

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
Instituto de Ciências Biológicas  
Programa de Pós-Graduação em Microbiologia

Walter Rebuite dos Santos Junior

**Investigação de agentes etiológicos virais em casos de meningoencefalites em crianças**

Belo Horizonte

2021

Walter Rebuite dos Santos Junior

**Investigação de agentes etiológicos virais em casos de meningoencefalites em crianças**

**Versão final**

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

Orientadora: Betânia Paiva Drumond

Belo Horizonte

2021

043 Santos Junior, Walter Rebuite dos.  
Investigação de agentes etiológicos virais em casos de meningoencefalites em crianças [manuscrito] / Walter Rebuite dos Santos Junior. – 2021.  
88 f. : il. ; 29,5 cm.

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

1. Microbiologia. 2. Meningoencefalite. 3. Enterovirus. 4. Zika virus. 5. Sistema Nervoso Central. 6. Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real. I. Drumond, Betânia Paiva. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. III. Título.

CDU: 579



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

### ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO

Às **14:00** horas do dia **14 de junho 2021**, por via remota (Plataforma Zoom), realizou-se a sessão pública para a defesa da Dissertação de **Walter Rebuite dos Santos Junior**. A presidência da sessão coube à Profa Dra Betânia Paiva Drumond (orientadora). Inicialmente, a presidente fez a apresentação da Comissão Examinadora assim constituída pela Profa Dra Giliane de Sousa Trindade (Departamento de Microbiologia/ICB/UFMG) e a Dra Adriana Luchs, e Profa Dra Betânia Paiva Drumond (orientadora). Em seguida, o candidato fez a apresentação do trabalho que constitui sua **Dissertação de Mestrado**, intitulado: "Investigação de Agentes Etiológicos Virais em Casos de Meningoencefalite em Crianças". Seguiu-se a arguição pelos examinadores e logo após, a Comissão reuniu-se, sem a presença do candidato e do público e decidiu considerar **aprovada** a Dissertação de Mestrado. O resultado final foi comunicado publicamente ao candidato pela presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, a presidente encerrou a sessão e lavrou a presente ata que, depois de lida e aprovada, foi assinada pela Comissão Examinadora.

Membros:

Profa Dra Giliane de Sousa Trindade  
Dra Adriana Luchs

De acordo:

Profa Dra Betânia Paiva Drumond  
(orientadora)

Profa. Dra. Danielle da Glória de Souza  
(Coordenadora)

**Belo Horizonte, 14 de junho de 2021.**



Documento assinado eletronicamente por **Betania Paiva Drumond, Professora do Magistério Superior**, em 15/06/2021, às 08:44, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).

Documento assinado eletronicamente por **Daniele da Gloria de Souza, Coordenador(a) de curso de pós-graduação**, em 15/06/2021, às 15:29, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no



art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Adriana Luchs, Usuário Externo**, em 15/06/2021, às 16:21, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Giliane de Souza Trindade, Subchefe de departamento**, em 15/06/2021, às 19:50, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [https://sei.ufmg.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **0756252** e o código CRC **D7402D74**.

## AGRADECIMENTOS

À UFMG, responsável pela minha formação durante a graduação e agora na pós, onde vivi tantas experiências enriquecedoras e me abriu portas que eu nem podia imaginar estar a minha disposição.

Ao Programa de pós-graduação em Microbiologia da UFMG e toda sua equipe, por inundar seus alunos com conhecimento e por permitir a realização deste trabalho.

Às agências de fomento, CAPES e CNPq, pelo apoio financeiro que viabilizou este trabalho.

À Aline e às acadêmicas envolvidas no projeto, bem como toda a equipe do Hospital Infantil João Paulo II, que uniram esforços para que esse trabalho pudesse ser realizado!

À todas as crianças, pacientes do hospital, que doaram amostras para a realização deste trabalho. Agradeço também aos pais dessas crianças, pela autorização para utilização das amostras em pesquisa.

À professora Erna, pela coordenação do projeto que permitiu o desenvolvimento deste trabalho e por toda colaboração.

À Adriana Luchs, que enviou iniciadores e células utilizados neste trabalho, que compartilhou sua experiência com manutenção das células e que aceitou ser avaliadora deste trabalho.

À banca avaliadora, pela disponibilidade e por aceitar avaliar este trabalho, contribuindo para melhorar a versão final.

À professora Betânia, que aceitou me orientar neste projeto quando eu não tinha nenhuma experiência trabalhando com vírus ou biologia molecular. Por todas as vezes que eu chegava desesperado porque algum experimento tinha dado errado e a solução era mais simples do que parecia. Sempre serei grato pela oportunidade de trabalhar com você.

Aos professores do Laboratório de Vírus: Giliane, Jonatas, Betânia, Erna e Claudio. Pela boa convivência e por conduzirem o laboratório com responsabilidade, seja nos momentos tranquilos ou nos períodos conturbados.

A todos os alunos e ex-alunas do GPARbo, que foram fundamentais para que eu desenvolvesse esse trabalho. Em especial à Naty, Thaís e Gabi, que me ajudaram demais com as extrações de RNA e PCRs, principalmente na reta final!

À equipe de voluntários para o diagnóstico da COVID-19 no laboratório de vírus, especialmente Rodrigo, Erik e Fernandinha, que me ajudaram com várias extrações e PCR!

À Rafa e Rayane, que me ajudaram com várias extrações, géis, PCR e que sempre seguiam a ordem das amostras.

A todas as pessoas que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho.

À equipe do @microUFMG, pela oportunidade de fazer parte de uma equipe que desenvolveu um trabalho de divulgação científica tão importante nessa pandemia.

A todos os alunos do Laboratório de Vírus, cada um de vocês contribuiu um pouco para meu conhecimento das técnicas empregadas.

Às minhas amigas e colegas de laboratório, Naty, Stoffella, Natalinha e Nídia. Por toda ajuda e por todos os momentos, bons e ruins, que passamos nesse tempo. Obrigado por fazerem parte dessa jornada comigo.

À minha amiga Ana, por me apoiar desde quando estávamos na graduação e ter sido fundamental para meu ingresso na pós-graduação.

À toda minha família, que sempre me incentivou a estudar e me apoiou. Eu jamais teria chegado até aqui sem vocês. Vocês foram fundamentais para meu sucesso!

## RESUMO

A meningoencefalite é uma doença inflamatória do sistema nervoso central, podendo ou não ser infecciosa. A doença pode ser causada por diversos agentes etiológicos, sendo na maioria das vezes causada por vírus, incluindo os arbovírus. Em grande parte dos casos, o agente etiológico permanece desconhecido. O diagnóstico do agente etiológico permite o correto manejo clínico do paciente e gera dados para melhoria do sistema de vigilância epidemiológica. Assim, o objetivo deste trabalho foi investigar a presença de arbovírus, herpes humano do tipo 1 e 3, enterovírus e coronavírus (SARS-CoV-2) em líquido de pacientes com meningoencefalite. Para isso, amostras de líquido cefalorraquidiano de pacientes de até 16 anos com suspeita de infecção do sistema nervoso central, coletadas no Hospital Infantil João Paulo II entre agosto de 2019 e abril de 2021, foram utilizadas para detecção de DNA ou RNA viral pelas técnicas de qPCR e RT-qPCR. Amostras que tiveram o genoma viral detectado foram utilizadas para tentativas de isolamento viral e sequenciamento. De 170 amostras testadas, uma foi positiva para o vírus zika (ZIKV) e oito foram positivas para enterovírus. Uma das amostras foi identificada como *Enterovírus B*, genótipo echovirus 6. O presente estudo destaca a circulação de enterovírus e vírus zika em Belo Horizonte, associados a meningite e outras manifestações neurológicas em pacientes infantis.

Palavras-chave: Meningoencefalite. Enterovírus. Zika virus. Sistema nervoso central. PCR em tempo real.



## ABSTRACT

Meningoencephalitis is a central nervous system inflammatory disease that can have an infectious nature. The disease can be caused by a wide range of microbes, most often it is caused by viruses, including arbovirus. In many cases, the causative microbe remains unknown. A correct diagnosis allows a better clinical management for the patients and contribute with data to epidemiological surveillance. Thus, the goal of this work was to investigate the presence of arboviruses, herpesviruses, enteroviruses, and coronavirus (SARS-CoV-2) in cerebrospinal fluid samples from patients with meningoencephalitis. To this end, cerebrospinal fluid samples from patients aged up to 16 years, collected at the Hospital Infantil João Paulo II between August 2019 and April 2021, were used for detection of viral DNA or RNA by the techniques of qPCR and RT-qPCR. Positive samples were selected for viral isolation attempts and partial genome sequencing. From 170 tested samples, eight was positive for enterovirus genome and one for zika virus genome. One of the samples was identified as an *Enterovirus B* species, genotype echovirus 6. The present study highlights the circulation of enteroviruses and Zika virus in Belo Horizonte, associated with meningitis and other neurological manifestations in pediatric patients.

Keywords: Meningoencephalitis. Enterovirus. Zika virus. Central nervous system. Real time PCR.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Representação da partícula viral de flavivírus mostrando a disposição das proteínas E, M e C.....	17
Figura 2 - Diagrama mostrando a estrutura de genoma de um flavivírus .....	18
Figura 3 - Organização da partícula viral e do genoma de orthobunyavírus. ....	21
Figura 4 - Diagrama mostrando a partícula viral de um togavirus.....	23
Figura 5 - Esquema mostrando a estrutura de genoma de um togavirus. ....	24
Figura 6 - Diagrama mostrando a partícula viral de um enterovirus. ....	29
Figura 7 - Esquema mostrando a estrutura de genoma de um enterovírus.....	29
Figura 8 - Esquema mostrando a partícula viral de um herpesvírus.....	32
Figura 9 - Esquema mostrando a estrutura da partícula de um coronavírus. ....	34
Figura 10 - Esquema mostrando a metodologia adotada neste trabalho. ....	39
Figura 11 - Número de amostras por ano de coleta neste estudo .....	47
Figura 12 - Cidades de origem dos pacientes envolvidos neste estudo .....	48
Figura 13 - Idade dos pacientes no momento da coleta do líquido .....	48
Figura 14 - Número de pacientes por tempo de internação.....	49
Figura 15 - Efeito citopático de amostras positivas em célula RD. ....	55
Figura 16 - Reconstrução filogenética mostrando agrupamento da amostra sequenciada com echovirus 6.....	56

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Número de casos confirmados de meningites (sem especificar agente etiológico) de 2007 a 2019. ....	16
Tabela 2 - Iniciadores e sondas utilizados na triagem molecular de vírus em amostras de líquido por PCR em tempo real – Sondas Taqman .....	43
Tabela 3 - Iniciadores utilizados na triagem molecular de vírus em amostras de líquido por PCR em tempo real – SYBR green.....	44
Tabela 4 - Iniciadores para PCR convencional – amostras positivas para enterovírus..	44
Tabela 5 – Vírus pesquisados por PCR em amostras de LCR de pacientes do Hospital Infantil João Paulo II.....	49
Tabela 6 – Carga viral relativa das amostras de LCR .....	50
Tabela 7 - Idade e tempo de internação dos pacientes com diagnóstico laboratorial confirmado para enterovirus.....	51
Tabela 8 – Características do líquido de pacientes positivos com diagnóstico laboratorial confirmado para enterovirus.....	51
Tabela 9 - Valores de hemoglobina, hematócrito, plaquetas e proteína C reativa dos pacientes com diagnóstico laboratorial confirmado para enterovirus.....	52
Tabela 10 - Contagem de leucócitos no sangue de pacientes com diagnóstico laboratorial confirmado para enterovírus.....	53
Tabela 11 - Idade e tempo de internação dos pacientes com diagnóstico laboratorial confirmado para flavivírus.....	53
Tabela 12 - Características do líquido de pacientes com diagnóstico laboratorial confirmado para flavivirus .....	54
Tabela 13 - Detecção de genoma viral de enterovírus por PCR após infecção de células com amostras de líquido de pacientes com diagnóstico laboratorial confirmado para enterovírus .....	54

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CHIKV - Chikungunya virus

Ct – *cycle threshold*

DENV - Dengue virus

EBV – Epstein-Barr virus

EEEV - Eastern equine encephalitis virus

ENTV - Enterovirus

HHV-1 – Human alphaherpesvirus 1

HHV-3 – Human alphaherpesvirus 3

IgM - Imunoglobulina classe M

kb - quilobases

LCR - Líquido cefalorraquidiano

MAYV - Mayaro virus

OROV - Oropouche virus

pb - pares de base

PCR - reação em cadeia da polimerase

qPCR - PCR em tempo real

RNA - Ácido ribonucleico

RNP - Ribonucleocapsídeo

RT - Transcrição reversa

SLEV - Saint Louis encephalitis virus

SNC - Sistema nervoso central

VEEV - Venezuelan equine encephalitis virus

WEEV - Western equine encephalitis virus

WNV - West Nile virus

YFV - Yellow fever virus

ZIKV - Zika virus

μL - microlitro

## SUMÁRIO

1. Introdução .....	14
1.1. Meningoencefalites .....	14
1.2. Flaviviridae.....	17
1.3. Peribunyaviridae – Orthobunyavirus.....	20
1.4. Togaviridae – Alphavirus .....	22
1.5. Enterovírus.....	28
1.6. Herpesviridae.....	30
1.7. Coronavirus.....	32
1.8. Patogênese .....	34
2. Justificativa .....	37
3. Objetivos.....	38
3.1. Objetivo geral .....	38
3.2. Objetivos específicos .....	38
4. Materiais e métodos.....	39
4.1. Amostras.....	39
4.2. Extração de ácidos nucleicos .....	40
4.2.1 Extração de RNA .....	40
4.2.2. Extração de DNA.....	40
4.3. PCR em tempo real e convencional.....	40
4.3.1. Arbovírus .....	41
4.3.2. Herpesvírus.....	41
4.3.3. Enterovírus – RT-qPCR.....	41
4.3.4. SARS-CoV-2 .....	42

4.3.5. Enterovírus – RT-PCR.....	42
4.4. Eletroforese em gel de poliacrilamida.....	44
4.5. Purificação do DNA.....	44
4.6. Sequenciamento.....	45
4.7. Genotipagem.....	45
4.8. Isolamento viral.....	45
4. Resultados.....	47
4.1. Caracterização dos pacientes.....	47
4.2. Triagem molecular.....	49
4.3. Dados clínicos dos pacientes com amostras positivas para enterovírus.....	50
4.4. Dados clínicos de pacientes com amostras positivas para flavivírus.....	53
4.5. Isolamento das amostras positivas para enterovírus.....	54
4.6. Caracterização molecular.....	55
5. Discussão.....	58
6. Conclusões.....	65
7. Referências bibliográficas.....	66
Apêndice 1 – Reconstrução filogenética mostrando agrupamento da amostra sequenciada com echovirus 6, sem compressões.....	81
Anexo 1 – Termo de consentimento livre e esclarecido.....	82

## 1. Introdução

### 1.1. Meningoencefalites

A encefalite é definida como inflamação do parênquima cerebral associado com disfunção neurológica (TUNKEL *et al.*, 2008). Ela pode ser resultado tanto de uma doença autoimune como de uma infecção por agentes infecciosos. As encefalites causadas por microrganismos são mais frequentemente de etiologia bacteriana ou viral, sendo a última a maior causa da doença (HASBUN *et al.*, 2017). Quando a inflamação também acomete as meninges, a doença é chamada de meningoencefalite (HAMMON, 1973). A encefalopatia, por sua vez, é definida como alteração no funcionamento do cérebro mediada por processos metabólicos, que pode ser causada por drogas, intoxicações, disfunções de órgãos ou infecções sistêmicas. Ela não envolve dano estrutural ou processo inflamatório do cérebro (STEINER *et al.*, 2010).

O diagnóstico clínico das encefalites ocorre quando o paciente apresenta alteração no nível de consciência por pelo menos 24 horas e pelo menos dois dos seguintes critérios: febre ocorrida nas últimas 72 horas, sinais neurológicos focais, pleocitose, convulsão, alteração em exame de imagem ou eletroencefalograma compatível com encefalite (COSTA; SATO, 2020).

Os sintomas que dão suporte ao diagnóstico clínico das meningites incluem febre e os definidos como sinais meníngeos. Estes incluem rigidez nuchal, cefaleia e fotofobia. Contudo, uma ampla gama de sintomas está associada a manifestações neurológicas, como ataxia, parestesia, alterações do comportamento, fontanela abaulada, sonolência e irritabilidade (VENKATESAN; MURPHY, 2018).

Para o diagnóstico laboratorial, são feitos testes sorológicos e/ou moleculares e exames de imagem. O líquido cefalorraquidiano (LCR) é uma amostra muito valiosa no diagnóstico de doenças do sistema nervoso central (SNC) (HE *et al.*, 2016). Um dos principais fatores para a suspeita de infecção do SNC por agente viral é o aspecto macroscópico do LCR. Se a amostra estiver com alta turbidez e o cultivo for positivo para bactéria ou fungo, a suspeita de agente viral é descartada. As meningites assépticas são aquelas onde não há alteração na turbidez do líquido. Quando a meningite ocorre por infecção viral, geralmente o número de leucócitos presentes não é elevado o suficiente para tornar o líquido turvo, e por

isso as meningites virais são consideradas nesta categoria. O padrão ouro para diagnóstico é o isolamento viral a partir do LCR, mas o procedimento é lento, não possui alta sensibilidade e seu custo é elevado (CHADWICK, 2005).

