, et al., Neurotropic virus infections as the cause of immediate and delayed neuropathology, *Acta Neuropathol.* 131 (2016) 159–184.
- [76] K. Ganesan, A. Diwan, S.K. Shankar, S.B. Desai, G.S. Sainani, Katrak, S.M. Chikungunya, Encephalomyeloradiculitis: report of 2 cases with neuroimaging and 1 case with autopsy findings, *Am J Neurodiol* 29 (October) (2008) 1636–1637.
- [77] P. Gerardin, T. Courdec, M. Binter, P. Tournébeze, M. Renouil, J. Lemant, et al., Chikungunya virus–associated Encephalitis. A cohort study on La réunion island, 2005–2009, *Neurology* 86 (January (5)) (2016).
- [78] P.K. Oliveira Sá, M.M. Nunes, L.R. Leite, M.G.C. Campelo, C.F.R. Leão, J.R. Souza, L.R. Catellano, A.I.V. Fernandes, Chikungunya virus infection with severe neurologic manifestations: report of four fatal cases, *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 50 (March–April (2)) (2017) 265–268.
- [79] N.J. Shaikh, C.G. Raut, D.P. Sinha, M.J. Manjunath, Detection of Chikungunya virus from a case of encephalitis, Bangalore, Karnataka State, *Indian J. Med. Microbiol.* 33 (3) (2015).
- [80] A. Singh, R. Jain, Neurological manifestations of Chikungunya in children, *Indian Pediatr.* 54 (2017).
- [81] P. Gérardin, S. Samppériz, D. Ramful, B. Boumahni, M. Binter, J.L. Alessandri, et al., Neurocognitive Outcome of children exposed to perinatal mother-to-child chikungunya virus infection: The CHIMERE Cohort study on Reunion Island, *PLoS Negl. Trop. Dis.* 8 (7) (2014).
- [82] D. Gupta, A. Bose, W. Rose, Acquired neonatal Chikungunya encephalopathy, *Indian J. Pediatr.* (2015).
- [83] Y.S. Lee, S.C. Quek, E.S.C. Koay, J.W.T. Tang, Chikungunya mimicking atypical Kawasaki Disease in an Infant, *Pediatr. Infect. Dis. J.* 29 (March (3)) (2010).
- [84] P. Lewthwait, R. Vasanthapuram, J.C. Osborne, A. Begum, J.L.M. Plank, M.V. Shankar, et al., Chikungunya virus and central nervous system infections in children, India, *Emerging Infectious Diseases* 15 (February (2)) (2009).
- [85] L.M.O. Diniz, R.M.C. Romanelli, A.L. Carvalho, D.C. Teixeira, L.F.A. Carvalho, V.F. Cury, et al., Perinatal Yellow Fever: a case report, *Pediatr. Infect. Dis. J.* 38 (2019) 300–301.
- [86] J.E. Staples, J.A. Bocchini, L. Rubin, M. Fischer, Yellow Fever Vaccine Booster Doses: Recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices, 2015, *MMWR* 64 (June (23)) (2015) 19.
- [87] L. Villar, H. Dayan, J.L. Arredondo-Garcia, D.M. Rivera, R. Cunha, C. Deseda, H. Reynales, M.S. Costa, et al., Efficacy of a tetravalent dengue vaccine in children in Latin America, *N. Engl. J. Med.* 372 (January (8)) (2015) 2.
- [88] O. Wichimman, K. Vannice, E.J. Asturis, E.J.A. Luna, I. Longini, A.L. Lopez, P.G. Smith, H. Tissera, et al., Live-attenuated tetravalent dengue vaccines: the needs and challenges of post-licensure evaluation of vaccine safety and effectiveness, *Vaccine* 35 (2017) 5535–5542.
- [89] A.B. Goodman, E.J. Dziuban, K. Powell, R.H. Bitsko, G. Langley, N. Lindsey, Characteristics of children aged < 18 years with zika virus disease acquired postnatally — U.S. States, January 2015–July 2016, *CDCMMWR. Weekly* 65 (October (39)) (2016) 1082–1085.
- [90] C. Shan, A.E. Muruato, B.W. Jagger, J. Richner, B.T.D. Nunes, D.B.A. Medeiros, X. Xie, J.G.C. Nunes, et al., A single-dose live-attenuated vaccine prevents Zika virus pregnancy transmission and testis damage, *Nat. Commun.* 8 (2017) 676.
- [91] J.H. Erasmus, A.J. Auguste, J.T. Kaelber, H. Luo, S.L. Rossi, K. Fenton, G. Leal, D.Y. Kim, W. Chiu, Y. Wang, et al., A chikungunya fever vaccine utilizing an insect-specific virus platform, *Nat. Med.* 23 (2) (2017) 192–199.
- [92] P. Eldi, T.H. Cooper, L. Liu, N.A. Prow, K.R. Diener, P.M. Howlwy, et al., Production of a Chikungunya vaccine using a CHO cell and attenuated viral-based platform technology, *Mol. Ther.* 25 (October (10)) (2017).

APÊNDICE B – Questionário estruturado

IDENTIFICAÇÃO:	
1. Número de Identificação: _____	
2. Número do Prontuário: _____	Data Internação _____ Data alta: _____
3. Sexo:	
Masculino.....	1
Feminino.....	2
4. Data de nascimento: ____/____/____	
5. Estado: _____ Município: _____	
6. Zona:	
Urbana.....	1
Rural.....	2
Ignorado.....	9
7. Escolaridade (em anos): _____	

PARTE 2 – HISTÓRIA CLÍNICA	
<p>8. Comorbidades: Sim: 1 Não:2 Ignorado: 9</p> <p>1. Passado de meningite ou encefalite.....()</p> <p>2. Uso de corticóide cronicamente.....()</p> <p>3. Diabetes Melitus.....()</p> <p>4. Pneumopatia crônica.....()</p> <p>5. Nefropatia crônica.....()</p> <p>6. Distúrbios psiquiátricos.....()</p> <p>7. Doenças neurológicas.....()</p> <p>8. Uso prévio de anticonvulsivantes.....()</p> <p>9. Fístulas líquóricas.....()</p> <p>10. Déficit visual prévio.....()</p> <p>11. Déficit auditivo prévio.....()</p> <p>12. Atraso de linguagem prévio.....()</p> <p>13. Atraso do desenvolvimento cognitivo prévio.....()</p> <p>14. Atraso desenvolvimento motor prévio.....()</p> <p>15. Doenças reumatológicas.....()</p> <p>16. Uso de drogas imunossupressoras()</p> <p>17. Tuberculose.....()</p> <p>18. Imunodeficiência congênita()</p> <p>19. Imunodeficiência adquirida (HIV).....()</p> <p>18. OUTRA _____</p> <p>19. Descrever: _____</p> <p>21. Não se aplica (Quando Não acima) _____ 88</p>	DESCREVER