A análise de proteínas e glicose do LCR de pacientes com meningoencefalite viral geralmente apresenta níveis normais em adultos, mas as proteínas podem estar um pouco elevadas. Nos casos de meningoencefalites virais, a cor do LCR tende a ser transparente, mas se houver pleocitose (aumento de glóbulos brancos no líquido), ele se apresenta turvo (NGHIEM; SCHATZBERG, 2010). A análise citológica do LCR pode, raramente, identificar o agente etiológico quando este não for viral e determinar a contagem de leucócitos, que pode ou não ser alta em casos de meningoencefalite viral (CHADWICK, 2005). Em crianças, o diagnóstico pode diferir dos adultos devido às peculiaridades da idade. Por exemplo, os valores de glóbulos brancos no líquido cefalorraquidiano são maiores nas crianças quando comparados com adultos (MESSACAR *et al.*, 2018).

Além do isolamento viral, os testes de diagnóstico virológico incluem a detecção do genoma por PCR ou PCR em tempo real e de anticorpos no LCR. Outras amostras, como fezes, urina ou sangue, podem ser utilizadas para dar suporte ao diagnóstico de infecção. A PCR pode indicar a carga viral relativa na amostra através do cycle threshold (número de indica o ciclo da reação em que houve detecção do alvo). A sensibilidade da detecção do genoma por PCR vai depender da carga genômica viral na amostra, que pode ser influenciada pelo tempo entre o aparecimento dos sintomas e a coleta da amostra biológica. O mesmo pode ser dito para a detecção de IgM, em que é necessário um tempo de soroconversão (STEINER *et al.*, 2010).

No Brasil, o número de casos de meningites teve uma queda nos últimos anos (Tabela 1). Apesar de avanços terem sido feitos no diagnóstico, o número de casos de meningoencefalites em que a etiologia permaneceu desconhecida ainda é alto (TYLER, 2009). A maioria dos casos de meningite viral em que há identificação do patógeno são causados por enterovírus (HASBUN *et al.*, 2019). Porém, alguns estudos mostram que uma parcela significativa dos casos de suspeita de infecção do SNC pode ser causada por arbovírus (MARINHO *et al.*, 2019).



Tabela 1 - Número de casos confirmados de meningites (sem especificar agente etiológico) de 2007 a 2019.

Ano 1º sintoma	Casos confirmados
2007	29.949
2008	24.342
2009	22.085
2010	20.536
2011	20.801
2012	21.807
2013	19.268
2014	17.703
2015	16.087
2016	15.665
2017	17.017
2018	17.564
2019	15.678

Excluídos casos não residentes no Brasil. Fonte: Ministério da Saúde/SVS - Sistema de Informação de Agravos de Notificação - Sinan Net

Vários são os agentes etiológicos virais associados as encefalites e meningites. Os membros da família *Herpesviridae* relacionados a encefalites incluem os gêneros *Simplexvirus*, *Cytomegalovirus* e *Lymphocryptovirus*. Os enterovírus (*Picornaviridae*) são a causa mais comum de meningites virais, sendo prevalente tanto nos casos infantis quanto em adultos (SOARES *et al.*, 2011).

Dentre os membros da família *Flaviviridae* destacam-se como causadores de infecções do SNC o West Nile vírus (WNV), Yellow Fever vírus (YFV), Saint Louis encephalitis vírus (SLEV), Japanese encephalitis virus, Murray Valley encephalitis vírus e Powassan vírus (WRIGHT *et al.*, 2019; MARINHO *et al.*, 2019). A infecção por esses vírus geralmente, quando sintomática, causa doenças febris e/ou hemorrágicas, mas alguns pacientes podem desenvolver manifestações diversas no SNC (MARINHO *et al.*, 2017; VIEIRA *et al.*, 2018).

Outros arbovírus associados a encefalites pertencem às famílias *Peribunyaviridae*, no caso do Oropouche vírus (PINHEIRO *et al.*, 1982), e *Togaviridae*. Na última família, destacam-se Eastern equine ncephalitis virus (EEEV), Venezuelan equine encephalitis virus (VEEV) e Western equine encephalitis virus (WEEV). Esses vírus têm o nome de acordo com o local em

que foram descobertos e causam encefalites tanto em humanos quanto em equinos (ZACKS, PAESSLER, 2010).

## 1.2. Flaviviridae

A família Flaviviridae tem grande importância clínica humana por incluir vários arbovírus e ter distribuição em quase todo o globo. Os vírus dessa família são envelopados e o capsídeo possui simetria icosaédrica (Figura 1). O vírus possui genoma de fita simples de RNA de senso positivo, seu genoma tem aproximadamente 11 kb e possui apenas uma janela de leitura (do inglês *open reading frame* - ORF) que permite a tradução de todos os genes em uma única poliproteína (Figura 2). Essa poliproteína contém as proteínas estruturais do capsídeo (C), envelope (E) e proteína pré-membrana (prM) e as não estruturais (NS1, NS2A-B, NS3, NS4A-B e NS5). Além disso, o genoma possui regiões não traduzidas tanto em seu início como no final (UTRs) que desempenham funções na estabilidade do RNA e modulação da replicação (OLIVEIRA; PERON, 2019).

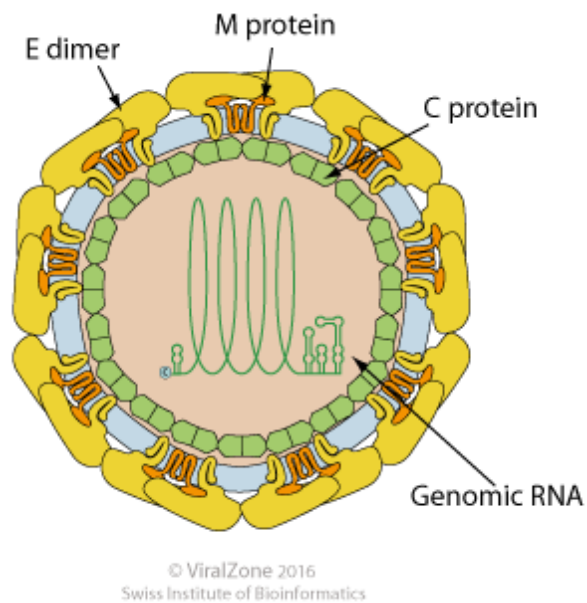


Figura 1 - Representação da partícula viral de flavivírus mostrando a disposição das proteínas E, M e C. O genoma está representado em verde dentro do capsídeo formado pela proteína C.

Fonte: adaptado de ViralZone. Disponível em:  
[https://viralzone.expasy.org/43?outline=all\\_by\\_species](https://viralzone.expasy.org/43?outline=all_by_species)

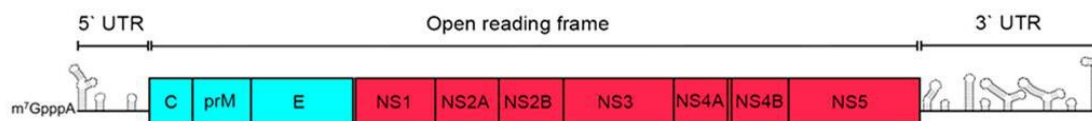


Figura 2 - Diagrama mostrando a estrutura de genoma de um flavivírus

Fonte: adaptado de BARROWS *et al.*, 2018

O DENV utiliza o sulfato de heparan como fator de adesão e DC-SIGN como receptor. Após a adsorção do vírus a célula, a partícula é internalizada via endocitose através de vesículas com clatrina. O pH do endossomo é diminuído pela atividade de ATPases, que permite a fusão da membrana do envelope viral com a membrana do endossomo e a liberação da ribonucleoproteína no citoplasma, que é seguida pelo desnudamento (LINDENBACH *et al.*, 2013). A tradução do genoma viral parece ser iniciada pelo recrutamento de proteínas celulares, em parte, devido às sequências na região 3' UTR. Após o recrutamento do ribossomo, que parece ser dependente das fosfoproteínas RPLP1 e RPLP2, a tradução da poliproteína é iniciada. O processo de tradução termina com o complexo associado ao retículo endoplasmático. (BARROWS *et al.*, 2018) A poliproteína viral possui vários domínios transmembrana e é processada tanto por proteases virais quanto por proteases celulares. A porção citoplasmática é processada por proteases virais, enquanto a porção no lúmen do retículo endoplasmático é processada por proteínas celulares. Ela também é clivada por uma furina na região prM, dando origem a proteína M (BARROWS *et al.*, 2018).

Dentre os arbovírus clinicamente relevantes que circulam no Brasil, destaca-se o DENV, YFV, WNV, ZIKV e SLEV. WNV e SLEV são transmitidos por vetores do gênero *Culex* (COLPITTS *et al.*, 2012; MAY *et al.*, 2008), enquanto DENV e ZIKV são transmitidos por mosquitos do gênero *Aedes* (JAVED *et al.*, 2017). No Brasil, o YFV é mantido em um ciclo silvestre e tem como vetores mosquitos do gênero *Haemagogus* e *Sabethes* (MONATH; VASCONCELOS, 2015).

As infecções por flavivírus podem ser assintomáticas ou sintomáticas. Quando sintomáticas, a doença é tipicamente febril, apresentando sintomas como febre, dor de cabeça, mal-estar e dor nas articulações. Em casos mais raros, o paciente pode evoluir para

um quadro hemorrágico ou desenvolver encefalite, de acordo com o agente infeccioso (FARES *et al.*, 2015).

Uma das arboviroses mais recorrentes do mundo é causada pelo DENV. No Brasil, há registro da doença desde 1851. A partir da erradicação do mosquito nos ambientes urbanos, como parte dos esforços para prevenir a febre amarela urbana, o país não teve registro de surto até reintrodução do vetor, em 1976 (FARES *et al.*, 2015). Desde então, vários casos são registrados anualmente por todo o país, principalmente durante períodos com maior incidência de chuvas (FARES *et al.*, 2015). Com quatro sorotipos geneticamente divergentes (GUZMAN; HARRIS, 2015), o DENV é responsável por mais de 119 casos por 100.000 habitantes no Brasil por ano (PAHO, 2017).

O DENV causa uma ampla gama de manifestações neurológicas associado a invasão do SNC em crianças, que incluem encefalite, meningite e mielite. Os sintomas mais frequentes associados foram sinais meníngeos, convulsões, fraqueza muscular e sinais de aumento de pressão intracraniana e alteração do nível de consciência. Além disso, é exibida uma discreta pleocitose. Podem ocorrer manifestações neurológicas com ou sem sintomas de dengue clássica, ou manifestações associadas a resposta imune induzida por DENV (ALMEIDA BENTES; KROON; ROMANELLI, 2019).

O YFV é mantido no Brasil em um ciclo silvestre que tem como hospedeiros vertebrados primatas não humanos. Um surto atingiu recentemente a região sudeste do país, culminando com a morte de mais de 500 pessoas (DE OLIVEIRA FIGUEIREDO *et al.*, 2020; SACCHETTO *et al.*, 2020; SILVA *et al.*, 2020). O YFV causa a febre amarela e, uma das características que a difere das demais flaviviroses é a possibilidade resurgimento dos sintomas após um curto período, caracterizando a fase de intoxicação. Ela é marcada pelo retorno da febre, dor abdominal, acrescida de náusea, vômitos e a icterícia (WAGGONER; ROJAS; PINSKY, 2018).

O ZIKV foi isolado pela primeira vez a partir de macacos em 1947 e tinha sua distribuição restrita à África e Ásia. O ZIKV foi detectado pela primeira vez no Brasil em 2015, com o primeiro caso confirmado na região nordeste e logo foi detectado em outros países sul-americanos. Diferente de outros membros do gênero *Flavivirus*, o ZIKV já foi encontrado no sêmen humano, indicando possível transmissão sexual (MUSSO *et al.*, 2015). O vírus

ganhou atenção no Brasil e no mundo após determinada sua relação com os casos de microcefalia que ocorreram no país após sua introdução (JAVED *et al.*, 2017). Existem poucos casos relatados de caso que associam manifestações neurológicas a infecção por zika em crianças, apresentando síndrome de Guillain-Barré, mielite e sinais focais (ALMEIDA BENTES; KROON; ROMANELLI, 2019). Um estudo recente avaliando o LCR de crianças com suspeita de infecção do SNC detectou o RNA de zika em 3% das amostras testadas (SILVA MARINHO; KROON, 2019).

O SLEV foi isolado pela primeira vez nos Estados Unidos, em 1933, no surto de Saint Louis (HEINEN *et al.*, 2015). O SLEV circula por todo o continente americano e no Brasil, o vírus foi isolado pela primeira vez na década de 60, a partir de um pool de *Sabethes belisarioi*, no Pará. O caso mais recente reportado no Brasil é de São Paulo, 2014, a partir de um paciente com suspeita de dengue (MAIA *et al.*, 2014). SLEV causa doença febril quando sintomática, que pode evoluir para encefalite. No Brasil, o vírus provavelmente é subdiagnosticado devido aos sintomas parecidos com outras doenças e falta de diagnóstico diferencial de rotina (MONDINI *et al.*, 2007). Já foi demonstrada a presença do vírus durante surtos de dengue, em São Paulo (TERZIAN *et al.*, 2011).

O WNV foi isolado pela primeira vez em Uganda, em 1937 e introduzido no continente americano em 1999, com um caso reportado em New York, nos Estados Unidos (LANCIOTTI, 1999). No Brasil, evidências sorológicas a partir de amostras de equinos e aves indicavam a circulação do vírus na região Centro-Oeste e, em 2015, o vírus foi confirmado pela primeira vez em um caso de encefalite humana no país (VIEIRA *et al.*, 2015). O vírus foi isolado também em 2018 a partir do SNC de um cavalo acometido pela encefalite. Assim como SLEV, WNV pode causar doença febril e/ou evoluir para encefalite (COLPITTS *et al.*, 2012).

### **1.3. Peribunyaviridae – Orthobunyavirus**

A família *Peribunyaviridae* pertence à ordem *Bunyavirales* e compreende quatro gêneros: *Herbevirus*, *Orthobunyavirus*, *Pacuvirus* e *Shangavirus* (ICTV, 2016). Membros da família *Peribunyaviridae* possuem formato esférico, com partículas de 80 a 120 nm de diâmetro, e um envelope lipídico externo (ROSA *et al.*, 2017). Vírus dessa família possuem genoma de RNA senso negativo, segmentado e composto por três moléculas classificadas de

acordo com o número de bases: S, o menor segmento que codifica proteínas estruturais; M, o segmento de tamanho médio que também codifica proteínas estruturais e L, o maior segmento, que codifica proteínas relacionadas a replicação e transcrição dos segmentos de RNA (SAKKAS *et al.*, 2018) (Figura 3).

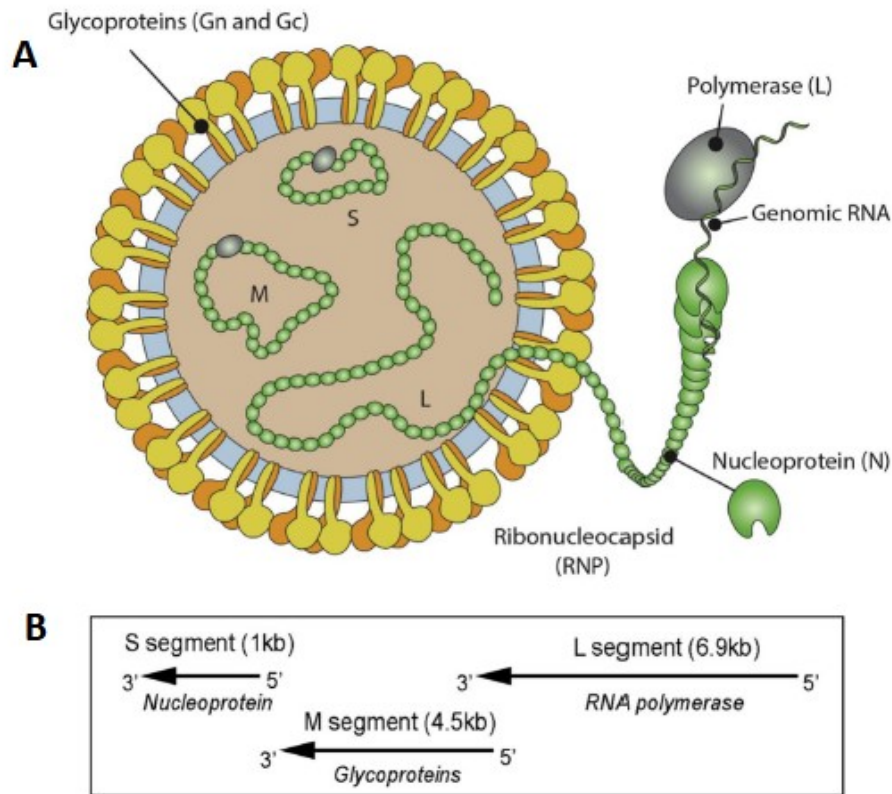


Figura 3 - Organização da partícula viral e do genoma de orthobunyavírus. (A) O ribonucleocapsídeo (RNP) está representado. A glicoproteínas (Gn e Gc) se localizam no envelope. Os três segmentos do genoma, S, M e L, estão associados a nucleoproteína (N) e a polimerase (L). (B) Esquema mostrando os segmentos do genoma (S, M e L), o tamanho em quilobases (kb) e as proteínas codificadas por cada um deles (Nucleoproteína, glicoproteínas e RNA polimerase, respectivamente). Fonte: ROMERO-ALVAREZ e ESCOBAR, 2017

Fonte: ROMERO-ALVAREZ e ESCOBAR, 2017

Os segmentos de RNA são conectados individualmente à proteína L e ligados à proteína do nucleocapsídeo (N), formando três ribonucleocapsídeos (MURPHY; HARRISON; WHITFIELD, 1973). Um estudo com células HeLa mostrou que a interação entre a partícula e o receptor celular provavelmente ocorre por mediação das glicoproteínas virais e que a penetração ocorre por endocitose através de vesículas revestidas por clatrina. O mesmo

estudo mostrou que a liberação das partículas na célula é dependente da acidificação do endossomo (ACRANI *et al.*, 2010).

O Oropouche virus (OROV) é o agente etiológico da febre Oropouche, pertence à família *Peribunyaviridae* e gênero *Orthobunyavirus*. O vírus foi encontrado, pela primeira vez, em 1955 em Trindade, no vilarejo Vega de Oropouche. (ANDERSON *et al.*, 1961). No Brasil, o vírus foi isolado pela primeira vez em Belém, no estado Pará, em 1961 (PINHEIRO *et al.*, 1962) Posteriormente, o vírus foi isolado nos estados de Maranhão e Mato Grosso (VASCONCELOS *et al.*, 1989). Sucessivos surtos foram descritos desde então, a maioria na região da bacia amazônica (PINHEIRO *et al.*, 1976; FREITAS *et al.*, 1982; DIXON *et al.*, 1981).

A febre Oropouche se manifesta de forma similar a outras arboviroses, com quadros de febre de aproximadamente 39°C, dor de cabeça, dores no corpo, náuseas, tonturas e fotofobia (ROSA *et al.*, 2017). Também já foram relatados casos em que a doença se manifestou com erupções cutâneas, dor retro orbital, mal-estar generalizado, sangramento gengival e meningite ou encefalite (ROMERO-ALVAREZ e ESCOBAR, 2017). Infecções com manifestação de dor de cabeça extrema e rigidez no pescoço anteciparam casos de meningite asséptica (PINHEIRO *et al.*, 1981). Os casos de infecção pelo OROV são mais frequentes durante as estações chuvosas e tem tempo de incubação entre quatro e oito dias. Depois desse período, os sintomas se manifestam nas infecções sintomáticas e ocorre alta viremia, tempo em que o hospedeiro serve como fonte de vírus para os mosquitos do gênero *Culicoides* (ROMERO-ALVAREZ e ESCOBAR, 2017).

O OROV é transmitido por vetores, principalmente os mosquitos do gênero *Culicoides*. Pesquisas de campo e de laboratório já mostraram que *Culicoides paraensis* (Diptera) é o principal vetor para o OROV. Já foi demonstrado que o mosquito *Culex quinquefasciatus*, encontrado em áreas urbanas no Brasil, também tem a capacidade de atuar como vetor do OROV (HOCH *et al.*, 1987).

#### **1.4. Togaviridae – Alphavirus**

A família *Togaviridae* inclui o gênero *Alphavirus*, que integra diversos arbovírus. O vírus protótipo do gênero *Alphavirus* possui formato esférico e capsídeo com simetria icosaédrica, com aproximadamente 70nm de diâmetro. O capsídeo, formado pelas proteínas do capsídeo (C), é revestido por um envelope lipídico derivado do hospedeiro com

glicoproteínas transmembrana associadas (E1 e E2). Outra proteína transmembrana encontrada no envelope, porém em menores quantidades, é a denominada 6K (MENDES; KUHN, 2018) (Figura 4).

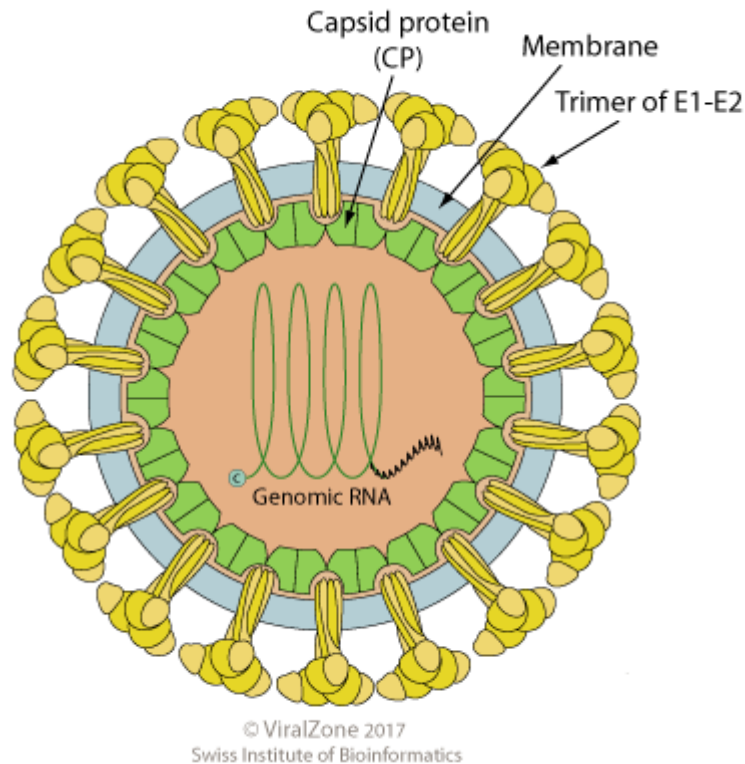


Figura 4 - Diagrama mostrando a partícula viral de um togavírus. A proteína do capsídeo (CP) e as proteínas do envelope (E1 e E2) estão representadas. Adaptado de ViralZone. Disponível em: [https://viralzone.expasy.org/3?outline=all\\_by\\_species](https://viralzone.expasy.org/3?outline=all_by_species).

O genoma dos alphavirus é constituído por uma fita simples de RNA de senso positivo, com extremidade 3' poliadenilada e CAP 5'. O genoma possui aproximadamente 11,7 kb e os genes codificantes para as proteínas relacionadas à replicação e proteínas estruturais estão divididos em dois segmentos dentro do genoma. As proteínas estruturais (E1, E2, E3, 6K e C) são traduzidas a partir de um RNA mensageiro subgenômico, contendo apenas estes genes, enquanto as proteínas não estruturais (NSP1-4), envolvidas na replicação, são traduzidas diretamente do RNA genômico (CAREY *et al.*, 2019) (Figura 5).



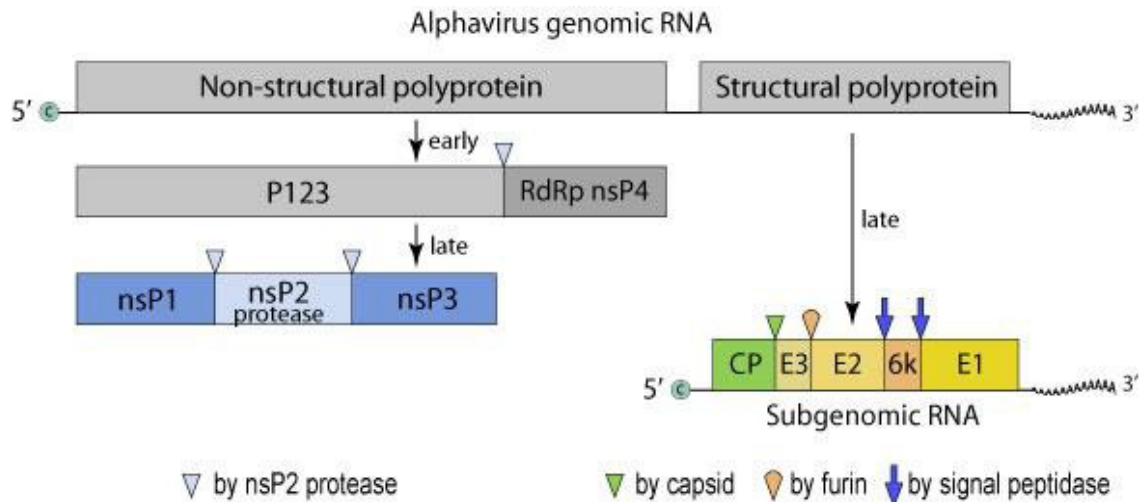


Figura 5 - Esquema mostrando a estrutura de genoma de um alphavirus. O genoma possui duas janelas de leitura (Proteínas não estruturais e proteínas estruturais). As proteínas não estruturais (nsP1, nsP2, nsP3 e nsP4) são traduzidas diretamente do genoma e clivadas pela protease nsP2 (triângulos azul-claros). As proteínas estruturais (CP, E3, E2, 6k e E1) são traduzidas a partir de um RNA subgenômico e clivadas pelas proteínas CP (triângulo verde), por furinas (triângulo laranja) e a partir do peptídeo sinal (setas azuis). Fonte: ViralZone. Disponível em: [https://viralzone.expasy.org/3?outline=all\\_by\\_species](https://viralzone.expasy.org/3?outline=all_by_species)

A proteína E2 se liga a fatores de adesão, levando à aproximação do vírus com a superfície celular, facilitando a interação entre o ligante viral e o receptor, levando à penetração pela via endocítica dependente de clatrina. Sob estímulo de baixo pH, o envelope se funde com a membrana da vesícula liberando o nucleocapsídeo no citoplasma, que é desmontado e liberando o RNA viral no citoplasma. A replicação do genoma é regulada pela disponibilidade das proteínas não estruturais e é feita pela síntese de uma fita de RNA com polaridade negativa que serve de molde para o RNA de polaridade positiva. O RNA mensageiro subgenômico também é produzido a partir da fita de polaridade negativa. As proteínas estruturais são processadas no tráfico do complexo de Golgi até a membrana, onde o capsídeo contendo o genoma viral recebe o envelope e é liberado (CAREY *et al.*, 2019).

O Chikungunya virus (CHIKV) é o agente etiológico da febre Chikungunya. A doença é caracterizada por sintomas como febre e principalmente dor nas articulações, que pode persistir por meses ou até mesmo anos (GONZÁLEZ-SÁNCHEZ; RAMÍREZ-ARROYO, 2018). O CHIKV foi isolado pela primeira vez a partir de uma amostra um indivíduo que apresentou febre e dor nas articulações durante um surto em 1952, na Tanzânia (ROSS, 1956). A transmissão é mantida por um ciclo enzoótico que tem como hospedeiros vertebrados

primatas não humanos e vetores mosquitos do gênero *Aedes*, e um ciclo urbano que tem como hospedeiro vertebrado os seres humanos e tem como vetores mosquitos urbanos como o *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* (CUNHA *et al.*, 2020).

Em 2013, o primeiro caso de febre Chikungunya foi reportado no continente americano e em 2014 houve o primeiro caso na América do Sul, que ocorreu na Guiana Francesa. A primeira transmissão detectada de CHIKV no Brasil ocorreu em 2014, no estado do Amapá. A partir de então, o vírus se espalhou pelo território brasileiro e tem causado grandes surtos no país (CUNHA *et al.*, 2020).

Em alguns casos, o CHIKV pode causar manifestações neurológicas. As manifestações neurológicas por CHIKV mais comuns em crianças são convulsões, encefalites, meningismo e alterações comportamentais, sendo que algumas vezes pode haver sequelas (ALMEIDA BENTES; KROON; ROMANELLI, 2019).

O Mayaro virus (MAYV) é o agente etiológico da febre mayaro. O MAYV foi identificado pela primeira vez, na ilha de Trindade, no sangue de trabalhadores rurais que apresentavam doença febril (CASALS; WHITMAN, 1957). O tempo de incubação varia de três a onze dias e os sintomas são parecidos com o de outras arboviroses febris, que incluem erupções cutâneas, febre, dor muscular, dor retro orbital, dor de cabeça, diarreia e dores nas articulações que podem persistir por meses ou até mesmo anos (TAYLOR, PATEL, HEROLD 2005; SLEGGERS *et al* 2014).

Os vetores do MAYV incluem mosquitos do gênero *Hemagogus*, os mesmos envolvidos na transmissão do vírus da febre amarela, contudo já foi demonstrado por estudos de competência vetorial que mosquitos do gênero *Aedes* são capazes de transmitir o vírus (LONG *et al* 2011). Os reservatórios do MAYV não são totalmente conhecidos, mas já foi demonstrado que ele pode infectar uma ampla gama de hospedeiros que incluem vários mamíferos como carnívoros, marsupiais, roedores, primatas, artiodátilos e preguiças (SEYMOUR, PERALTA e MONTGORY, 1983; THOISY *et al.*, 2003).

No Brasil, o MAYV foi isolado pela primeira vez, em uma fazenda no Rio Guama, no estado do Pará em 1955. Na época, o vírus foi isolado de mais de trinta trabalhadores que apresentavam febre e dor de cabeça. (CAUSEY e MAROJA, 1962). Em 2008, foi reportado um surto de mayaro em Santa Barbara, no Pará. Na época, foram encontrados anticorpos IgM

em 36 pessoas (AZEVEDO *et al.*, 2009). No mesmo ano, em Manaus, anticorpos IgM foram encontrados em 33 pacientes e o genoma viral foi isolado de uma pessoa (MOURÃO *et al.*, 2012). No Mato Grosso, durante um surto de dengue, foi encontrado o RNA do vírus em 15 pacientes, de 604 investigados (ZUCHI *et al.*, 2014). Mais recentemente, em Goiás, foram detectados anticorpos IgM contra Mayaro em pacientes que viajaram para áreas rurais no estado, mas ainda assim próximas da capital (BRUNINI *et al.* 2017).

O vírus da encefalite equina do leste foi isolado pela primeira vez a partir do cérebro de cavalos, durante um surto nos Estados Unidos, em 1933 (GILTNER e SHAHAN; TENBROECK e MERRIL, 1933). São reconhecidas quatro linhagens do vírus, com diferenças na antigenicidade e distribuição geográfica. A linhagem I circula na América do Norte, enquanto as linhagens II, III e IV circulam na América Central e do Sul (BRAULT *et al.*, 1999). Em 2012 as linhagens II, III e IV desse vírus foram separadas em uma nova espécie, o Madariaga Virus, dentro do complexo EEEV. Isso ocorreu devido à similaridade genética das linhagens, das características clínicas da doença, aspectos ecológicos e diferenças da distribuição geográfica. (ICTV, 2012). Os principais vetores que transmitem o vírus para equinos e humanos são mosquitos do gênero *Aedes*, *Culex* e *Coquillettidia*, sendo que os dois primeiros são de maior importância na América do Sul.

A infecção pelo vírus pode ser assintomática ou causar de doença febril (BLOHM *et al.*, 2018; LEDNICKY *et al.*, 2019) até casos de encefalite (LUCIANI *et al.*, 2015). O período de incubação dura de quatro a dez dias e, após esse tempo, os sintomas começam com febre, dor muscular e dor de cabeça. Em casos de encefalite podem ocorrer vômitos, convulsões, leucocitose, hematúria, sintomas respiratórios e coma (ZACKS e PAESSLER 2010).

Recentemente, a linhagem III foi detectada e isolada de um paciente que apresentava quadro febril, no Mato Grosso (COSTA *et al.*, 2019). O primeiro isolamento foi feito por Carneiro e Cunha (1943) na epizootia de Tatuí, a partir de hospedeiro equino. A partir daí, o vírus foi isolado (hospedeiros equinos e vetores) ou detectado por métodos sorológicos (humanos e equinos) diversas vezes no país, com casos desde a região Norte até o Sul do país (LENNETTE; FOX, 1943; CUNHA, 1945; SANTOS *et al.*, 1946; ALICE, 1951; CUNHA *et al.*, 1948; CAUSEY *et al.*, 1960; BRUNO-LOBO *et al.*, 1961; KOTAIT *et al.*, 1992; FERNANDÉZ *et al.*, 2000). Recentemente, em surtos ocorridos na região Nordeste (Pernambuco, Ceará e

Paraíba), o vírus foi identificado por PCR e isolado (SILVA et al., 2015). Cunha e colaboradores (2009) em estudo de soroprevalência identificaram anticorpos neutralizantes para EEEV em municípios do sul de São Paulo.

O vírus da encefalite equina do oeste (WEEV) foi isolado pela primeira vez em 1930, nos Estados Unidos, a partir do cérebro de um cavalo com encefalite (MEYER *et al.*, 1931). As infecções pelo vírus podem ser assintomáticas ou se manifestar como doença febril, com sintomas como febre, dor de cabeça, dor muscular e mal-estar. Uma parte menor das infecções ocorre com a manifestação de encefalite ou encefalomielite, com sintomas que incluem rigidez da nuca e convulsões, podendo levar a coma ou a óbito. As infecções sintomáticas são mais frequentes em crianças (ZACKS; PAESSLER, 2010).

No Brasil, um estudo de vigilância conduzido por Ferreira e colaboradores (1994), no estado de São Paulo ano, reportou aves com anticorpos contra WEEV, sugerindo sua circulação na região. Na América do Norte o WEEV tem maior prevalência na costa oeste e é responsável por vários surtos de encefalite equina e humana (KUMAR *et al.*, 2018). Os vetores responsáveis pela transmissão são mosquitos do gênero *Culex* e *Culiseta*, tendo aves como reservatórios e humanos e equinos como hospedeiros finais (KUMAR *et al.*, 2018). Contudo, neste continente o número de surtos tem diminuído nas últimas décadas (BERGREN *et al.*, 2014).

O vírus da encefalite equina venezuelana (VEEV) foi isolado pela primeira vez durante um surto de encefalite equina na Colômbia e Venezuela, a partir do cérebro de equinos acometidos (BECK; WYCKOFF, 1938). As infecções pelo VEEV podem resultar em uma ampla gama de sintomas. Há relatos de pacientes que manifestaram sintomas parecidos com de doenças febris, com febre, dor de cabeça e dor muscular (GO; BALASURIYA; LEE, 2014). Algumas pessoas manifestam doença neurológica, apresentando convulsões, tontura e confusão mental, apesar de isso ser mais comum em crianças (RIVAS *et al.*, 1997; GO; BALASURIYA; LEE, 2014). Em equinos, aproximadamente 50% dos infectados desenvolvem encefalite (JOHNSON; MARTIN, 1974).