<p>9. Vacinas:</p> <p>1. Paciente possui esquema vacinal completo para idade? Sim: 1 Não: 2 Ignorado: 9 Esquema incompleto: 77</p> <p>2. Recebeu vacina de febre amarela até 30 dias antes ao quadro clínico de meningoencefalite ou neuropatia? Sim: 1 Não: 2 Ignorado: 9</p> <p>10. Antibióticos:</p> <p>1. Estava em uso de antibiótico nas 24 horas anteriores à punção lombar? Sim: 1 Não: 2 Ignorado: 9 Se sim, especificar: _____</p>	<p>DATA VACINA DE FEBRE AMARELA E LOTE VACINAL</p>
<p>11. Apresentou algum sintoma clínico sugestivo de infecção por dengue, zika, chikungunya ou febre amarela anterior ao quadro de meningoencefalite?</p> <p>Sim: 1 Não: 2 Ignorado: 9 Se SIM, qual: Sim:1 Não:2 Não se aplica:88</p> <p>1. Febre () 2. exantema () 3. Hiperemia conjuntival () 4. Mialgia () 5. Cefaleia () 6. Artralgia ou artrite () 7. prova do laço positiva () 8. Vômitos com dor abdominal () 9. Icterícia () 10. Aumento transaminases ()</p>	<p>DESCREVER</p>
<p>12. O paciente apresentou quais das manifestações neurológicas durante a internação hospitalar que justificaram a punção lombar:</p> <p>Sim: 1 Não: 2 Ignorado: 9 Se SIM, qual: Sim:1 Não:2 Não se aplica:88</p> <p>1. Sinais meningeos () 2.Sinais focais () 3.Sonolência () 4. Irritabilidade () 5.Convulsões () 6.Ataxia () 7. Rebaixamento sensorio () 8. Paresia ou paralisia () 9. Dificuldade deambulação ou fraqueza muscular () 10. Hipotonia () 11. Hiporreflexia () 12. Afasia () 13. Dismetria () 14. Atetose ou coréia ()</p>	<p>DESCREVER</p>
<p>13. Paciente apresentou à admissão hemograma sugestivo infecção por dengue:</p> <p>Sim: 1 Não: 2 Ignorado: 9 Se SIM, qual: Sim:1 Não:2 Não se aplica:88</p> <p>1. Hemoconcentração.....() 2. Leucopenia para idade.....() 3. Plaquetas < 150 mil()</p>	<p>ANOTAR VALORES EXAMES</p>

<p>14- Líquor admissão:</p> <p>Aspecto: _____ (Turvo, Xantocrômico, Límpido, Ignorado)</p> <p>Células/mm3 _____ PMNs____% MNs____%</p> <p>Eritrócitos/mm3 _____</p> <p>Glicose_____mg/dl</p> <p>Proteínas_____mg/dl</p> <p>Lactato:_____</p> <p>Alteração liquorica sugestiva de infecção viral? Sim:1 Não: 2 ()</p> <p>Alteração liquorica sugestiva de infecção bacteriana ? m: 1 Não: 2 ()</p>	<p>Data:</p>
<p>15. Ocorreu acidente durante a punção lombar:</p> <p>Sim.....1</p> <p>Não.....2</p> <p>Ignorado.....9</p>	<p>Número hemácias no líquido</p>
<p>16. Paciente apresentou durante a internação alteração dos seguintes exames:</p> <p>Sim: 1 Não:2 Ignorado: 9 Se SIM, qual: Sim:1 Não:2 Não se aplica:88</p> <p>1. Transaminases > 100 () 2. Bil D >2 () 3. AP < 70% ()</p> <p>4. Albumina <3 () 5. ClCr < 60 () 6. Microalbuminúria ()</p> <p>7. Prot/Cr >0,2 amostra única urina () 8. CPK > 5mil () 9. PCR > 30 ()</p> <p>Outros? Especificar quais _____</p> <p>Data alteração dos exames _____</p> <p>Data resolução das alterações _____</p>	<p>ANOTAR EXAMES</p>

3. ALTERAÇÕES EXAMES DE IMAGEM E ELETROENCEFALOGRAMA

<p>17. Tomografia de crânio</p> <p>Sim.....1</p> <p>Não foi feito.....2</p> <p>Ignorado.....9</p> <p>SE sim, qual o Resultado:</p> <p>_____</p> <p>_____</p> <p>Data do resultado __/__/__</p>
<p>18. Ressonância magnética</p>

Sim.....1 Não foi feito.....2 Ignorado.....9
SE sim, qual o Resultado: <hr/>
Data do resultado __/__/__
19. Eletroencefalograma
Sim.....1 Não foi feito.....2 Ignorado.....9
SE sim, qual o Resultado: <hr/>
Data do resultado __/__/__

PARTE 4. OUTROS QUADROS INFECCIOSOS ASSOCIADOS

20. Infecção das vias aéreas superiores Sim.....1 Não.....2 Ignorado.....9
21. Diarréia Sim.....1 Não.....2 Ignorado.....9
22. Sinais ou sintomas meningite bacteriana Sim.....1 Não.....2 Ignorado.....9 SE SIM especificar: _____
23. Apresentou hepatomegalia ? Ictericia ? Alteração função hepática? Sim.....1 Não.....2 Ignorado.....9 SE SIM especificar: _____
24. Apresentou alguma lesão de pele durante a internação ? (vesícula, bolha, petéquia, purpura, exantema macular, impetigo, etc) Sim.....1 Não.....2 Ignorado.....9

<p>SE SIM especificar: _____</p> <p>25. Apresentou injúria renal ? IRA ? Proteinúria ? Alteração Pr/CR ?</p> <p>Sim.....1 Não.....2 Ignorado.....9</p> <p>SE SIM especificar: _____</p>
<p>26. Foi realizado antibioticoterapia ?</p> <p>Sim.....1 Não.....2</p> <p>SE SIM especificar: _____ Quantos dias ?</p>
<p>27. Foi medicado com aciclovir ?</p> <p>Sim.....1 Não.....2</p> <p>Quantos dias: _____ 88 – Não se aplica</p>
<p>PARTE 5 _ COMPLICAÇÕES DURANTE A INTERNAÇÃO</p>
<p>28. Paciente apresentou sinais de hipertensão craniana: hipertensão arterial + bradicardia + bradipneia ou foi medicado com manitol ou solução salina para HIC.</p> <p>Sim.....1 Não.....0 Ignorado.....9</p> <p>SE SIM especificar: _____</p>
<p>29. Paciente apresentou sinais de instabilidade hemodinâmica (recebeu expansão volêmica ou aminas vasoativas)</p> <p>Sim.....1 Não.....0 Ignorado.....9</p> <p>SE SIM especificar: _____</p>
<p>30. Paciente foi medicado com anticonvulsivantes durante internação?</p> <p>Sim.....1 Não.....0</p> <p>SE SIM especificar: _____</p>
<p>31. Recebeu alta com anticonvulsivantes ?</p> <p>Sim.....1 Não.....0</p> <p>SE SIM especificar: _____</p>

32. Complicações supurativas: Sim:1 Não:0 Ignorado: 9

1. Coleção subdural.....()

2. Empiema subdural ()

3. Abscessos cerebrais()

4. Trombose séptica de seios venosos()

5. Ventriculite ()

6. OUTRAS()

7. Nenhuma.....()

8. Ignorado()

Se OUTRAS, especificar: _____

88. Não se aplica

PARTE 6 – COMPLICAÇÕES NEUROLÓGICAS	
<p>33. Complicações neurológicas durante a internação: Sim: 1 Não: 0 Ignorado: 9 Se Sim: Sim: 1 Não: 0</p> <p>1. Desmielinização detectada em RNM..... ()</p> <p>2. Outra alteração exame de imagem SNC..... ()</p> <p>3. Alteração exame EEG.....()</p> <p>4. Comprometimento de pares cranianos...()</p> <p>)</p> <p>5. Convulsões persistentes ()</p> <p>6. Deficit visual()</p> <p>7. Deficit auditivo.....()</p> <p>8. Deficit motor.....()</p> <p>9. Deficit cognitivo.....()</p> <p>10. Afasia()</p> <p>11. Hidrocefalia.....()</p> <p>13. Alteração de comportamento.....()</p> <p>)</p> <p>14. Cefaleia persistente()</p> <p>13. ataxia.....()</p> <p>14. paralisia ou paresia.....()</p> <p>15. fraqueza muscular com dificuldade para deambulação.....()</p> <p>16. hipotonia.....()</p> <p>17. hiporreflexia()</p> <p>18. dor neuropática.....()</p> <p>19. OUTRAS()</p> <p>88 Não se aplica.....()</p> <p>Se OUTRAS, especificar: _____</p>	<p>DESCREVER COMPLICAÇÃO</p>
<p>34. Complicações neurológicas e clínicas 1 mês após alta: Sim: 1 Não: 0 Ignorado: 9 Se Sim: Sim: 1 Não: 0</p>	<p>DESCREVER COMPLICAÇÕES</p>

<p>1. Desmielinização detectada em RNM..... ()</p> <p>2. Outra alteração exame de imagem SNC..... ()</p> <p>3. Alteração exame EEG.....()</p> <p>4. Comprometimento de nervos cranianos()</p> <p>5. Uso de anticonvulsivantes pós alta..... ()</p> <p>6. Deficit visual()</p> <p>7. Deficit auditivo.....()</p> <p>8. Deficit motor.....()</p> <p>9. Deficit cognitivo.....()</p> <p>10. Afasia()</p> <p>11. Alteração padrão de sono.....()</p> <p>12. Cefaleia persistente()</p> <p>13. ataxia.....()</p> <p>14. paralisia ou paresia.....()</p> <p>15. fraqueza muscular com dificuldade deambulação.....()</p> <p>16.hipotonia.....()</p> <p>17. hiporreflexia()</p> <p>18. dor neuropática.....()</p> <p>19. OUTRAS()</p> <p>88 Não se aplica.....()</p> <p>Se OUTRAS, especificar: _____</p>	
<p>35. Complicações neurológicas e clínicas 3 meses pós alta: Sim: 1 Não: 0 Ignorado: 9 Se Sim: Sim: 1 Não: 0</p> <p>1. Desmielinização detectada em RNM..... ()</p> <p>2. Outra alteração exame de imagem SNC..... ()</p> <p>3. Alteração exame EEG.....()</p> <p>4. Comprometimento de nervos cranianos()</p> <p>5. Uso de anticonvulsivantes pós alta..... ()</p> <p>6. Deficit visual()</p> <p>7. Deficit auditivo.....()</p> <p>8. Deficit motor.....()</p> <p>9. Deficit cognitivo.....()</p> <p>10. Afasia()</p> <p>11. Alteração padrão de sono.....()</p> <p>12. Cefaleia persistente()</p> <p>13. ataxia.....()</p> <p>14. paralisia ou paresia.....()</p> <p>15. fraqueza muscular com dificuldade deambulação.....()</p> <p>16.hipotonia.....()</p> <p>17. hiporreflexia()</p> <p>18. dor neuropática.....()</p> <p>19. OUTRAS()</p> <p>88 Não se aplica.....()</p> <p>Se OUTRAS, especificar: _____</p>	DESCREVER COMPLICAÇÕES
<p>36. Complicações neurológicas e clínicas 6 meses pós alta: Sim: 1 Não: 0 Ignorado: 9 Se Sim: Sim: 1 Não: 0</p> <p>1. Desmielinização detectada em RNM..... ()</p>	DESCREVER COMPLICAÇÕES

<p>2. Outra alteração exame de imagem SNC..... ()</p> <p>3. Alteração exame EEG.....()</p> <p>4. Comprometimento de nervos cranianos()</p> <p>5. Uso de anticonvulsivantes pós alta..... ()</p> <p>6. Deficit visual()</p> <p>7. Deficit auditivo.....()</p> <p>8. Deficit motor.....()</p> <p>9. Deficit cognitivo.....()</p> <p>10. Afasia()</p> <p>11. Alteração padrão de sono.....()</p> <p>12. Cefaleia persistente()</p> <p>13. ataxia.....()</p> <p>14. paralisia ou paresia.....()</p> <p>15. fraqueza muscular com dificuldade deambulação.....()</p> <p>16.hipotonia.....()</p> <p>17. hiporreflexia()</p> <p>18. dor neuropática.....()</p> <p>19. OUTRAS()</p> <p>88 Não se aplica.....()</p> <p>Se OUTRAS, especificar: _____</p>	
<p>37. Complicações neurológicas e clínicas 9 meses pós alta: Sim: 1 Não: 0 Ignorado: 9 Se Sim: Sim: 1 Não: 0</p> <p>1. Desmielinização detectada em RNM..... ()</p> <p>2. Outra alteração exame de imagem SNC..... ()</p> <p>3. Alteração exame EEG.....()</p> <p>4. Comprometimento de nervos cranianos()</p> <p>5. Uso de anticonvulsivantes pós alta..... ()</p> <p>6. Deficit visual()</p> <p>7. Deficit auditivo.....()</p> <p>8. Deficit motor.....()</p> <p>9. Deficit cognitivo.....()</p> <p>10. Afasia()</p> <p>11. Alteração padrão de sono.....()</p> <p>12. Cefaleia persistente()</p> <p>13. ataxia.....()</p> <p>14. paralisia ou paresia.....()</p> <p>15. fraqueza muscular com dificuldade deambulação.....()</p> <p>16.hipotonia.....()</p> <p>17. hiporreflexia()</p> <p>18. dor neuropática.....()</p> <p>19. OUTRAS()</p> <p>88 Não se aplica.....()</p> <p>Se OUTRAS, especificar: _____</p>	DESCREVER COMPLICAÇÕES
<p>38. Complicações neurológicas e clínicas 1 ano após alta: Sim: 1 Não: 0 Ignorado: 9 Se Sim: Sim: 1 Não: 0</p> <p>1. Desmielinização detectada em RNM..... ()</p> <p>2. Outra alteração exame de imagem SNC..... ()</p>	DESCREVER COMPLICAÇÕES