O ciclo enzoótico do VEEV é mantido por reservatórios roedores e outros vertebrados, e tem como vetores mosquitos do gênero *Culex* (WEAVER *et al.*, 2004; DEARDORFF; WEAVER, 2010). Diferentemente dos ciclos do EEEV e WEEV, no ciclo do VEEV

os equinos não são os hospedeiros finais e funcionam como amplificadores, atingindo altos títulos virais no período de viremia e sendo capaz de infectar vetores que participam do ciclo epizootico, como mosquitos do gênero *Aedes* e *Psorophora*. Além de humanos, esses mosquitos podem infectar outros animais, como cães, gatos, morcegos e aves (WEAVER *et al.*, 1999).

Vários surtos de encefalite causada por VEEV já foram registradas, acometendo tanto equinos como humanos. Na Colômbia, em um surto ocorrido na década de 60, foram registrados mais de 200,000 casos em humanos (WEAVER *et al.*, 2004). Em outro surto ocorrido no mesmo país, em 1995, foram registrados mais de 100,000 casos em humanos (RIVAS *et al.*, 1997). No Brasil, o VEEV já foi isolado de morcegos e de mosquitos *Culex* por Calisher e colaboradores (1982) e causou doença em um grupo de treinamento de militares no estado de São Paulo (IVERSON, 1993). Também em São Paulo, já foram detectados anticorpos contra o vírus em amostras de soro de equinos (CUNHA *et al.*, 2009).

### **1.5. Enterovírus**

Os enterovírus (ENTV) são membros da família *Picornaviridae* e compreendem quatro gêneros de importância médica humana, *Enterovirus A*, *Enterovirus B*, *Enterovirus C* e *Enterovirus D*, além dos *Rhinovirus A*, *Rhinovirus B* e *Rhinovirus C* (WALKER *et al.*, 2020). A partícula é esférica e não envelopada, com aproximadamente 30 nm de diâmetro (Figura 6) (FRY; STUART, 2014). Os ENTV possuem genoma de RNA de senso positivo, variando de 7.200 a 8.500 bases, que é utilizado para a tradução de uma única poliproteína, que posteriormente é clivada em várias proteínas virais (Figura 7) (PALMENBERG; NEUBAUER; SKERN, 2014).

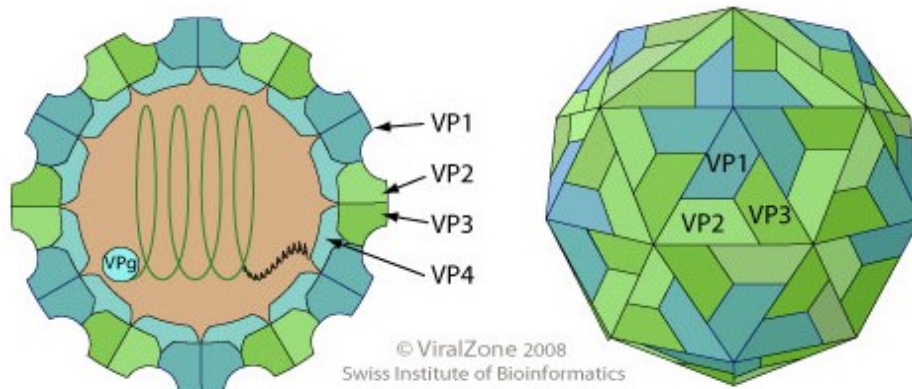


Figura 6 - Diagrama mostrando a partícula viral de um enterovírus. As proteínas que compõem o capsídeo (VP1, VP2, VP3 e VP4) estão representadas. Adaptado de ViralZone. Disponível em: <https://viralzone.expasy.org/97>

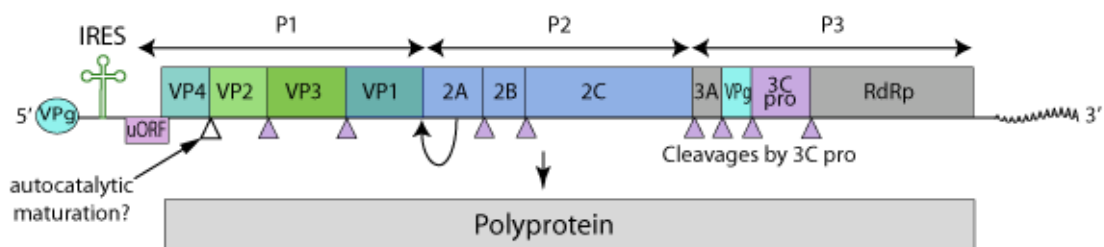


Figura 7 - Esquema mostrando a estrutura de genoma de um enterovírus. São mostrados os sítios de clivagem. Fonte: adaptado de ViralZone. Disponível em: <https://viralzone.expasy.org/97>

Os ENTV apresentam alta diversidade genética e os capazes de infectar seres humanos são divididos em mais de 100 tipos dentro das espécies de A à D. Os enterovírus mais conhecidos são os poliovírus. Os poliovírus compreendem três tipos de enterovírus da espécie *Enterovirus C* e foram responsáveis por grandes surtos de poliomielite ao longo da história, até sua quase erradicação global com o advento da vacina. Os outros enterovírus são divididos entre 21 coxsackievírus do tipo A, seis coxsackievírus do tipo B, 28 echovírus e 48 enterovírus numerados (SIMMONDS *et al.*, 2020). Os enterovírus são transmitidos principalmente pela via fecal-oral, mas alguns podem ser transmitidos por via respiratória (KNIPE *et al.*, 2013).

Apesar das infecções por enterovírus causarem sintomas respiratórios ou gastrointestinais que muitas vezes se resolvem sozinhos em poucos dias, muitos têm habilidade de invadir o sistema nervoso central e podem causar manifestações neurológicas como meningites ou encefalites. Outra manifestação comum é a doença mão-pé-boca, causada principalmente por coxsackievírus. Os ENTV são responsáveis pela maior parte dos

casos de meningite viral em crianças, correspondendo a mais de 50% do total de infecções (HASBUN *et al.*, 2019).

Os casos de meningite por ENTV possuem sintomatologia bem definida e alteram características do LCR de forma consistente. Na maioria dos casos de meningite por ENTV, as crianças apresentam sintomas como febre, dor de cabeça, rigidez nuchal, náusea e vômitos, fotofobia e cansaço. Apesar de não ser tão comum, pacientes com meningite por ENTV também podem apresentar sintomas gastrointestinais, como diarreia (MICHOS *et al.*, 2007). As características do LCR são alteradas seguindo um padrão de infecção viral do SNC. Pacientes com acometimento neurológico infectados por ENTV apresentam pleocitose, com predomínio de neutrófilos polimorfonucleares e aumento de lactato no líquido (BRAUNOVA *et al.*, 2019).

## **1.6. Herpesviridae**

Os herpesvirus são vírus que pertencem a família *Herpesviridae*. Vírus deste grupo que possuem importância médica para humanos estão incluídos principalmente nos gêneros *Simplexvirus*, *Varicellovirus*, *Cytomegalovirus* e *Lymphocryptovirus* (WALKER *et al.*, 2020). Vírus dessa família possuem simetria icosaédrica, são envelopados e o tamanho da partícula varia de 150 a 200 nm (Figura 8). O genoma é composto por uma fita dupla de DNA linear, variando de 120 a 140 mil pares de base. Esses vírus possuem complexos de glicoproteína inseridos em seu envelope, e o capsídeo é envolto por um tegumento (KNIPE *et al.*, 2013).

Uma característica importante dos herpesvírus é a sua capacidade de permanecer em um estado de latência e sofrer reativação. Após a infecção no sítio primário, o vírus migra para neurônios do SNC e entra em latência, encerrando a expressão de genes envolvidos no ciclo lítico, impedindo mecanismos de defesa da célula infectada (como apoptose) e evadindo a resposta imune inata e adaptativa (BRADSHAW; VENKATESAN, 2016).

O Human alphaherpesvirus 1 (HHV-1) é um herpesvírus pertencente ao gênero *Simplexvirus* endêmico no mundo inteiro. É o agente etiológico do herpes labial e corresponde a mais de 90% dos casos de encefalites por herpesvirus (STEINER; BENNINGER, 2013). Levantamentos sorológicos mostram que 60 a 90% dos adultos possuem anticorpos contra o HHV-1 (SMITH; ROBINSON, 2002). A incidência de encefalite por herpesvírus no mundo é estimada em dois a quatro casos por milhão de casos (HJALMARSSON;

BLOMQVIST; SKOLDENBERG, 2007). As manifestações mais comuns em casos de encefalite por herpesvírus são encefalopatia, febre, convulsões, dor de cabeça e sinais neurológicos focais (BRADSHAW; VENKATESAN, 2016).

O Human alphaherpesvirus 3 (HHV-3) é o agente etiológico da catapora e da herpes-zoster. É um vírus que circula exclusivamente em humanos e infecta principalmente crianças, em países que não possuem campanha de vacinação para o público infantil. A infecção primária geralmente se manifesta como catapora, doença caracterizada principalmente pelas lesões no corpo, mas também pode ocorrer manifestações neurológicas, tais como encefalite ou meningite (SCIENCE *et al.*, 2014). A reativação do vírus pode causar a herpes-zoster, em que há lesões na pele em regiões próximas do nervo afetado. Mais raramente, a reativação do HHV-3 também pode causar acometimento neurológico, como encefalite ou meningite (GRAHN; STUDAHL, 2015; NAGEL; GILDEN, 2014). As manifestações neurológicas podem ser acompanhadas ou não das lesões na pele (CIANCIA *et al.*, 2020).

Outros herpesvírus humanos também são associados com manifestações neurológicas em adultos e crianças. A infecção pelo Epstein-Barr vírus (EBV) geralmente é assintomática, mas também pode causar a mononucleose. É estimado que 90% da população humana possua anticorpos contra o EBV. O EBV infecta linfócitos B e se torna latente nesta mesma célula. A reativação na maioria das vezes é assintomática (COHEN, 2000). O EBV também pode causar manifestações neurológicas, principalmente encefalites e meningites. Um estudo com amostras de LCR de pacientes adultos admitidos em um hospital da Coreia entre 2010 e 2019 detectou o DNA do EBV em 6% dos casos. As manifestações mais comuns desses pacientes foram meningite e encefalite (LEE *et al.*, 2021).



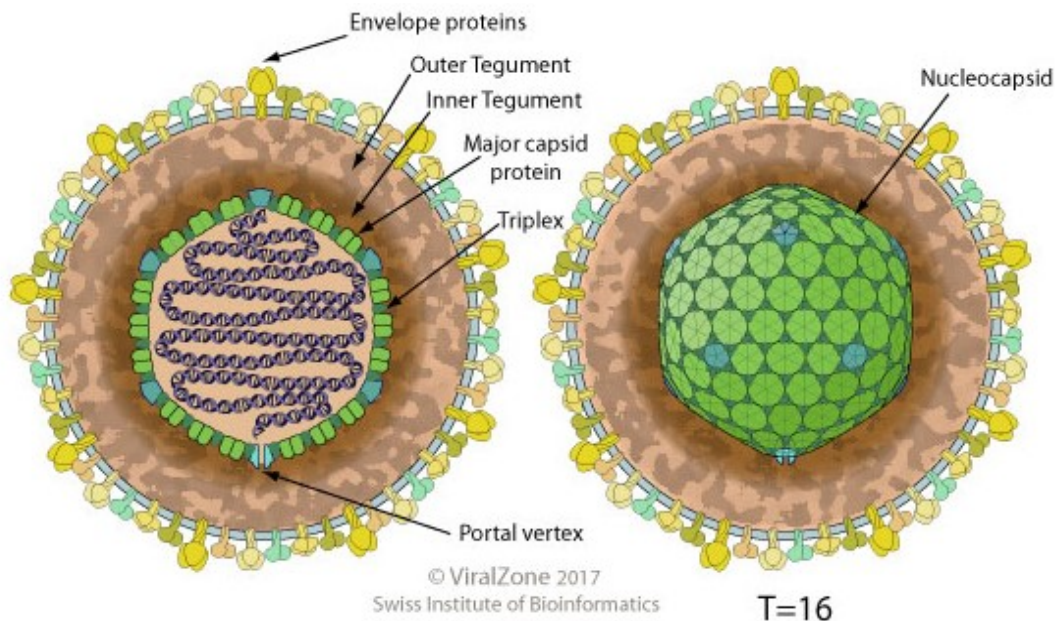


Figura 8 - Esquema mostrando a partícula viral de um herpesvírus. Fonte: adaptado de ViralZone. Disponível em: <https://viralzone.expasy.org/176>

### 1.7. Coronavirus

Os coronavírus são vírus que pertencem a família *Coronaviridae* e são divididos em quatro gêneros: *Alphacoronavirus*, *Betacoronavirus*, *Deltacoronavirus* e *Gammacoronavirus* (WALKER *et al.*, 2020). Os vírus são envelopados, possuem formato esférico e aproximadamente 120 nm de diâmetro (Figura 9). O genoma é composto por um RNA de senso positivo, que varia de 27 a 32 mil bases em tamanho. O genoma também é usado com RNA mensageiro viral, codificando duas poliproteínas que são posteriormente clivadas em proteínas estruturais e proteínas não estruturais (KNIPE *et al.*, 2013).

Os coronavírus são agentes etiológicos de algumas infecções respiratórias do trato superior, como otites, rinite, laringite e faringite, mas alguns também tem a capacidade de atingir o trato respiratório inferior causando bronquite e pneumonia (NICHOLLS *et al.*, 2006). Os primeiros coronavírus de importância médica para humanos foram isolados na década de 60, a partir de amostras de pacientes com infecções respiratórias do trato superior (HAMRE; PROCKNOW, 1966).

Em 2002, o SARS-CoV-1 emergiu e causou uma grande epidemia. O vírus é originário de morcegos e foi demonstrado que as civetas foram hospedeiros intermediários, que permitiram a infecção de seres humanos (GUAN, 2003). Os casos começaram na China, mas

espalharam-se pela Europa e chegaram na América do Norte. Os sintomas iniciais dos pacientes infectados eram semelhantes aos da gripe, mas em 20% dos pacientes o quadro evoluía para síndrome respiratória aguda grave (DESFORGES *et al.*, 2019). A epidemia foi controlada com medidas sanitárias como isolamento de pacientes e quarentena, mas muitos profissionais da saúde foram infectados. No total, houve 8096 casos e 774 mortes, com uma taxa de mortalidade de aproximadamente 10% (CHERRY, 2004).

Em 2012 outro coronavírus emergiu, o MERS-CoV. O vírus foi detectado em indivíduos viajando da península árabe para o Reino Unido, com manifestações graves no trato respiratório inferior e manifestações gastrointestinais (RAJ *et al.*, 2014). O MERS-CoV provavelmente se originou a partir de coronavírus de morcegos e tem dromedários como hospedeiros intermediários. A transmissão entre humanos não é muito eficiente, e a maior parte dos casos foi observada entre membros da mesma família ou profissionais de saúde (COTTEN *et al.*, 2013).

No final de 2019, o SARS-CoV-2 emergiu. Assim como o SARS-CoV-1, o vírus provavelmente se originou em morcegos, mas ainda não está claro se houve um hospedeiro intermediário (ANDERSEN *et al.*, 2020). O SARS-CoV-2 é o agente etiológico da COVID-19. Os sintomas relacionados a infecção pelo SARS-CoV-2 em humanos são febre, tosse seca, mialgia, e em casos mais raros, diarreia. Algumas pessoas infectadas podem desenvolver pneumonia e síndrome respiratória aguda grave (KHAN *et al.*, 2021). O vírus é transmitido entre humanos de forma eficiente e de acordo com os dados mais recentes da Organização Mundial de Saúde sobre a pandemia, houve mais de 168 milhões de casos confirmados e mais de três milhões de mortes (WHO, 2021).

Com o aumento de casos de COVID-19, houve também aumento de manifestações neurológicas associadas ao SARS-CoV-2 reportadas. Uma ampla gama de manifestações neurológicas já foi descrita para pacientes infectados pelo SARS-CoV-2, como encefalite, meningite, encefalopatia, mielite aguda, síndrome de Guillain-Barré, anosmia e hiposmia (ZHANG *et al.*, 2020). Os coronavírus já foram associados a doenças do sistema nervoso central mesmo antes do surgimento do SARS-CoV-2. HCoV-OC43 e HCoV-229E já foram associados a casos de encefalite, esclerose múltipla e encefalomielite (DESFORGES *et al.*, 2019).