3. Alteração exame EEG.....()	
4. Comprometimento de nervos cranianos()	
5. Uso de anticonvulsivantes pós alta.....()	
6. Deficit visual()	
7. Deficit auditivo.....()	
8. Deficit motor.....()	
9. Deficit cognitivo.....()	
10. Afasia()	
11. Alteração padrão de sono.....()	
12. Cefaleia persistente()	
13. ataxia.....()	
14. paralisia ou paresia.....()	
15. fraqueza muscular com dificuldade deambulação.....()	
16.hipotonia.....()	
17. hiporreflexia()	
18. dor neuropática.....()	
19. OUTRAS()	
88 Não se aplica.....()	
Se OUTRAS, especificar: _____	

PARTE 7 _ SOROLOGIAS, CULTURAS E PCR	
39. Teste rápido dengue (NS1):	
Positivo.....1	
Negativo.....2	
Não realizado.....9	
Data do Resultado: ____/____/____	
40. Sorologia dengue: positivo sim:1 não: 2 não realizado: 9	
IgM () _____	IgG () _____
Método exame:	
Data do resultado: ____/____/____	
41. Sorologia zika: positivo sim:1 não: 2 não realizado: 9	
IgM () _____	IgG () _____
Método exame:	
Data do resultado: ____/____/____	
42. Sorologia chikungunya : positivo sim:1 não: 2 não realizado: 9	
IgM () _____	IgG () _____
Método exame:	
Data do resultado: ____/____/____	
43. Sorologia febre amarela: positivo sim:1 não: 2 não realizado: 9	
IgM () _____	IgG () _____
Método exame:	

Data do resultado: ____/____/____
44. Sorologia herpes 1 e 2: positivo sim:1 não: 2 não realizado: 9 IgM () _____ IgG () _____ Método exame: Data do resultado: ____/____/____
45. Sorologia EBV: positivo sim:1 não: 2 não realizado: 9 IgM () _____ IgG () _____ Método exame: Data do resultado: ____/____/____
46. Sorologia CMV: positivo sim:1 não: 2 não realizado: 9 IgM () _____ IgG () _____ Método exame: Data do resultado: ____/____/____
47. Hemoculturas Positivo.....1 Negativo.....2 Ignorado.....9 Se SIM, especificar: _____ Data do resultado ____/____/____
48. Resultado de culturas no líquido Bacterioscopia Positivo.....1 Negativo.....2 Ignorado.....9 Se SIM, especificar: _____ Data do Resultado: ____/____/____ Culturas / Bactéria Positivo.....1 Negativo.....2 Ignorado.....9 Se SIM, especificar: _____ Data do Resultado: ____/____/____ Látex / Bactéria Positivo.....1 Negativo.....2 Ignorado.....9 Se SIM, especificar: _____ Data do Resultado: ____/____/____ Fungos

Positivo.....1 Negativo.....2 Ignorado.....9 Se SIM, especificar: _____ Data do Resultado: __/__/____	
Micobactérias	
Positivo.....1 Negativo.....2 Ignorado.....9 Se SIM, especificar: _____ Data do Resultado: __/__/____	
49. PCR Líquor	
Positivo.....1 Negativo.....2 Ignorado.....9 Se SIM, marcar o agente: Herpes Vírus tipo 1 _____ Herpes Vírus tipo 2 _____ EBV _____ Enterovírus ____ Varicella Zoster _____ Dengue 1 _____ Dengue 2 _____ Streptococcus spp _____ Dengue 3 _____ Dengue 4 _____ Chikungunya _____ Zika _____ YFF _____ N.Meningitidis _____ H. Influenzae _____ Data do resultado __/__/__	
ARTE 8 _ ENCERRAMENTO DO CASO	
50. Condições de alta após acompanhamento clínico Melhorado.....1 Sequela.....2 Perda de seguimento.....3 Óbito.....4 Data evento ou óbito: _____	DESCRIVER SEQUELA OU CAUSA ÓBITO:
51. Diagnóstico presuntivo à alta hospitalar:	
52. Diagnóstico confirmatório:	
53. Data admissão paciente: _____	
54. Data encerramento do caso ou alta ambulatorial: _____	

ANEXO A – Parecer consubstanciado do CEP

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
MINAS GERAIS



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DA EMENDA

Título da Pesquisa: DOENÇAS INFECCIOSAS DE SISTEMA NERVOSO CENTRAL: IDENTIFICAÇÃO DE AGENTES ETIOLÓGICOS E ANÁLISE DE RESPOSTA IMUNE DOS PACIENTES

Pesquisador: Erna Geessien Kroon

Área Temática:

Versão: 8

CAAE: 66691617.2.0000.5149

Instituição Proponente: Universidade Federal de Minas Gerais

Patrocinador Principal: MINISTERIO DA CIENCIA, TECNOLOGIA E INOVACAO

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.338.633

Apresentação do Projeto:

Trata-se de emenda ao projeto de pesquisa, aprovado na versão original sob o parecer COEP-UFMG 2.724.652, cuja proposta é Identificar os agentes infecciosos das meningoencefalites e outras manifestações clínicas de sistema nervoso central (SNC) e estudar as manifestações clínicas e os parâmetros imunológicos dos pacientes.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário: 1. Identificar os agentes infecciosos das meningoencefalites e outras manifestações clínicas de sistema nervoso central (SNC) e estudar as manifestações clínicas e os parâmetros imunológicos dos pacientes. 2. Caracterizar a encefalite ou meningite aguda por arbovírus na infância quanto à apresentação clínica e seus desfechos neurológicos pós- infecção imediata e durante seguimento, assim como avaliar a associação da resposta inata ao prognóstico neurológico **Objetivo Secundário:** Detectar vírus ou outros agentes infecciosos em amostras clínicas incluindo soro, fezes, líquido, swab ocular, swab oral ou saliva e urina por qPCR; Aplicar uma plataforma de diagnóstico viral em espécimes clínicos determinando a frequência de identificação de cada agente e relacionando-os com os quadros clínicos; Isolar o agente infeccioso viral de acordo com o espécime clínico testado por qPCR; Caracterizar filogeneticamente e estabelecer a relação filogenética dos agentes infecciosos virais isolados; Avaliar o perfil de virulência dos isolados virais em modelo murino; Descrever e acompanhar as manifestações