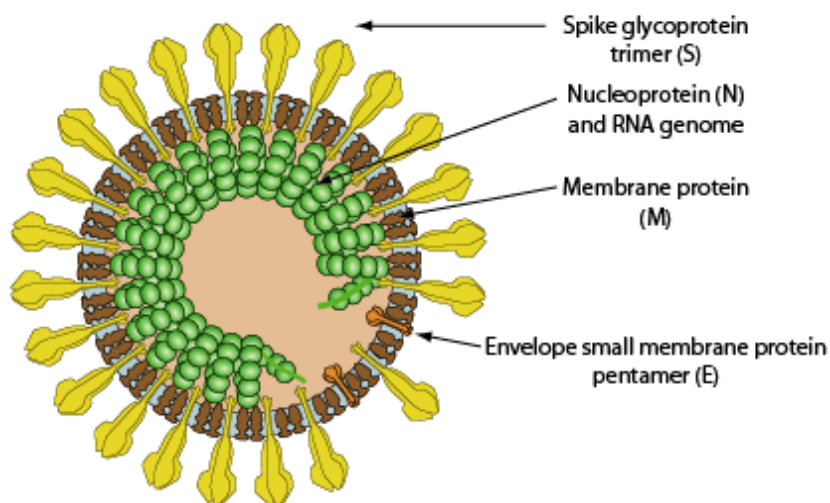


Figura 9 - Esquema mostrando a estrutura da partícula de um coronavírus. Estão representadas as proteínas de membrana (M), espícula (S), nucleoproteína (N) e proteína do envelope (E). Fonte: adaptado de ViralZone. Disponível em: [https://viralzone.expasy.org/764?outline=all\\_by\\_species](https://viralzone.expasy.org/764?outline=all_by_species)

## 1.8. Patogênese

Os arbovírus formam um grupo artificial que compartilham a necessidade de um vetor artrópode para manter seus ciclos de transmissão. O termo vem da expressão inglesa *arthropod borne viruses*, adotada para designar infecções virais cujos agentes são transmitidos para vertebrados através de um vetor artrópode hematófago. Apesar do grupo conter tanto vírus tipicamente viscerotrópicos quanto neurotrópicos, a forma como a infecção se inicia é parecida devido ao mecanismo de entrada dos vírus no hospedeiro vertebrado (ONG; LUM; NG, 2014). Os vírus são introduzidos na pele pela picada de um mosquito e uma multiplicação inicial ocorre principalmente em células dendríticas, que migram para os linfonodos onde a multiplicação continua, produzindo uma viremia que permite a infecção sistêmica ou do alvo específico (MUSTAFÁ *et al.*, 2019; ONG; LUM; NG, 2014).

Apesar de arbovírus serem detectados em casos de infecção do sistema nervoso central (SNC) (WRIGHT *et al.*, 2019; MARINHO *et al.*, 2019; ZACKS, PAESSLER, 2010), a forma como os vírus chegam ao SNC variam de espécie para espécie e ainda não estão completamente elucidadas. Contudo, a via hematogênica é frequentemente investigada como

forma de invasão do SNC por arbovírus. Nessa hipótese, a alta viremia resultante da multiplicação nos linfonodos permite que o vírus cruze a barreira hematoencefálica e chegue ao SNC (SUEN *et al.*, 2014).

A barreira hematoencefálica é uma estrutura que envolve o encéfalo e o protege de patógenos ou substâncias nocivas que possam estar presentes no sangue. Ela é formada por várias células, dentre elas células endoteliais, astrócitos, microglias e pericitos (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008). Vários mecanismos para os vírus atravessarem a barreira hematoencefálica já foram propostos. Um estudo de Dropulic e Masters (1989) utilizando células do endotélio cerebral de camundongos mostrou a capacidade de alguns arbovírus atravessarem a camada de células em cultura e até mesmo de se multiplicarem atingindo altos títulos.

Além do transporte transendotelial, outros estudos mostraram que a infecção e multiplicação em células endoteliais pode afetar os níveis de claudina e ocludina, proteínas constituintes das junções de oclusão. Alterando esse balanço, há uma diminuição das junções de oclusão e aumento da permeabilidade da barreira hematoencefálica, permitindo a invasão do SNC (NEAL, 2014). Outro mecanismo de infecção do SNC que também se beneficia do aumento da permeabilidade da barreira hematoencefálica é o chamado “cavalo de Tróia”. Leucócitos periféricos infectados pelo vírus migram e atravessam a barreira hematoencefálica, liberando as partículas diretamente no SNC (VERMA *et al.*, 2009). Contudo, o aumento da permeabilidade da barreira hematoencefálica já foi demonstrado em estudo *in vivo* após a inoculação intracraniana de WNV em camundongos C57BL/6, sugerindo que o aumento da permeabilidade pode ser uma consequência e não a causa da infecção do SNC (ROE *et al.*, 2012).

Outra rota possivelmente explorada por arbovírus para chegar ao SNC é a transneuronal. Nela, o vírus chega ao SNC através das fibras nervosas, tanto motoras como sensoriais. Estudos *in vivo* mostraram que a partir de um inóculo feito em nervo ciático de hamster, o vírus é posteriormente detectado no SNC. Além disso, em estudos em que WNV foi inoculado pela via intraperitoneal, anticorpos foram posteriormente detectados pela técnica de imuno-histoquímica na região do bulbo olfatório antes de se espalhar pelo encéfalo. Apesar de ainda não haver muitos trabalhos, a hipótese é que o vírus chegue ao

epitélio olfatório através dos vasos fenestrados e seja transportado pelas células nervosas até o SNC (SUEN *et al.*, 2014).

Os coronavírus humanos causam infecções do trato respiratório superior e inferior, mas também estão associados a manifestações neurológicas, que podem ou não estar associadas a invasão do SNC. As rotas de invasão propostas para os coronavírus são a hematogena, com infecção de leucócitos para atravessar a barreira hematoencefálica, ou pela via neural, onde os vírus são transportados por transporte axonal nos nervos olfatório ou trigêmeo, no caso de infecção das vias aéreas superiores, ou pelo nervo vago, no caso de infecções do trato respiratório inferior (GENEROSO *et al.*, 2021).

Os enterovírus podem utilizar algumas das vias descritas anteriormente para invasão do SNC, mas a infecção começa de forma diferente. Os vírus se replicam inicialmente no trato gastrointestinal ou nos pulmões e a partir daí ocorre a disseminação para outros órgãos e tecidos (HUANG; SHIH, 2015). Uma das rotas utilizadas por enterovírus é a do transporte axonal, descrito para poliovirus. Após ganhar acesso ao músculo, o poliovírus entra nos neurônios motores pelas junções neuromusculares e é transportado em vesículas endocíticas do axônio até o corpo celular (MAJER; MCGREEVY; BOOTH, 2020). Essa rota de transporte não é muito eficiente, o que pode explicar o número de casos com acometimento do SNC dado o total de infecções. Porém, já foi demonstrado que lesões podem aumentar significativamente a eficiência do transporte axonal (LANCASTER; PFEIFFER, 2010). Outra forma de invasão do SNC por ENTV seria pela estratégia de cavalo de troia, já descrita nessa seção para os arbovírus. Essa estratégia é suportada pois já foi demonstrada a habilidade dos ENTV de infectar monócitos e outras células do sistema imune (KRAMER *et al.*, 2007; TABOR-GODWIN *et al.*, 2010). Por fim, outro possível mecanismo para invasão do SNC por ENTV é a infecção direta de células que compõe a barreira hematoencefálica e da barreira sangue-líquido cefalorraquidiano, localizada nos quatro ventrículos cerebrais que controlam a produção do LCR. Já foi demonstrada a capacidade de echovirus 30 e coxsackievirus B3 de causar infecção nessas barreiras. Além disso, o poliovirus pode infectar células endoteliais dos vasos sanguíneos no cérebro (MAJER; MCGREEVY; BOOTH, 2020).

## 2. Justificativa

O número de notificações de casos de meningites tem diminuído nos últimos anos no Brasil. Essa mudança, no entanto, ainda chama atenção para o fato de boa parte das infecções do SNC permanecerem sem a identificação do agente etiológico. Meningites podem ser causadas por bactérias, vírus e fungos. Dentre as meningites virais, as manifestações clínicas e sintomas podem ser muito semelhantes para os diferentes agentes etiológicos, o que dificulta o diagnóstico correto.

O emprego de técnicas como a PCR traz vantagens para a prática clínica, reduzindo o tempo para o diagnóstico e aumentando a sensibilidade de detecção dos agentes etiológicos. Contudo, o uso destas técnicas ainda não é acessível a todos os hospitais encontrados em diferentes regiões do país, o que impede o preenchimento de lacunas no diagnóstico das infecções do SNC. Há ainda a preocupação com vírus que podem estar circulando e que são negligenciados no momento do diagnóstico. Enquadram-se neste contexto, principalmente, WNV, SLEV, MAYV, OROV e outros arbovírus.

O diagnóstico correto dos casos de meningoencefalites permite o manejo clínico adequado do paciente e pode reduzir seu tempo de internação ou evitar uso de medicamentos desnecessários. No caso de infecções do sistema nervoso central, esse aspecto é muito importante devido à utilização de antibióticos e antivirais, que podem trazer efeitos colaterais para os pacientes.

A identificação do agente etiológico, além de trazer vantagens para o manejo clínico do paciente, gera dados que podem ser usados para avaliar a situação epidemiológica de uma região, prever e prevenir surtos. Essas informações podem auxiliar no desenvolvimento contínuo e introdução de vacinas para prevenir meningites e encefalites.

Dessa forma, se faz necessário investigar os agentes etiológicos das meningoencefalites em seres humanos, visto que há dados que mostram a circulação de vários vírus associados à meningoencefalites na região, há um número considerável de casos de infecções do SNC e grande parte destes permanece com a etiologia desconhecida.

### **3. Objetivos**

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

Investigar a presença de arbovírus, herpesvírus, enterovírus e coronavírus em pacientes com suspeita de meningoencefalite.

#### **3.2. Objetivos específicos**

- Realizar triagem molecular utilizando PCR em tempo real para detecção de arbovírus como DENV, YFV, SLEV, ZIKV, WNV, CHIKV, MAYV e OROV, herpesvírus como HHV-1 e HHV-3, enterovírus e SARS-CoV-2
- Realizar caracterização genética dos vírus detectados
- Relacionar os dados clínicos com os resultados diagnóstico laboratorial molecular

#### 4. Materiais e métodos

A metodologia empregada neste trabalho consistiu na obtenção de amostras biológicas, triagem molecular através de extração de ácidos nucleicos seguida por PCR. Amostras positivas para enterovírus foram submetidas a tentativas de isolamento e caracterização genética dos vírus utilizando sequenciamento parcial de genoma e análises filogenéticas (Figura 10).

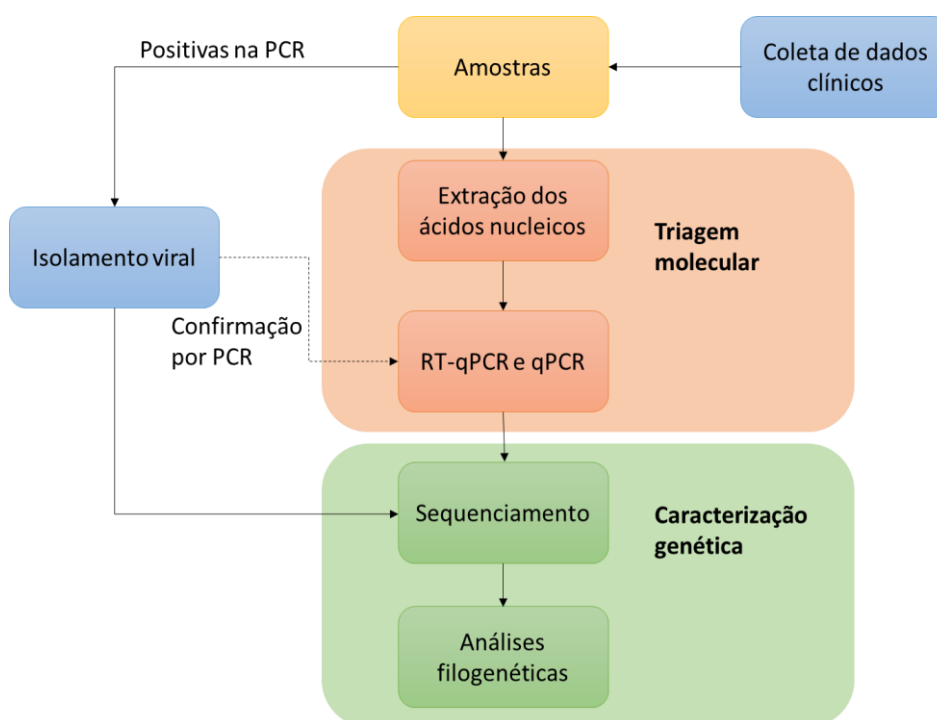


Figura 10 - Esquema mostrando a metodologia adotada neste trabalho.

##### 4.1. Amostras

Este é um estudo retrospectivo feito com amostras de conveniência. As amostras de líquido cefalorraquidiano foram obtidas através de punções de pacientes do Hospital Infantil João Paulo II, no período de agosto de 2019 a abril de 2021. Foram obtidas amostras de pacientes com suspeita de infecção do sistema nervoso central de até 16 anos e de pacientes menores de 2 meses que apresentaram febre sem causa aparente. As amostras coletadas no hospital foram armazenadas em tanques de nitrogênio líquido até o transporte para o Laboratório de Vírus. Para o transporte, as amostras foram acondicionadas em embalagens específicas para o transporte de material biológico, em caixas devidamente identificadas contendo gelo seco para manter a temperatura. Ao chegar no laboratório, as



amostras foram armazenadas em freezers a  $-80^{\circ}\text{C}$ , mantidos em salas trancadas e com acesso restrito.

Além das amostras, foram obtidos dados clínicos e demográficos dos pacientes a partir dos prontuários eletrônicos no hospital. Foram relacionados dados demográficos e clínicos dos pacientes.

Este trabalho possui aprovação do comitê de ética em pesquisa da UFMG, número de CAEE 09273012.9.0000.5149. Todos os pacientes que participaram dessa pesquisa foram autorizados pelos seus pais por meio de assinatura do termo de compromisso livre e esclarecido (Anexo 1).

Amostras positivas detectadas neste trabalho foram cadastradas no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético no projeto com código de identificação A0DEC28.

## **4.2. Extração de ácidos nucleicos**

### **4.2.1 Extração de RNA**

O RNA total foi obtido com o uso do kit de extração QIAamp® Viral RNA Mini Kit (QIAGEN, EUA), seguindo o protocolo do fabricante. O RNA obtido foi identificado e armazenado em freezers  $-80^{\circ}\text{C}$ , quando não foi utilizado imediatamente para PCR.

### **4.2.2. Extração de DNA**

O protocolo descrito por Oliveira foi utilizado (OLIVEIRA, 2015). Foi feita a diluição na proporção 1:10 da amostra de líquido cefalorraquidiano em água livre de nuclease. Posteriormente, a amostra foi aquecida a  $94^{\circ}\text{C}$  por 10 minutos em banho seco e armazenada a  $-20^{\circ}\text{C}$ , quando não foi utilizada imediatamente para PCR.

## **4.3. PCR em tempo real e convencional**

O RNA ou a amostra preparada foram submetidas a técnica de reação em cadeia da polimerase para a triagem molecular. Foram utilizadas as técnicas de qPCR ou RT-qPCR, a depender da natureza do material genético do vírus pesquisado. Foram feitas reações para detecção de arbovírus, herpesvírus, enterovírus e SARS-CoV-2. As reações foram feitas em um volume final de 10  $\mu\text{L}$ , utilizando de 2,5 a 3,5  $\mu\text{L}$  de RNA ou DNA. As condições utilizadas nas corridas foram:  $45^{\circ}\text{C}$  por 15 minutos, para transcrição reversa (exceto para vírus da

família *Herpesviridae*); 95°C por 2 minutos; 95°C por 15 segundos e 60°C por 60 segundos para desnaturação e extensão, respectivamente, repetidos por 40 vezes. Quando não foi utilizada a sonda, foi feita uma etapa adicional para gerar a curva de *melting*. As temperaturas e tempos utilizados nas reações foram ajustados de acordo com o protocolo utilizado. Foram utilizados os reagentes do kit *GoTaq 1-step RT-qPCR* (Promega, EUA) para todas as reações.

Todas as amostras foram testadas em duplicata e consideradas positivas quando houve amplificação em ambos os poços e o *Ct* (*cycle threshold* – ciclo em que foi detectada a amplificação) foi menor ou igual a 38,5, quando não especificado no protocolo utilizado. Amostras em que houve amplificação em apenas uma das replicatas foram consideradas indeterminadas e repetidas posteriormente.

#### **4.3.1. Arbovírus**

Foram feitas reações para detecção de YFV, DENV, ZIKV, WNV, SLEV, CHIKV, OROV e MAYV utilizando o RNA extraído das amostras. Para detecção de MAYV e OROV, foram feitas reações *multiplex* 45°C por 15 minutos para transcrição reversa, 95°C por 2 minutos para desnaturação inicial, 95°C por 3 segundos para desnaturação, 60°C por 30 segundos para anelamento e extensão. As etapas de desnaturação e anelamento e extensão foram repetidas por 45 vezes. Para os outros arbovírus, foi utilizado o ciclo já descrito anteriormente. Os primers utilizados e as referências estão indicados nas tabelas 2 e 3.

#### **4.3.2. Herpesvírus**

Foram feitas reações para detecção de HHV-1 e HHV-3 utilizando o DNA extraído das amostras. Foi utilizado o ciclo já descrito anteriormente, sem a etapa de transcrição reversa e com adição da curva de *melting*. Os primers utilizados e as referências estão descritos na tabela 3.

#### **4.3.3. Enterovírus – RT-qPCR**

Foram feitas reações para detecção de enterovírus utilizando o RNA extraído das amostras. Os primers utilizados são capazes de detectar uma ampla gama de genótipos de várias espécies de enterovírus. Foi utilizado o ciclo já descrito anteriormente, com adição da curva de *melting*. Os primers utilizados e a referência estão descritos na tabela 3.

#### **4.3.4. SARS-CoV-2**

Para detecção do genoma viral do SARS-CoV-2, foi utilizado o kit de iniciadores e sondas “SARS-CoV-2 (2019-nCoV) CDC qPCR Probe Assay” (IDT, EUA). As condições utilizadas nas corridas foram as seguintes: 45°C por 15 minutos, 95°C por 2 minutos, 95°C por 3 segundos, 55°C por 30 segundos, sendo as últimas duas etapas repetidas por 45 vezes (CDC, 2020). O volume final da reação foi de 20 µL, sendo 5 µL de RNA.

#### **4.3.5. Enterovírus – RT-PCR**

As amostras que tiveram o RNA viral detectados na RT-qPCR foram submetidas a outra reação, dessa vez utilizando a técnica de PCR convencional para amplificar um fragmento maior e permitir o sequenciamento. As amostras positivas para enterovírus foram submetidas a nova reação com a seguinte configuração de ciclo: 94°C por 3 minutos, para desnaturação inicial; 35 ciclos de 94°C por 30 segundos, 42°C por 30 segundos e 72°C por 30 segundos, para desnaturação, anelamento e extensão, respectivamente; 72°C por 5 minutos, para extensão final. Os iniciadores estão listados na tabela 4.

Tabela 2 - Iniciadores e sondas utilizados na triagem molecular de vírus em amostras de líquido por PCR em tempo real – Sondas *Taqman*

Iniciadores e sondas	Sequência	Gene alvo / vírus	Tamanho do fragmento	Referência
D1-F	CAAAGGAAGTCGTGCAATA	NS5 - DENV1	112bp	SANTIAGO <i>et al.</i> , 2013
D1-P	CATGTGGTTGGGAGCACGC			
D1-R	CTGAGTGAATTCTCTACTGAAC			
D2-F	CAGGTTATGGCACTGTACGAT	E - DENV2	78bp	
D2-P	CTCTCCGAGAAGCAGCCTCGACTTCAA			
D2-R	CCATCTGCAGCAACACCATCTC			
D3-F	GGACTGGACACACGCACTCA	prM - DENV3	74bp	
D3-P	ACCTGGATGTCGGCTGAAGGAGCTTG			
D3-R	CATGTCTCTACCTTCTCGACTTGTCT			
D4-F	TTGCCTAATGATGCTGGTGC	prM - DENV4	89bp	
D4-P	TTCCTACTCTACGCATCGCATTCCG			
D4-R	TCCACCTGAGACTCCTTCCA			
ZIKV 1086	CCGCTGCCCAACACAAG	E - ZIKV	76pb	LANCIOTTI <i>et al.</i> , 2008
ZIKV 1107-FAM	AGCCTACCTTGACAAGCAGTCAGACACTCAA			
ZIKV 1162c	CCACTAACGTTCTTTGCGACAT			
YFaIF	GCTAATTGAGGTGYATTGGTCTGC	UTR 5' - YFV	88pb	DOMINGO <i>et al.</i> , 2012
YFaIP	ATCGAGTTGCTAGGCAATAAA			
YFaIR	CTGCTAATCGCTCAAMGAACG			
WNV F	CAGACCACGCTACGGCG	UTR 3' - WNV	103pb	OLIVEIRA, 2015
WNV P	TCTGCGGAGAGTGCACTCTGCGAT			
WNV R	CTAGGGCCCGTGGG			
F-CHIKV	AAGCTYCGCGTCCTTACCAAG	E - CHIKV	208pb	PASTORINO
P-CHIKV	CCAATGTCYTCMGCCTGGACACCTT			
R-CHIKV	CCAAATTGTCCYGGTCTTCCT			
MAYV_FNF	CACGGACMTTTCCTTCA	NSP1 - MAYV	60pb	NAVECA <i>et al.</i> , 2017
MAYV_FNP	ACAGATCAGACATGCAGG			
MAYV_FNR	AGACTGCCACCTCTGCTKGAG			
OROV_FNF	TCCGGAGGCAGCATATGTG	Fragmento S - OROV	63pb	
OROV_FNP	CATTTGAAGCTAGATACGG			
OROV_FNR	ACAACACCAGCATTGAGCACTT			

Tabela 3 - Iniciadores utilizados na triagem molecular de vírus em amostras de líquido por PCR em tempo real – *SYBR green*

Iniciadores	Sequência	Gene alvo / vírus	Tamanho do fragmento	Referência
SLEV F	CAGGGAATTACCCAATGTCTAAAAA	UTR 5' - SLEV	64pb	OLIVEIRA, 2015
SLEV R	AGCATATTGACAACCCGGTTTC			
HHV1 F	TTGTCTCCTTCCGTGTTTCAGTT	TK - HHV1	83pb	WILSON <i>et al.</i> , 2006
HHV1 R	GGCTCCATACCGACGATCTG			
HHV3 F	CATCTGCAATTATGCGTCCAA	DNA pol - HHV3	78pb	OLIVEIRA, 2015
HHV3 R	GTTTCCATTGCTGAAT			
ENTV F	ACATGGTGTGAAGAGTCTATTGAGCT	UTR 5' - ENTV	142pb	DIERSSEN <i>et al.</i> , 2008
ENTV R	CCAAAGTAGTCGGTCCGC			

Tabela 4 - Iniciadores para PCR convencional – amostras positivas para enterovírus

Iniciadores	Sequência	Gene alvo / vírus	Tamanho do fragmento	Referência
292	MIGCIGYIGARACNGG	VP1 - ENTV	357	OBERSTE <i>et al.</i> , 2006
222	CICIGIGGIAYRWACAT			

#### 4.4. Eletroforese em gel de poliacrilamida

O material amplificado por PCR convencional foi separado por eletroforese em gel de poliacrilamida 8%. O gel foi preparado utilizando tampão TBE (Tris base-EDTA) e bis acrilamida. Foi adicionado 18 µl do produto amplificado e 2 µl de *loading dye* em cada poço. A corrida foi feita utilizando 10V/cm por uma hora. Após a separação das bandas, a coloração foi feita com o corante *Sybr Gold*, de acordo com o protocolo do fabricante. As bandas foram visualizadas em aparelho transiluminador de luz azul (Invitrogen, EUA).

#### 4.5. Purificação do DNA

Amostras que tiveram bandas separadas por eletroforese no item anterior foram submetidas ao processo de purificação de DNA. As bandas com o tamanho de interesse foram cortadas e transferidas para um microtubo de 0,6 ml com um furo no fundo. O tubo

foi inserido em outro tubo de 1,5 ml e submetido a centrifugação por 1 minuto a 10000 xg e 4°C. Após a centrifugação, o tubo de 0,6 ml foi descartado e 70 µl de água livre de nuclease foi adicionado. O material foi homogeneizado e refrigerado a 4°C por 12 horas. Após esse período, o tubo foi novamente homogeneizado e centrifugado por 1 minuto a 10000 xg e 4°C. O sobrenadante foi coletado, transferido para outro tubo e armazenado a -20°C até ser utilizado.

#### **4.6. Sequenciamento**

Amostras positivas para enterovírus foram submetidas a tentativas de sequenciamento. O sequenciamento foi feito pelo método de Sanger (SANGER; NICKLEN; COULSON, 1977) utilizando o sequenciador automático capilar “ABI 3730 DNA Analyzer” (Applied Biosystems) e usando o kit “BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing” (Applied Biosystems), obedecendo as condições de reação e leitura indicadas pelo fabricante. A qualidade das sequências obtidas foi analisada com o software BioEdit 7.1, onde foram obtidas as sequências consenso daquelas que apresentavam alta qualidade e as sequências dos iniciadores foram removidas.

#### **4.7. Genotipagem**

Para a genotipagem, foi feita uma busca por sequências similares às obtidas anteriormente com o software BLAST 2 (ALTSCHUL *et al.*, 1990). As sequências foram alinhadas com o software ClustalW, no pacote MEGA X. Foi utilizado o modelo de Tamura-Nei, de acordo com o teste de seleção de modelos implementado no próprio MEGA X. A árvore de máxima verossimilhança foi construída com o modelo indicado e o teste de *bootstrap* foi realizado com 1000 replicatas.

#### **4.8. Isolamento viral**

Foram cultivadas células Vero (ATCC CCL-81), HeLa (ATCC CCL-2) e RD (ATCC CCL-136). As células foram mantidas a 37°C em estufa com 5% de CO<sub>2</sub>. Para as células Vero e HeLa, foi utilizado meio MEM com 10% de soro fetal bovino. Para as células RD, foi utilizado uma mistura com partes iguais dos meios MEM e L15, e 15% de SFB. As células foram observadas diariamente para verificar seu crescimento e possível contaminação do meio de

cultura. Para manutenção das células e isolamento, foi utilizado estreptomicina 0,1 µg/ml, penicilina 100 UI/ml e anfotericina B 2µg/ml.

Amostras positivas para enterovírus tiveram as tentativas de isolamento de realizadas utilizando as células Vero, HeLa e RD. Foram inoculados 100 µl de líquido cefalorraquidiano nos poços correspondentes (placa de 6 poços) e adicionado 300 µl do meio respectivo do item anterior sem soro fetal bovino. Pelo período de uma hora, a placa foi incubada em estufa a 37°C sob com homogeneização a cada 15 minutos. Após esse período, foi adicionado 2 ml de meio de cultura contendo antibióticos e sem soro fetal bovino. As células foram observadas diariamente, por sete dias, para verificar a presença de efeito citopático. Nos casos em que não houve efeito citopático, foi feita uma passagem cega com o sobrenadante e observação por mais sete dias. Os resultados foram confirmados por qPCR.

## 4. Resultados

### 4.1. Caracterização dos pacientes

Foram analisadas amostras de 170 pacientes do Hospital Infantil João Paulo II. O período de atendimento dos pacientes desse trabalho compreende os anos de 2019 até 2021. A maior parte das amostras foi coletada entre agosto de 2019 e dezembro de 2020. (Figura 11)

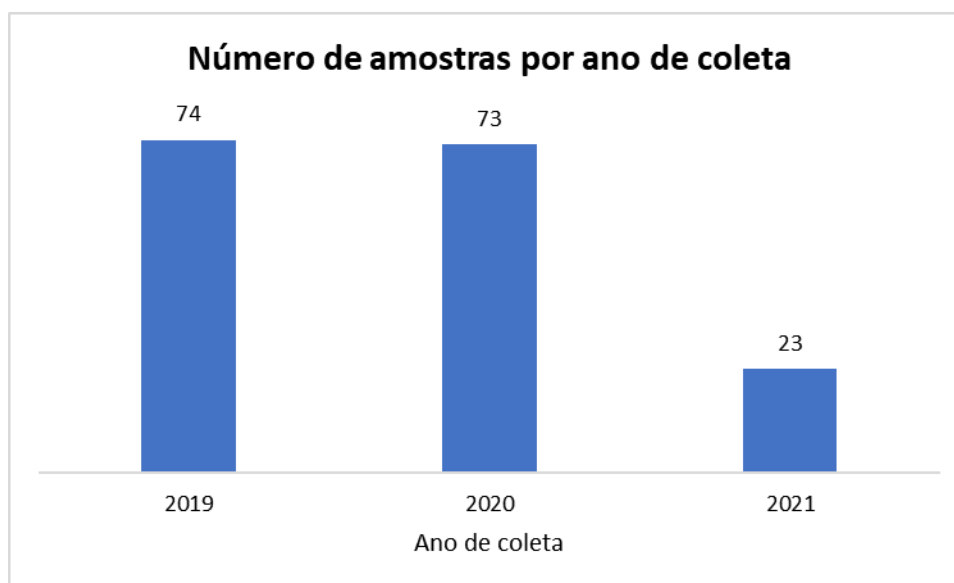


Figura 11 - Número de amostras por ano de coleta neste estudo

Nesta seção serão apresentados os dados demográficos referentes a uma parcela (n=98) do total de 170 pacientes. A maioria dos pacientes era de Belo Horizonte e região metropolitana de Minas Gerais, mas o hospital recebe pacientes de diversas cidades do estado. O maior número de pacientes é de Belo Horizonte (n=38), seguido por Ribeirão das Neves (n=6) e outras cidades da região metropolitana (Figura 12). Além disso, a maioria dos pacientes é do sexo masculino (54%).

A idade dos pacientes variou bastante. A maior parte são pacientes com menos de dois meses de idade (n=23), seguido por crianças entre 6 meses e 1 ano (n=19) e por crianças com idade entre 2 e 6 meses (n=18). Apenas 5 pacientes possuíam mais de 10 anos (Figura 13).

O tempo de internação dos pacientes variou entre 1 e 68 dias. A maioria dos pacientes ficou internado por um período que variou entre 1 e 10 dias (Figura 14).



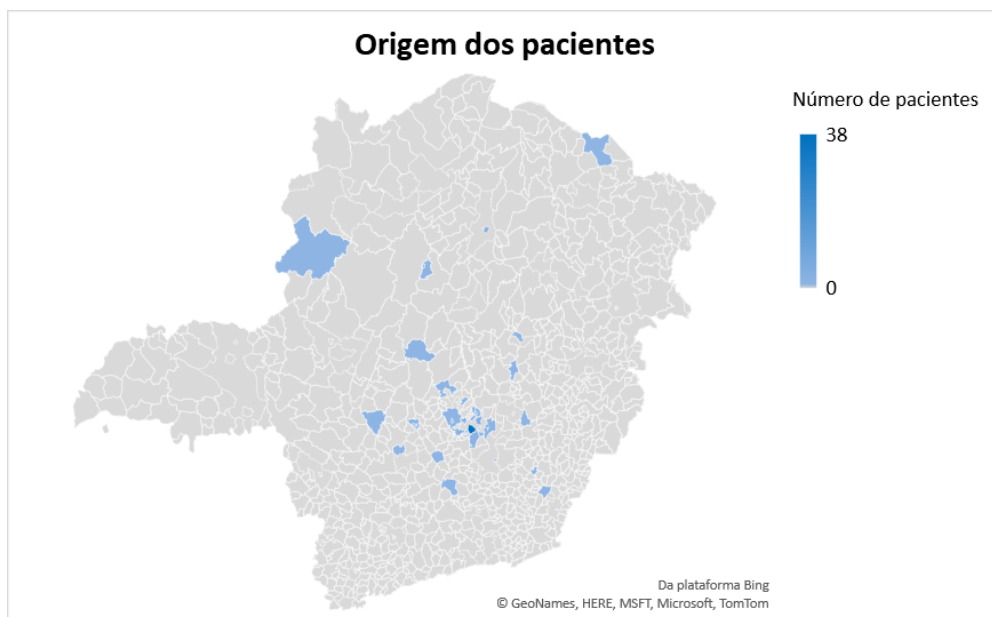


Figura 12 - Cidades de origem dos pacientes envolvidos neste estudo

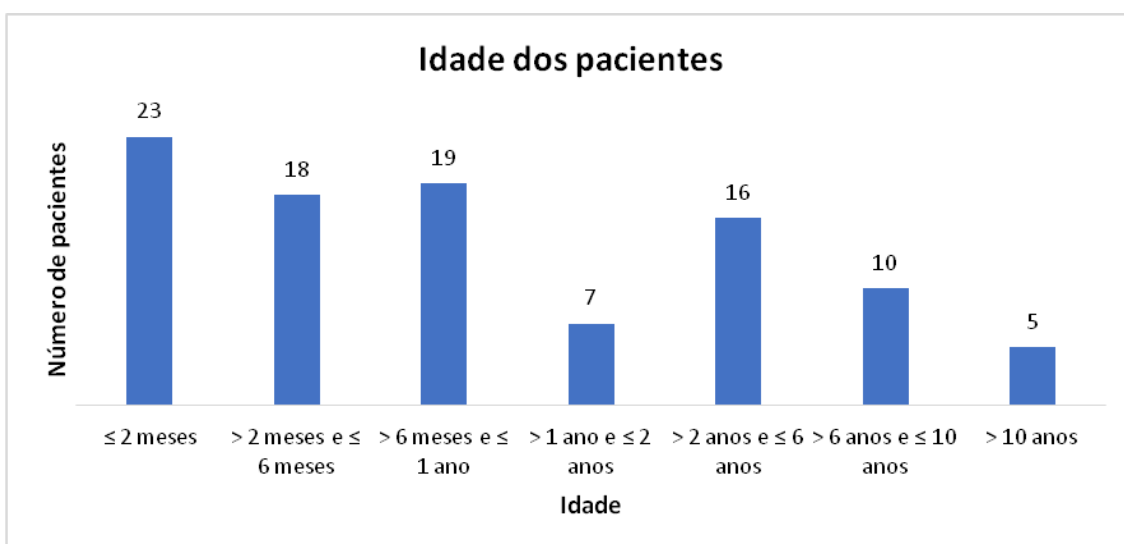


Figura 13 - Idade dos pacientes no momento da coleta do líquido

O diagnóstico presuntivo para os pacientes variou muito. Em 6% dos casos, havia suspeita de meningite bacteriana. Em 16% dos casos, a suspeita era meningite viral. Em 9 e 15% dos casos, respectivamente, a suspeita era meningite ou encefalite não especificada. Contudo, em 30% dos casos havia descrição de sinais meníngeos, mas sem suspeita de meningite. Febre estava em 35% dos prontuários, e em 9% dos casos havia descrição apenas de outros sintomas e suspeitas, como síndrome de Guillain-Barré e sintomas respiratórios.