Endereço: Av. Presidente Antônio Carlos, 6627 2º Ad SI 2005

Bairro: Unidade Administrativa II **CEP:** 31.270-901

UF: MG **Município:** BELO HORIZONTE

Telefone: (31)3409-4592

E-mail: coep@prpq.ufmg.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
MINAS GERAIS



Continuação do Parecer: 3.338.633

clínicas dos pacientes acometidos por infecções do SNC. Avaliar se há correlação entre a virulência dos isolados virais em modelo murino e as manifestações clínicas nos pacientes. Avaliar o perfil de citocinas e de marcadores do sistema imune, e correlacionar com a gravidade da doença. Associar o vírus detectado ao quadro clínico inicial à pós-infecção imediata e durante o seguimento ambulatorial. Acompanhar ambulatorialmente para avaliar evolução de desfechos clínicos e neurológicos.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Conforme descrito: Nenhum risco é diretamente esperado aos sujeitos participantes da pesquisa. O único desconforto será a picada da agulha que já será feita para a coleta do material clínico solicitado para a rotina médica. As coletas de urina, fezes e saliva não vão trazer nenhum desconforto já que não será realizado nenhum procedimento invasivo. Como benefício, poderá ser fornecido o resultado do diagnóstico ao médico do paciente, que o ajudará no tratamento do paciente tomando as medidas necessárias mais rapidamente, acompanhando a evolução do paciente da melhor forma possível e principalmente o conhecimento exato dos agentes etiológicos envolvidos em meningoencefalites no estado de MG. Os soros serão armazenados no Laboratório de Vírus da UFMG (Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas) para realizar exames de diagnóstico tais como detecções moleculares e isolamento do agente infeccioso. Os pacientes terão a informação sobre a confirmação ou exclusão da infecção pelos arbovírus. Nos casos de crianças com diagnóstico confirmado, todas serão acompanhadas clinicamente a fim de diagnosticar complicações e iniciar intervenções precoces caso essas ocorram.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Nessa emenda, a proponente menciona que serão mantidos os mesmos objetivos, porém com uma retificação na metodologia de SNP genotipagem, incluída no texto do projeto completo. A metodologia não envolve intervenções adicionais ao participante, apenas utilização de material biológico (já aprovado na pesquisa) em abordagem adicional de investigação. Há ainda inclusão de outros membros na equipe de pesquisa.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Os documentos apresentados na emenda foram Formulário de Informações Básicas com alterações na equipe, Carta de encaminhamento especificando as alterações e projeto completo com alterações relativas à emenda destacadas em cor vermelha. TALE e -TCLE aos responsáveis com alterações inseridas destacadas. Demais documentos da aprovação do projeto original disponíveis na Plataforma.

Endereço: Av. Presidente Antônio Carlos, 6627 2º Ad SI 2005
Bairro: Unidade Administrativa II **CEP:** 31.270-901
UF: MG **Município:** BELO HORIZONTE
Telefone: (31)3409-4592 **E-mail:** coep@prpq.ufmg.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
MINAS GERAIS



Continuação do Parecer: 3.338.633

Recomendações:

-

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

SMJ, a emenda está aprovada.

Considerações Finais a critério do CEP:

Tendo em vista a legislação vigente (Resolução CNS 466/12), o CEP-UFMG recomenda aos Pesquisadores: comunicar toda e qualquer alteração do projeto e do termo de consentimento via emenda na Plataforma Brasil, informar imediatamente qualquer evento adverso ocorrido durante o desenvolvimento da pesquisa (via documental encaminhada em papel), apresentar na forma de notificação relatórios parciais do andamento do mesmo a cada 06 (seis) meses e ao término da pesquisa encaminhar a este Comitê um sumário dos resultados do projeto (relatório final).

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_1323733_E3.pdf	12/05/2019 17:06:04		Aceito
Outros	Carta_de_encaminhamento1205.pdf	12/05/2019 17:04:29	Erna Geessien Kroon	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TALE5_TCLE6.pdf	12/05/2019 17:03:37	Erna Geessien Kroon	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	COEP28032019.pdf	01/04/2019 19:18:47	Erna Geessien Kroon	Aceito
Outros	Cartaanuencia.pdf	14/09/2018 12:05:30	Erna Geessien Kroon	Aceito
Outros	666916172parecerassinado.pdf	20/06/2018 14:41:28	Vivian Resende	Aceito
Outros	666916172parecerassinado.pdf	20/06/2018 14:41:28	Vivian Resende	Aceito
Orçamento	666916172aprovacaoassinada.pdf	20/06/2018 14:41:19	Vivian Resende	Aceito
Orçamento	666916172aprovacaoassinada.pdf	20/06/2018 14:41:19	Vivian Resende	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório /	biorepositorio.pdf	22/05/2018 09:03:07	Erna Geessien Kroon	Aceito

Endereço: Av. Presidente Antônio Carlos, 6627 2º Ad SI 2005

Bairro: Unidade Administrativa II **CEP:** 31.270-901

UF: MG **Município:** BELO HORIZONTE

Telefone: (31)3409-4592

E-mail: coep@prpq.ufmg.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
MINAS GERAIS



Continuação do Parecer: 3.338.633

Biobanco	biorepositorio.pdf	22/05/2018 09:03:07	Erna Geessien Kroon	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	anuencia_depto_hospital.pdf	18/05/2018 08:37:43	Erna Geessien Kroon	Aceito
Folha de Rosto	folhadrostoassinada.pdf	31/03/2017 12:23:49	Erna Geessien Kroon	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

BELO HORIZONTE, 21 de Maio de 2019

Assinado por:

**Eliane Cristina de Freitas Rocha
(Coordenador(a))**

ANEXO B – Termo de consentimento livre e esclarecido

1

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO DOS PAIS OU RESPONSÁVEIS EM CASO DE MENOR DE IDADE

Título do Projeto: “DOENÇAS INFECCIOSAS DE SISTEMA NERVOSO CENTRAL:
IDENTIFICAÇÃO DE AGENTES ETIOLÓGICOS E ANÁLISE DE RESPOSTA
IMUNE DOS PACIENTES”

Prezado Senhor (a),

Este Termo de Consentimento pode conter palavras que você não entenda. Peça ao pesquisador que explique as palavras ou informações não compreendidas completamente.

1) Introdução

Seu filho de 0 a 12 anos de idade está sendo convidado (a) a participar de uma pesquisa com o objetivo entender os agentes infecciosos que causam meningoencefalites. Para realização deste estudo é necessário proceder a coleta de materiais clínicos necessários para o diagnóstico dessa infecção quando suscitado pelos médicos. Não será coletado nada além do material clínico usado na rotina do diagnóstico do hospital. Seu filho foi selecionado porque tem suspeita clínica de meningoencefalite e sua participação não é obrigatória.

Além de participar e colaborar com estudos de meningites, os materiais clínicos coletados farão parte de um biorrepositório do LabVírus UFMG para futuras pesquisas relacionados à agentes infecciosos, principalmente agentes infecciosos virais.

2) Procedimentos do estudo

Para participar desse estudo, solicito a sua especial colaboração para ceder parte da(s) amostra(s) clínicas coletadas pela equipe médica para os exames de rotina do seu filho. Nesse sentido solicitamos sua permissão para usar uma pequena parte das amostras já coletadas (para os exames de rotina no hospital). As amostras que utilizaremos do seu filho serão de líquido cefalorraquidiano (líquor), fezes, urina, *swab* ocular, *swab* oral ou saliva, sangue total e soro.

Em caso de dúvidas, com respeito aos aspectos éticos desta pesquisa, você poderá consultar:

CEP - Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos - UFMG

Av. Antônio Carlos, 6627, Pampulha - Belo Horizonte - MG - CEP 31270-901

Unidade Administrativa II - 2º Andar - Sala: 2005/ Telefone: (031) 3409-4592 –

E-mail: coep@prpq.ufmg.br / Horário de atendimento: 09:00 às 11:00 / 14:00 às 16:00

Rubricas: Pesquisador _____ Participante _____

Essas amostras serão armazenadas para manter a maior integridade das amostras biológicas utilizadas na pesquisa. O prazo de armazenamento dessas amostras é indeterminado, sendo a manutenção de seu credenciamento subordinada ao atendimento de normas vigentes, tais como que a cada projeto que em que as amostras forem empregadas, deverão ser submetidas a um novo comitê de ética. Além disso, a cada cinco anos, contados a partir da sua constituição, ou a qualquer tempo, por solicitação da CONEP, o LabVírus apresentará relatório de atividades do período ao sistema CEP/CONEP, constando, obrigatoriamente, o número de sujeitos incluídos no período e a relação de pesquisas que utilizaram amostras armazenadas.

3) Riscos e desconfortos

Os únicos desconfortos que seu filho poderá passar será durante a coleta do material clínico, o líquido e o sangue. Entretanto os volumes coletados serão pequenos, a coleta será realizada por médicos/técnicos treinados que darão todo o auxílio necessário. O líquido e o sangue utilizados na pesquisa será parte do coletado para seus exames na rotina do hospital.

4) Benefícios

Como resultado deste estudo, teremos informações que possam preencher lacunas importantes no conhecimento sobre as meningoencefalites e que possam no futuro ajudar no controle desses agentes infecciosos do sistema nervoso central. Estas informações podem ser de grande utilidade para os gestores de saúde, médicos e outros pesquisadores para o controle desses agentes. Porém, essa pesquisa não traz nenhum benefício direto para o tratamento do seu filho.

5) Custos/Reembolso

Você e seu filho, não terão nenhum gasto com a sua participação no estudo e também não receberá pagamento pelo mesmo.

6) Responsabilidade

Efeitos indesejáveis são possíveis de ocorrer durante a coleta do líquido, sangue e *swabs*, apesar de todos os cuidados possíveis, e podem acontecer sem que a culpa seja sua ou dos pesquisadores. Se seu filho (ou tutelado) sofrer efeitos indesejáveis durante a coleta

Em caso de dúvidas, com respeito aos aspectos éticos desta pesquisa, você poderá consultar:

CEP - Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos - UFMG

Av. Antônio Carlos, 6627, Pampulha - Belo Horizonte - MG - CEP 31270-901

Unidade Administrativa II - 2º Andar - Sala: 2005/ Telefone: (031) 3409-4592 –

E-mail: coep@prpq.ufmg.br / Horário de atendimento: 09:00 às 11:00 / 14:00 às 16:00

Rubricas: Pesquisador_____ Participante_____

das amostras, a necessária assistência profissional será providenciada. Os médicos responsáveis pelas coletas ou supervisão delas darão todo o apoio necessário para que todo desconforto e efeitos indesejáveis sejam minimizados.

7) Caráter Confidencial dos Registros

A sua identidade será mantida em sigilo. Os resultados do estudo serão sempre apresentados como o retrato de um grupo ou de um relato de caso e não de uma pessoa. Dessa forma, seu filho não será identificado quando o material de seu registro for utilizado, seja para propósitos de publicação científica ou educativa. O questionário será utilizado apenas para obter informações relevantes à pesquisa. Os resultados obtidos as amostras clínicas coletadas serão tratados de forma desvinculada ao nome do doador. Em nenhum momento os resultados ou informações clínicas serão associados com o nome do doador das amostras clínicas.

Ainda sobre o caráter confidencial, as futuras amostras biológicas utilizadas e credenciadas no BiobancoLabVírus terão sigilo em todos os futuros projetos, como esclarecido acima.

8) Participação

A participação do menor de idade de 0 a 12 anos, neste estudo é muito importante e voluntária. Você tem o direito de não autorizar a participação do menor, ou querer que ele saia do estudo a qualquer momento, sem penalidades ou perda de qualquer benefício ou cuidados a que ele tenha direito nesta instituição. O menor de idade também pode ser desligado do estudo a qualquer momento nas seguintes situações: (a) caso ele não use ou siga adequadamente as orientações/tratamento em estudo; (b)sofra efeitos indesejáveis não esperados; (c) o estudo termine. Em caso de você decidir retirar o menor de idade do estudo, favor informe o pesquisador e/ou a pessoa de sua equipe que esteja atendendo-o.

O material biológico a ser coletado (soro ou sangue total, saliva, fezes, urina, swab ocular e liquor) será transportado e armazenado em Biorrepositório no LabVirus na UFMG, sob a responsabilidade da pesquisadora, durante período correspondente a duração da pesquisa.

Em caso de dúvidas, com respeito aos aspectos éticos desta pesquisa, você poderá consultar:

CEP - Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos - UFMG

Av. Antônio Carlos, 6627, Pampulha - Belo Horizonte - MG - CEP 31270-901

Unidade Administrativa II - 2º Andar - Sala: 2005/ Telefone: (031) 3409-4592 –

E-mail: coep@prpq.ufmg.br / Horário de atendimento: 09:00 às 11:00 / 14:00 às 16:00

Rubricas: Pesquisador_____ Participante_____

Pedimos sua concordância em relação ao futuro do material biológico armazenado em Biorrepositório no LabVirus na UFMG:

() Concordo que o material biológico do menor sob minha responsabilidade seja utilizado somente para esta pesquisa.

() Concordo que o material biológico possa ser utilizado em outras pesquisas, mas serei comunicado pelo pesquisador novamente e assinarei outro termo de consentimento livre e esclarecido que explique para que será utilizado o material.

As amostras que forem armazenadas no Biorrepositório do LabVirus poderão ser descartadas em qualquer momento de qualquer pesquisa submetida ao comitê de ética ou pelo uso incorreto de armazenagem. Também poderá ser descartada pela retirada do termo de consentimento formalizada por manifestação, por escrito e assinada, cabendo a devolução das amostras existentes.