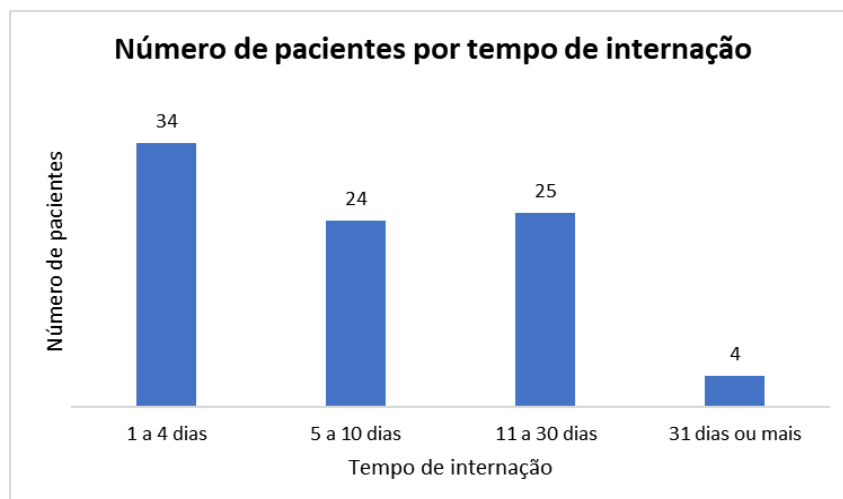


Figura 14 - Número de pacientes por tempo de internação

#### 4.2. Triagem molecular

Ao todo, foram testadas 170 amostras. Dessas, oito foram positivas para enterovírus e uma para Zika virus (Tabela 5). Ainda, três amostras tiveram o rna viral detectado em apenas uma replicata para Zika virus e duas para Dengue virus do sorotipo 1. Foi possível detectar o genoma viral em 9 amostras (5,3%) utilizando as metodologias descritas.

Tabela 5 – Vírus pesquisados por PCR em amostras de LCR de pacientes do Hospital Infantil João Paulo II

Vírus	Quantidade de amostras de LCR		Total
	Positivas	Não detectáveis	
Human alphaherpesvirus 1	0	170	170
Human alphaherpesvirus 3	0	170	170
Sars-CoV-2	0	83	83
Enterovirus	8	162	170
Dengue virus	0	170	170
Yellow fever virus	0	170	170
Zika virus	1	169	170
Saint Louis encephalitis virus	0	170	170
West Nile virus	0	170	170
Chikungunya virus	0	170	170
Mayaro virus	0	170	170
Oropouche orthobunyavirus	0	170	170

As amostras positivas para enterovírus tiveram um Ct médio de 31,18, variando de 28,6 a 35,4. (Tabela 6)

Tabela 6 – Carga viral relativa das amostras de LCR

Enterovirus		Zika virus	
Amostra	Ct das replicatas	Amostra	Ct das replicatas
1120	35,4 34,6	1242	37,2 38
1271	31,9 30,7		
1283	29,1 29,2		
1265	33,3 34,1		
1241	31,6 32,1		
1217	31,1 31		
1278	30,1 29,8		
1309	29,9 30		

#### 4.3. Dados clínicos dos pacientes com amostras positivas para enterovírus

Dos pacientes positivos para enterovírus, metade possuía menos de um ano de idade e todos eram de municípios da região metropolitana de Minas Gerais. Quatro dos pacientes positivos para enterovírus eram residentes da cidade de Belo Horizonte, e os outros de cidades da região metropolitana. O tempo de internação variou de dois a cinco dias e nenhum paciente teve sequelas (Tabela 7). Além disso, a maioria dos pacientes era do sexo masculino.

Tabela 7 - Idade e tempo de internação dos pacientes com diagnóstico laboratorial confirmado para enterovirus

	Identificação dos pacientes							
	1120	1271	1283	1265	1241	1217	1278	1309
Idade	7 meses	2 anos e 3 meses	5 anos e 10 meses	1 mês	3 anos e 3 meses	2 meses	6 meses	4 anos
Tempo de internação (em dias)	4	2	2	4	3	4	5	2
Sexo	Masculino	Masculino	Masculino	Masculino	Masculino	Feminino	Masculino	Masculino

O diagnóstico presuntivo de todos os pacientes com amostras positivas para enterovírus era suspeita de meningite viral e/ou sinais meníngeos, como fontanela abaulada, rigidez na nuca e cefaleia. O exame do líquido desses pacientes, em geral, revelou pequena alteração no número de leucócitos, indicativo de infecção viral. Os valores de glicose, proteína e lactato se apresentaram dentro dos valores de referência ou com pequenos desvios. (Tabela 8)

Tabela 8 – Características do líquido de pacientes positivos com diagnóstico laboratorial confirmado para enterovirus

		Leucócitos (cel/mm <sup>3</sup> )	Linfócitos (%)	Monócitos (%)	Neutrófilos (%)	Glicose (nmol/l)	Proteína (mg/dl)	Lactato (mmol/l)
Valor de referência	< 8 semanas	≤ 25	20 ± 15	70 ± 20	2	45-65	20-45	1-2,2
	> 8 semanas	≤ 5	60 ± 20	30 ± 15	4	30-60	40-80	0,9-2,2
Identificação da amostra	1120	1	80	29	1	52	29	1
	1271	16	47	13	40	58	14	-
	1283	20	23	8	59	69	13	1,6
	1265	7	50	5	44	41	56	1
	1241	40	75	23	1	43	30	1,6
	1217	16	23	52	19	46	26	1,4
	1278	93	50	30	20	49	19	1,3
	1309	75	63	27	6	68	30	2,1

Os pacientes apresentaram valores hemoglobulina e hematócrito dentro ou muito próximo da faixa de referência. Contudo, sete dos pacientes apresentaram valores elevados para proteína C reativa. Um dos pacientes apresentou ligeiro aumento no número de plaquetas. (Tabela 9)

Tabela 9 - Valores de hemoglobina, hematócrito, plaquetas e proteína C reativa dos pacientes com diagnóstico laboratorial confirmado para enterovirus

		Hemoglobina (g/cL)	Hematócrito (%)	Plaquetas (células/mm <sup>3</sup> )	Proteína C reativa (mg/L)
Valor de referência	> 4 e < 8 semanas	13,6-19,6	44-62	150000- 450000	< 5
	> 8 semanas	11,2-14,4	36-42		
Identificação da amostra	1120	11,5	30,8	533000	9,4
	1271	12,8	40,2	276000	2
	1283	12,1	35,2	199000	8,9
	1265	11,8	34,2	262000	14,9
	1241	12	35	339000	22
	1217	10,8	30,6	297000	14,3
	1278	12,2	35,7	403000	37
	1309	12,8	37,8	288000	19,3

A contagem de leucócitos no sangue apresentou valor levemente elevado em um paciente. Nos outros, os valores estão dentro da faixa de referência. Contudo, três pacientes apresentaram elevação no percentual de basófilos, quatro pacientes apresentaram elevação no número de neutrófilos segmentados e quatro pacientes apresentaram redução no percentual de linfócitos (Tabela 10).

Tabela 10 - Contagem de leucócitos no sangue de pacientes com diagnóstico laboratorial confirmado para enterovírus

Amostra	Leucócitos	Basófilos (%)	Neutrófilos segmentados (%)	Eosinófilos (%)	Linfócitos (%)	Monócitos (%)	
Valor de referência	1 mês	5.0–19.5		32–67	0-2	25-37	0-9
	2-11 meses	6.0–17.5	0-1	20–46	0-3	28-84	0-7
	1-6 anos	5.0–14.5		20–48		34-88	0-5
Identificação da amostra	1120	9480	2	25	1	57	8
	1271	10600	0	83	0	12	5
	1283	7980	2	67	0	25	6
	1265	5480	5	40	4	48	3
	1241	15520	7	80	0	6	4
	1217	6710	0	40	2	49	7
	1278	12760	0	45	3	50	2
	1309	10070	10	65	2	16	3

#### 4.4. Dados clínicos de pacientes com amostras positivas para flavivírus

O paciente com amostra positiva para zika vírus (amostra 1242) possuía três meses de idade. O tempo de internação foi oito dias, o paciente era do sexo masculino e foi a óbito.

Tabela 11 - Idade e tempo de internação dos pacientes com diagnóstico laboratorial confirmado para flavivírus

Identificação dos pacientes 1242	
Idade	3 meses
Tempo de internação (em dias)	8
Sexo	Masculino

O diagnóstico presuntivo dos pacientes positivos para zika vírus era de septicemia. O exame do líquido desse paciente mostrou pleocitose elevada, com aumento dos monócitos. Os valores de proteína estavam com leve queda e o lactato estava aumentado, mas o paciente também apresentava septicemia (Tabela 12). Não foi possível obter os valores dos

exames de contagem de leucócitos e hemograma do paciente com amostra positiva para Zika virus.

Tabela 12 - Características do líquido de pacientes com diagnóstico laboratorial confirmado para flavivirus

	Leucócitos (cel/mm <sup>3</sup> )	Linfócitos (%)	Monócitos (%)	Neutrófilos (%)	Glicose (nmol/l)	Proteína (mg/dl)	Lactato (mmol/l)
Valor de referência	> 8 semanas	≤ 5	60 ± 20	30 ± 15	4	30-60	40-80
Identificação da amostra	1242	-	40	52	-	-	20
							0,9-2,2

#### 4.5. Isolamento das amostras positivas para enterovírus

As tentativas de isolamento de amostras positivas para enterovírus foram feitas em células Vero, HeLa e RD. De nove amostras positivas, apenas a amostra 1265 não foi selecionada para tentativa de isolamento devido ao baixo volume disponível. O isolamento foi confirmado por PCR em cinco amostras com uma passagem em células RD, duas amostras após a segunda passagem em células HeLa e nenhuma amostra após três passagens em células Vero (Tabela 13).

Tabela 13 - Detecção de genoma viral de enterovírus por PCR após infecção de células com amostras de líquido de pacientes com diagnóstico laboratorial confirmado para enterovírus

Amostra	Célula		
	RD	HeLa	Vero
	Ct na qPCR		
1120	33,7	35,3	-
1283	29,9	-	-
1271	-	-	-
1241	-	-	-
1217	-	-	-
1278	23,5	-	-
1309	14,9	35,1	-

Nas células RD, foi possível observar efeito citopático em na amostra 1309 no segundo dia após infecção e na amostra 1278 no terceiro dia após infecção. Nos poços com essas

amostras, havia um número maior de células arredondadas e soltas, bem como muitos espaços na monocamada. (Figura 15)

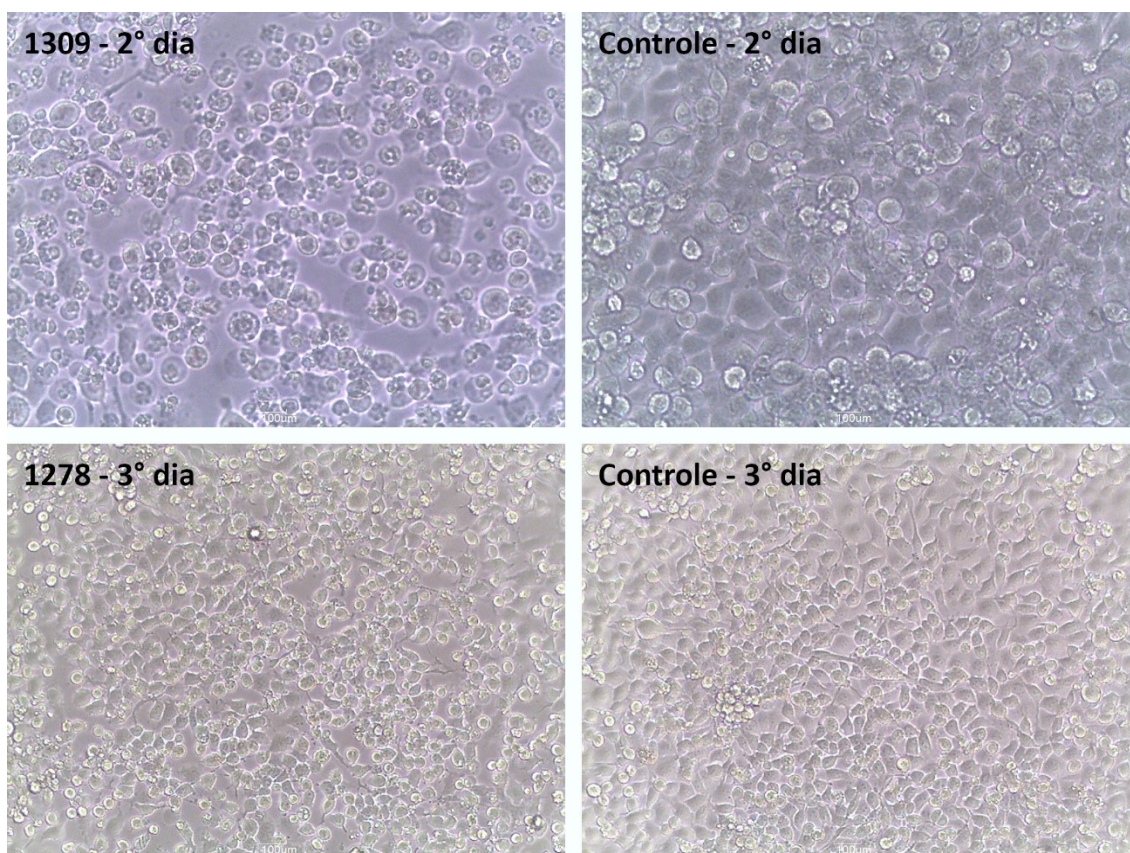


Figura 15 - Efeito citopático de amostras positivas em célula RD. 1309 e controle 2º dia: aumento de 100x. 1278 e controle 3º dia: aumento e 40x.

#### 4.6. Caracterização molecular

Foi possível realizar o sequenciamento de *amplicon* obtido de uma das amostras positivas para enterovirus (amostra 1309). O sequenciamento foi feito a partir do *amplicon* obtido do sobrenadante da primeira passagem em célula RD. Foi obtida uma sequência de 350 bases. Nas outras amostras, a banda observada no gel relativa ao *amplicon* esperado estava fraca, não gerando quantidade de DNA purificado suficiente para o sequenciamento. O mesmo ocorreu com as amostras zika virus positivas, em que a tentativa ocorreu a partir do próprio LCR.

Para determinar o genótipo da amostra, foi feita uma reconstrução filogenética utilizando o modelo de substituição de nucleotídeos de Tamura-Nei, pelo método da máxima verossimilhança. Todas as sequências da mesma espécie se agruparam em um clado



com alto suporte estatístico. Para a espécie *Enterovirus B*, apesar da relação entre os genótipos não estar bem resolvida, as sequências do mesmo genótipo foram agrupadas entre si com alto suporte estatístico. A sequência obtida a partir da amostra 1309 se agrupou em um clado formado apenas por sequências de echovirus 6 (Figura 16; a reconstrução filogenética sem compressões pode ser vista no apêndice 1).

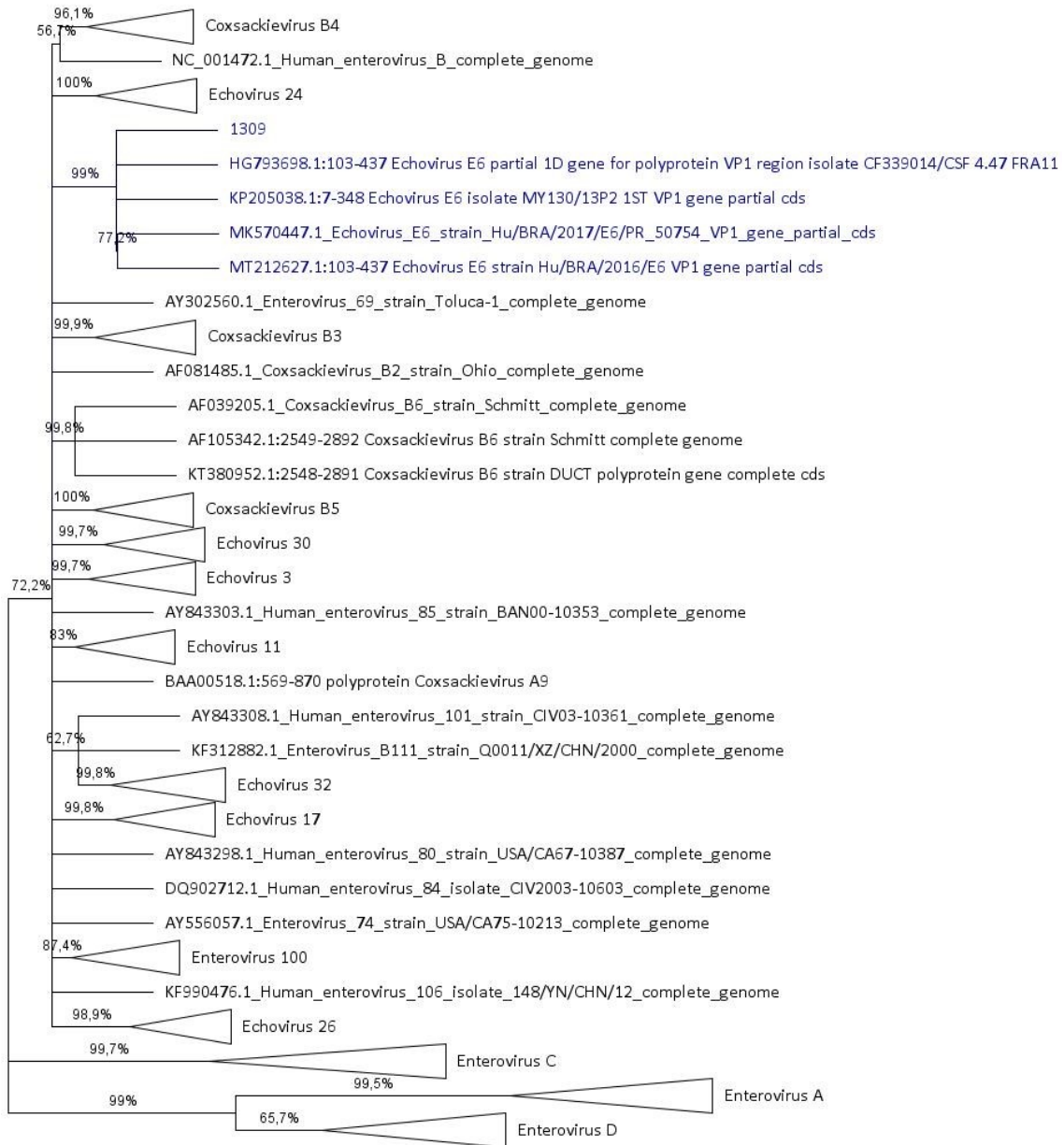


Figura 16 - Reconstrução filogenética mostrando agrupamento da amostra sequenciada com echovirus 6.