9) Informações

Para a realização deste projeto, os pesquisadores o submeteram ao Comitê de Ética. O projeto foi aprovado pelo COEP/UFMG, que poderá ser contatado para esclarecimentos com contato de Vivian Resende, telefone (031) 3409-4592, por email coep@prpq.ufmg.br ou no seguinte endereço: **Av. Antônio Carlos, 6627, Pampulha - Belo Horizonte - MG - CEP 31270-901 Unidade Administrativa II - 2º Andar - Sala: 2005**. O projeto completo está disponível para que todo e qualquer participante possa ter conhecimento. Se quiser conhecer o projeto mais detalhado, basta solicitar uma cópia à Professora Erna G. Kroon (31) 3409-2755. O termo seguirá em duas vias com espaço destinado para rubricas.

Em caso de dúvidas, com respeito aos aspectos éticos desta pesquisa, você poderá consultar:

CEP - Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos - UFMG

Av. Antônio Carlos, 6627, Pampulha - Belo Horizonte - MG - CEP 31270-901

Unidade Administrativa II - 2º Andar - Sala: 2005/ Telefone: (031) 3409-4592 –

E-mail: coep@prpq.ufmg.br / Horário de atendimento: 09:00 às 11:00 / 14:00 às 16:00

Rubricas: Pesquisador _____ Participante _____

Termo de consentimento livre após esclarecimento dos pais ou responsáveis em caso de menor de idade	
O menor, sob sua responsabilidade, está sendo convidado(a) como voluntário(a) a participar desta pesquisa.	
Eu, _____	
li e/ou ouvi o esclarecimento acima e compreendi o objetivo do estudo e qual o procedimento a que serei submetido. As informações esclarecem riscos e benefícios do estudo, deixando claro que sou livre para interromper minha participação a qualquer momento, sem justificar minha decisão. Sei que meu nome não será divulgado, que não terei despesas e não receberei dinheiro para participar do estudo. O termo seguirá em duas vias com espaço destinado para rubricas.	
Assim sendo, declaro que concordo em permitir que o menor, sob minha responsabilidade, participar desse estudo Belo Horizonte, ____/____/____	
_____ Assinatura do voluntário ou responsável	Nome: Identidade: Telefone pessoal: Telefone para contato: Nome do contato:
Erna G Kroon / Talitah Candiani Pesquisadoras responsáveis _____ Membro da equipe responsável por conduzir o processo Nome completo:	Telefones para contato: Erna GeessienKroon(31) 3409-2755 Endereço e telefone COEP: Universidade Federal de Minas Gerais Av. Antônio Carlos, 6627, Pampulha - Belo Horizonte - MG - CEP 31270-901 Unidade Administrativa II - 2º Andar - Sala: 2005 Telefone: (031) 3409-4592 Email: kroone@icb.ufmg.br

Em caso de dúvidas, com respeito aos aspectos éticos desta pesquisa, você poderá consultar:

CEP - Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos - UFMG
Av. Antônio Carlos, 6627, Pampulha - Belo Horizonte - MG - CEP 31270-901
Unidade Administrativa II - 2º Andar - Sala: 2005/ Telefone: (031) 3409-4592 –
E-mail: coep@prpq.ufmg.br / Horário de atendimento: 09:00 às 11:00 / 14:00 às 16:00

Rubricas: Pesquisador _____ Participante _____

ANEXO C – Termo de Assentimento Livre e Esclarecido

1

TERMO DE ASSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Você está sendo convidado (a) como voluntário (a) a participar da pesquisa “**Doenças infecciosas de sistema nervoso central: identificação de agentes etiológicos e análise de resposta imune dos pacientes**”. O motivo que nos leva a estudar esse assunto é **conhecer os microorganismos (seres microscópicos, que você não pode ver a “olho nu”)** que causam doença nas crianças de **0 a 12 anos**. Para realizar essa pesquisa precisaremos que você concorde em ceder parte das amostras coletadas para seus exames no hospital.

Para participar desta pesquisa, o responsável por você deverá autorizar e assinar um termo de consentimento. Você não terá nenhum custo, nem receberá qualquer vantagem financeira. Apesar disso, caso sejam identificados e comprovados danos provenientes desta pesquisa, você tem assegurado o direito à indenização. Você será esclarecido (a) em qualquer aspecto que desejar e estará livre para participar ou recusar-se. O responsável por você poderá retirar o consentimento ou interromper a sua participação a qualquer momento. A sua participação é voluntária e a recusa em participar não acarretará qualquer penalidade ou modificação na forma em que é atendido (a). O pesquisador irá tratar a sua identidade com padrões profissionais de sigilo. Você não será identificado em nenhuma publicação. Os riscos envolvidos na pesquisa consistem de desconfortos que você poderá passar será durante a coleta do material clínico, o líquido ou o sangue. Entretanto os volumes coletados serão pequenos, a coleta será realizada por médicos/técnicos treinados que darão todo o auxílio necessário. O líquido e o sangue utilizado na pesquisa será parte do coletado para seus exames na rotina do hospital.

A pesquisa contribuirá para conhecer melhor doenças que causam graves “dores de cabeça em crianças”, essa doença tem o difícil nome de meningoencefalite, porém nesse momento não trará nenhum benefício para o seu tratamento. Os resultados estarão à sua disposição quando finalizada. Seu nome ou o material que indique sua participação não será liberado sem a permissão do responsável por você. Os dados e instrumentos utilizados na pesquisa ficarão arquivados com o pesquisador responsável por um período de 5 anos, e após esse tempo serão destruídos. Este termo de consentimento encontra-se impresso em duas vias originais: sendo que uma será arquivada pelo

Em caso de dúvidas, com respeito aos aspectos éticos desta pesquisa, você poderá consultar:

CEP - Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos - UFMG

Av. Antônio Carlos, 6627, Pampulha - Belo Horizonte - MG - CEP 31270-901

Unidade Administrativa II - 2º Andar - Sala: 2005/ Telefone: (031) 3409-4592 –

E-mail: coep@prpq.ufmg.br / Horário de atendimento: 09:00 às 11:00 / 14:00 às 16:00

Rubricas: Pesquisador _____ Participante _____

ANEXO D – Valores de referência de exames laboratoriais

VALORES NORMAIS DE SÉRIE VERMELHA ($\pm 2dp$).

Idade	Hb (g/dl) ($\pm 2dp$)	Ht (%) ($\pm 2dp$)	Hm ($10^{12}/l$) ($\pm 2dp$)	VGM (fl) ($\pm 2dp$)	HGM (pg) ($\pm 2dp$)	CHGM (g/dl) ($\pm 2dp$)
Nascimento (cordão)	16,5 (13,5 – 19,5)	51 (42 – 60)	4,7 (3,9 – 5,5)	108 (98 – 118)	34 (31 – 37)	33 (30 – 36)
1 a 3 dias	18,5 (14,5 – 22,5)	56 (45 – 67)	5,3 (4,0 – 6,6)	108 (95 – 121)	34 (31 – 37)	33 (29 – 37)
1 semana	17,5 (13,5 – 21,5)	54 (42 – 66)	5,1 (3,9 – 6,3)	107 (88 – 126)	34 (28 – 40)	33 (28 – 38)
2 semanas	16,5 (12,5 – 20,5)	51 (39 – 63)	4,9 (3,6 – 6,2)	105 (86 – 124)	34 (28 – 40)	33 (28 – 38)
1 mês	14,0 (10,0 – 18,0)	43 (31 – 55)	4,2 (3,0 – 5,4)	104 (85 – 123)	34 (28 – 40)	33 (29 – 37)
2 meses	11,5 (9,0 – 14,0)	35 (28 – 42)	3,8 (2,7 – 4,9)	96 (77 – 105)	30 (26 – 34)	33 (29 – 37)
3 a 6 meses	11,5 (9,5 – 13,5)	35 (29 – 42)	3,8 (3,1 – 4,5)	91 (74 – 108)	30 (25 – 35)	33 (30 – 36)
0,5 a 2 anos	12,0 (10,5 – 13,5)	36 (33 – 39)	4,5 (3,7 – 5,3)	78 (70 – 86)	27 (23 – 31)	33 (30 – 36)
2 a 6 anos	12,5 (11,5 – 13,5)	37 (34 – 40)	4,6 (3,9 – 5,3)	81 (75 – 87)	27 (24 – 30)	34 (31 – 37)
6 a 12 anos	13,5 (11,5 – 15,5)	40 (35 – 45)	4,6 (4,0 – 5,2)	86 (77 – 95)	29 (25 – 33)	34 (31 – 37)
12 a 18 anos						
Mulheres	14,0 (12,0 – 16,0)	41 (36 – 46)	4,6 (4,1 – 5,1)	90 (78 – 102)	30 (25 – 35)	34 (31 – 37)
Homens	14,5 (13,0 – 16,0)	43 (37 – 49)	4,9 (4,5 – 5,3)	88 (78 – 98)	30 (25 – 35)	34 (31 – 37)
18 a 49 anos						
Mulheres	14,0 (12,0 – 16,0)	41 (36 – 46)	4,6 (4,0 – 5,2)	90 (80 – 100)	30 (26 – 34)	34 (31 – 37)
Homens	15,5 (13,5 – 17,5)	47 (41 – 53)	5,2 (4,5 – 5,9)	90 (80 – 100)	30 (26 – 34)	34 (31 – 37)

PLAQUETAS

VALORES DE REFERÊNCIA EM CRIANÇAS

Idade	Valor normal
Recém nascidos	300.000 a 600.000/ mm ³
2 a 7 dias	250.000 a 550.000/ mm ³
8 a 14 dias	250.000 a 500.000/ mm ³
15 a 90 dias	250.000 a 500.000/ mm ³
91 dias a 2 anos	200.000 a 500.000/ mm ³
> 13 anos	140.000 a 400.000/ mm ³

LEUCOGRAMA**VALORES DE REFERÊNCIA EM CRIANÇAS**

Idade	Até 1 dia (/ mm ³)	2 a 7 dias (/ mm ³)	8 a 14 dias (/ mm ³)	15 a 30 dias (/ mm ³)	31 a 90 dias (/ mm ³)	91 a 180 dias (/ mm ³)	0,5 a 2 anos (/ mm ³)	2 a 3 anos (/ mm ³)	3 a 6 anos (/ mm ³)	6 a 13 anos (/ mm ³)	> 13 anos (/ mm ³)
Leucócitos	9000 a 30000	5000 a 21000	5000 a 20000	5000 a 19500	6000 a 17500	6000 a 17500	6000 a 17000	5500 a 15500	5000 a 14500	5000 a 13000	5000 a 10000
Neutrófilos	6000 a 26000	1500 a 10000	1000 a 9500	1000 a 9000	1000 a 9000	1000 a 8500	1500 a 8500	1500 a 8500	1500 a 8000	1800 a 8000	1800 a 10000
Metamielócitos	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Bastões	1600	800	600	500	500	500	300	300	300	200	0 a 1000
Segmentados	9400	4700	3900	3300	3300	3300	3200	3500	4000	4200	1800 a 7000
Eosinófilos	20 a 850	70 a 1100	70 a 1000	70 a 900	70 a 800	70 a 750	40 a 650	20 a 650	20 a 650	0 a 600	0 a 600
Basófilos	0 a 640	0 a 250	0 a 230	0 a 200	0 a 200	0 a 200	0 a 200	0 a 200	0 a 200	0 a 200	0 a 200
Linfócitos	2000 a 11000	2000 a 17000	2000 a 17000	2500 a 16500	3500 a 14500	4000 a 13500	3000 a 9500	2000 a 8000	1500 a 7000	1200 a 6000	1000 a 5000
Monócitos	400 a 3100	300 a 2700	200 a 2400	200 a 2400	150 a 1500	150 a 1500	150 a 1300	150 a 1300	150 a 1300	150 a 1300	80 a 1200

LÍQUOR**VALORES DE REFÊNCIA EM CRIANÇAS**

EXAME /MATERIAL	VALOR DE REFERÊNCIA
Aspecto	Límpido
Cor	Período neonatal: xantocômico Demais idade: incolor
Citometria	Neonatos: 0-30 células/mm ³ >30dias de vida: 0-5 células/mm ³
Proteínas	Neonatos: 15-150mg/dl >30dias de vida: 15-45mg/dl
Glicose	40-80mg/dl (2/3 da glicemia)
Lactato	9-26mg/dl

EXAMES BIOQUÍMICOS**VALORES DE REFÊNCIA EM CRIANÇAS**

EXAME /MATERIAL	VALOR DE REFERÊNCIA
Albumina	3,5-5,0mg/dl
ALT	11-66 U/L
AST	15-46 U/L
Creatinina	Lactente: 0,2-0,4 mg/dl Pré-escolar: 0,3-0,7mg/dl Adolescente: 0,5-1,0mg/dl
Ureia	Homens: 9-20mg/dl Mulheres: 7-17 mg/dl
Gasometria	pH: 7,35-7,45 paCO ₂ : 35-45 mmHg paO ₂ : 80-100 mmHg HC0 ₃ : 22-26 mmHg BE: -2 a + 2 mEq/L
Proteína C reativa	Até 10mg/dl
Tempo de Protrombina	Neonatos: 13-20 segundos Demais idades: 11-15 segundos
Tempo de tromboplastina parcial ativada	Até 10 segundos diferença
Atividade de protrombina	70-100% RNI: até 1,2