A história evolutiva foi inferida usando o método da máxima verossimilhança e o modelo Tamura-Nei (TAMURA; NEI, 1993). A porcentagem de árvores em que os táxons associados se agruparam juntos está mostrada próxima aos ramos. Foi usada uma variação *gamma* para

modelar as diferentes taxas evolutivas entre os sítios de nucleotídeos (cinco categorias (+G, parâmetro = 0.4405)). A árvore está exibida em escala, com o comprimento dos ramos medido em número de substituições por sítio. A análise envolveu 63 sequências de nucleotídeos. Havia 285 posições no dataset final. As análises evolutivas foram conduzidas no pacote MEGA X (KUMAR *et al.*, 2018).

## 5. Discussão

O Hospital Infantil João Paulo II é referência em pediatria e se localiza em Belo Horizonte, na região metropolitana de Minas Gerais. Isso justifica a quantidade de pacientes provenientes dessa região do estado de Minas Gerais. Contudo, pessoas de outras cidades podem ser encaminhadas para o hospital, dadas às limitações nos recursos de cada cidade e/ou hospitais.

O percentual de pacientes cujas amostras foram positivas em testes moleculares, indicando uma infecção viral no SNC, nesse trabalho foi de 5,3%. Em mais de 90% das amostras, não foi possível identificar o agente etiológico no LCR, dentre os vírus investigados com as metodologias aqui empregadas. A taxa de amostras positivas em trabalhos similares é variável. Durante os anos de 2019 e 2020, Crispim (CRISPIM, 2020) obteve uma taxa de 36% de amostras positivas para os vírus pesquisados, utilizando metodologia similar e amostras de LCR provenientes de pacientes de idade similar e do mesmo hospital que as utilizadas neste trabalho. Marinho (MARINHO, 2019), utilizando também amostras do mesmo hospital e de pacientes de idade similar, coletadas entre 2014 e 2018, teve uma taxa de amostras positivas de 19% considerando todos os vírus pesquisados. Em um estudo retrospectivo (AKKAYA *et al.*, 2017) com amostras de LCR de crianças e adultos realizado na Europa, houve 21% de amostras positivas considerando bactérias e vírus. Um estudo similar realizado em São Paulo (FERREIRA *et al.*, 2019), no período de agosto de 2012 a janeiro de 2013, resultou em uma taxa de amostras positivas de aproximadamente 5% para os vírus pesquisados.

Alguns fatores podem alterar a taxa de amostras positivas no estudo, principalmente os critérios para seleção de amostras. Considerar apenas amostras de pacientes com suspeita de meningite e/ou encefalite viral ou apenas amostras sabidamente negativas para bactérias e fungos aumentaria a taxa de amostras positivas. Porém, esses critérios também poderiam excluir amostras em que há coinfeção entre bactérias e vírus.

Neste trabalho foram incluídas amostras de pacientes com menos de dois meses de idade. Por protocolo do hospital, todos os pacientes nesta faixa etária que apresentam febre sem causa aparente são puncionados, o que justifica o número elevado de pacientes nesta idade comparado com a quantidade de pacientes com mais de um ano de idade. Uma

vantagem de utilizar as amostras desses pacientes, em que muitas vezes não havia suspeita de infecção do SNC, é a possibilidade de encontrar manifestações atípicas relacionadas aos vírus pesquisados.

Mais da metade das amostras analisadas neste trabalho foi coletada de pacientes com menos de um ano de idade. Somente as amostras de pacientes que foram puncionados com menos de dois meses de idade representam aproximadamente 25% do total de amostras. Um cenário semelhante foi observado em um estudo feito nos Estados Unidos (HASBUN *et al.*, 2019), que revelou um número alto de pacientes menores de um ano de idade, assim como neste trabalho. Neste mesmo estudo (HASBUN *et al.*, 2019), houve um número ligeiramente maior de pacientes do sexo masculino (55%), o que também foi observado no presente trabalho (54% do sexo masculino). Essa proporção maior de pacientes do sexo masculino em casos de meningite viral é observada em diversos países e em diversos períodos e ressalta a importância do sexo em infecções do SNC em pacientes menores de 15 anos (PEER; SCHWARTZ; GREEN, 2019).

Os enterovírus foram os vírus mais detectados neste trabalho, representando 88% (8/9) das amostras em que foi possível identificar o genoma viral. Enterovírus são a causa mais comum de meningite em crianças e representam a maior parte dos agentes etiológicos identificados em casos de meningite viral. No trabalho de Hasbun (HASBUN *et al.*, 2019), que avaliou os agentes etiológicos em casos de infecção do sistema nervoso em crianças dos Estados Unidos, mais de metade (58%) dos agentes etiológicos identificados foram enterovírus. Porém, pode haver variação nesse índice, principalmente de acordo com a região geográfica e a circulação de outros vírus que afetam o sistema nervoso central, como os arbovírus ou herpesvírus. Um trabalho realizado na Amazônia (BASTOS *et al.*, 2014) no período de 2010 a 2012 com amostras de LCR pacientes de todas as idades teve 32% das amostras positivas identificadas como enterovírus, mas ao considerar os herpesvírus como um grupo, estes foram os mais encontrados (considerando Epstein-Barr vírus, citomegalovírus, varicella-zoster vírus e os herpesvírus humanos tipo 1 e 2).

As amostras positivas para enterovírus, analisadas neste trabalho, foram coletadas entre os meses de setembro e março do período de 2019 a 2020. Apenas uma das amostras foi coletada no mês de maio. Essa sazonalidade dos enterovírus é esperada, em que há

aumento de casos nos meses da primavera e verão. Outros trabalhos realizados com amostras de LCR de pacientes com idade similar e desse mesmo hospital também verificaram essa sazonalidade para o perfil de infecções causadas por enterovírus (CRISPIM 2020; MARINHO, 2019). George e colaboradores, ao avaliar dados de pacientes hospitalizados nos Estados Unidos entre 2000 e 2010, também observou aumento nos casos de encefalite viral por enterovírus nos meses do verão (GEORGE; SCHNEIDER; VENKATESAN, 2014).

A sazonalidade também é observada para a circulação dos arbovírus. A amostra positiva para zika virus analisada neste trabalho foi coletada em novembro de 2019 (amostra 1242). Crispim (CRISPIM, 2020), ao analisar amostras de LCR de pacientes infantis provenientes do mesmo hospital, observou predominância de amostras positivas para dengue nos meses de janeiro e fevereiro de 2019. O trabalho de Viana, que analisou estudos referentes a dengue a variações meteorológicas, mostrou uma relação entre o período com maior pluviosidade com o aumento do número de casos de dengue, principalmente entre o segundo e quarto mês do ano (VIANA; IGNOTTI, 2013).

Não foram encontradas amostras positivas para o RNA do vírus da dengue neste trabalho. Trabalhos anteriores realizados no mesmo hospital com amostras de LCR de pacientes infantis, nos períodos de 2010 a 2019, tiveram taxas de amostras positivas para dengue bastante variadas, indo de 6 a 27% do total de amostras incluídas nos estudos (DE OLIVEIRA *et al.*, 2017; SILVA MARINHO; KROON, 2019). Uma variação muito intensa no número de casos de dengue nos últimos anos foi observada. No primeiro semestre de 2019 houve um número alto de casos no estado de Minas Gerais e outras regiões do país, o que pode estar associado ao elevado número de amostras positivas para dengue no trabalho de Crispim, LCR de pacientes infantis no HIJPII (CRISPIM, 2020). No período em que foi atendida a maior parte dos pacientes incluídos no presente trabalho, que vai de setembro de 2019 a dezembro de 2020, o número de casos de dengue no estado de Minas Gerais foi baixo comparado a anos epidêmicos. Em 2020, foram notificados 84.636 casos prováveis de dengue em MG, enquanto em 2019 esse número foi de 474 mil (MINAS GERAIS, 2021). Estudos similares também mostram variação no número de amostras positivas para dengue. Um trabalho realizado no estado do Amazonas, com amostras de LCR de adultos e crianças no período de 2010 a 2012, obteve quatro amostras positivas para dengue, em um total de

165 (BASTOS *et al.*, 2014). Outro trabalho, realizado no Equador com amostras de LCR de pacientes adultos com sintomas atendidos em 2016, encontrou cinco amostras positivas (pacientes foram diagnosticados com encefalite, síndrome de Guillain-Barré e meningite) para dengue em um total de 16, utilizando PCR multiplex para zika, chikungunya e dengue (ACEVEDO *et al.*, 2017).

Um paciente teve amostra positiva para o RNA de Zika virus no líquido. O Zika virus foi introduzido no Brasil em 2015 e causou uma grande epidemia no ano de 2016. Desde então, o número de casos tem sido distribuído principalmente nos períodos chuvosos e vem diminuindo em relação ao primeiro surto de 2016 (BRASIL, 2018; BRASIL, 2019; BRASIL, 2021a; BRASIL, 2021b). Na epidemia de 2016 o Zika virus foi associado ao aumento de casos de microcefalia em fetos (KLEBER DE OLIVEIRA *et al.*, 2016). Apesar de não serem frequentes, manifestações neurológicas associadas ao Zika vírus também podem acontecer em crianças e adultos. Vieira e colaboradores (VIEIRA *et al.*, 2018) relataram um caso de encefalite associada ao Zika virus e reativação do Varicella-zoster em uma criança de oito anos. Em trabalhos anteriores (SILVA MARINHO; KROON, 2019; CRISPIM, 2020) com amostras do Hospital Infantil João Paulo II houve detecção do RNA de zika em líquido de pacientes com suspeita de meningite ou encefalite, todos provenientes da região metropolitana de Minas Gerais. Um estudo realizado no Rio de Janeiro e conduzido no Hospital Universitário Antônio Pedro acompanhou pacientes admitidos entre 2015 e 2016 e comparou os dados com um período similar de 2013 a 2014, isso mostrou um aumento no número de pacientes admitidos com síndrome de Guillain-Barré e encefalite desde a epidemia de zika em ocorrida em 2016 (DA SILVA *et al.*, 2017).

Não foram encontradas amostras de LCR positivas para o vírus da febre amarela neste trabalho. Não há detecção de casos de febre amarela no estado de Minas Gerais desde 2018. Contudo, Marinho e colaboradores encontraram uma amostra positiva para YFV em paciente com acometimento neurológico (MARINHO, 2019), durante o período da epidemia de febre amarela ocorrida em 2017. No presente trabalho, no entanto, uma amostra teve IgM para YFV detectada no líquido (amostra 1408, sem detecção do genoma viral). A amostra é proveniente de uma criança do sexo feminino com um ano e um mês de idade. Manifestações neurológicas também podem ocorrer como reações causadas pela vacinação contra febre amarela. Um estudo realizado em São Paulo encontrou 42 casos de

acometimento neurológico em pacientes após a vacinação, sendo que em 15 deles houve detecção de anticorpos contra febre amarela no líquido (RIBEIRO *et al.*, 2021). Vários fatores são importantes para a detecção do genoma viral na amostra, principalmente o tempo da coleta em relação ao aparecimento dos sintomas e a carga viral associada.

Neste trabalho não foram encontradas amostras de líquido positivas para o genoma do SARS-CoV-2. Contudo, uma das amostras analisadas foi coletada de um paciente com suspeita de manifestação neurológica por COVID-19, que testou positivo para SARS-CoV-2 em amostra de swab nasal, seis dias antes da coleta do líquido (amostra 1419). A COVID-19 pode causar manifestações neurológicas diversas. Fragoso (FRAGOSO *et al.*, 2021) e colaboradores reportaram um caso de encefalite associado à covid-19 em um recém-nascido em que houve detecção do genoma viral por PCR em swab nasal, mas não houve detecção no líquido. Apesar de raros, existem casos em que o RNA viral pode ser detectado em líquido e que podem indicar neuroinvasão. Li e colaboradores (LI; ZHANG; TAN, 2021), em uma revisão com dados coletados até outubro de 2020, indicam o potencial neuroinvasivo do SARS-CoV-2 ao apresentar 30 casos de pacientes com sintomas neurológicos que tiveram o líquido submetido a PCR e houve detecção do genoma viral do SARS-CoV-2.

Uma das amostras de pacientes com infecção por enterovírus confirmada por diagnóstico laboratorial foi identificada por sequenciamento como echovirus 6. O paciente amostrado apresentou quadro típico de meningite viral, com febre, cefaleia, vômitos e rigidez nuchal. O líquido apresentou pleocitose compatível com quadro viral e sem alterações nos valores de glicose e proteína. O exame de sangue do paciente revelou aumento na proteína C reativa. O paciente possuía quatro anos de idade na época do atendimento, se recuperou bem e não teve sequelas.

Os enterovírus são a causa mais comum de meningite viral em crianças nos Estados Unidos (HASBUN *et al.*, 2019). Estudos anteriores, com amostras de pacientes menores de quinze anos do mesmo hospital detectaram, a presença do RNA viral de enterovírus e tiveram taxas de amostras positivas muito variadas (DE OLIVEIRA *et al.*, 2017; SILVA MARINHO; KROON, 2019; CRISPIM, 2020). Um estudo realizado no Irã, com pacientes de até treze anos de idade com suspeita de meningite asséptica, detectou enterovírus por PCR em nove das 50 amostras incluídas, mas sem a identificação do genótipo (SADEGHI *et al.*, 2017).

No Brasil, Bastos e colaboradores (BASTOS *et al.*, 2014) detectaram enterovírus em 16 de 165 amostras testadas, provenientes de adultos e crianças de Manaus com suspeita de infecção viral do SNC, também sem a identificação do genótipo. No trabalho de Marinho (MARINHO, 2019), das 14 amostras positivas para enterovírus, seis foram identificadas como pertencentes a espécie *Enterovirus B*, sem identificação do genótipo. Um estudo realizado em São Paulo (ROCHA *et al.*, 2021), com amostras de LCR de 288 pacientes coletadas entre julho e dezembro de 2017, detectou enterovírus em 16 amostras e identificou cinco delas, revelando a circulação de echovirus 3 e coxsackievirus B4 (pertencentes a espécie *Enterovirus B*) e coxsackievirus A6 (espécie *Enterovirus A*).

No presente trabalho, foi mostrada a circulação de echovirus 6 em Belo Horizonte. Echovirus 6 causam mais comumente manifestações no sistema nervoso, como meningite e encefalite, mas também estão associados a infecção do trato respiratório superior e pneumonia (LEE *et al.*, 2010). Um estudo identificou echovirus 6 na maior parte das amostras de LCR obtidas em um surto de meningite na França, em 2006, com amostras de adultos e crianças (MIRAND *et al.*, 2008). Um trabalho que analisou amostras de fezes e líquido obtidas de crianças com meningite na Polônia entre 2015 e 2019 identificou principalmente coxsackievirus B5, echovirus 30 e echovirus 6 (TOCZYLOWSKI *et al.*, 2020). Um cenário semelhante foi observado na Grécia, por um estudo que analisou amostras de LCR, de pacientes adultos e crianças coletadas entre 2006 e 2007, e a maioria dos enterovírus identificados foram echovirus 6 (PAPA *et al.*, 2009). No Brasil, o echovirus 6 foi identificado em 12 amostras de líquido coletadas de pacientes de todas as idades durante um surto de meningite asséptica ocorrido em São Paulo, na cidade de São Joaquim da Barra, no ano de 2004 (LUCHS *et al.*, 2008). Na Itália, um estudo realizado com amostras de esgoto coletadas no ano de 2016, apontou a presença de echovirus 6 na maior parte das amostras (PELLEGRINELLI *et al.*, 2019). Por fim, um estudo realizado na Rússia com amostras de esgoto coletadas entre 2004 e 2017 mostrou relação entre a detecção de echovirus 6 nessas amostras com isolados obtidos de amostras de fezes de pacientes adultos e crianças com meningite asséptica (IVANOVA *et al.*, 2019).

Sete amostras positivas para enterovírus por qPCR foram selecionadas para tentativa de isolamento. Após uma passagem em célula, foi possível detectar o RNA viral no sobrenadante celular de cinco das sete amostras, utilizando célula RD. Em duas delas foi



possível observar efeito citopático no segundo (amostra 1309) e terceiro dia (amostra 1278) após a infecção. O isolamento é uma técnica importante para o diagnóstico microbiológico, mas possui limitação em relação aos microrganismos não cultiváveis e partículas não viáveis. Nem todos os enterovírus são cultiváveis atualmente, como alguns membros do antigo grupo dos coxsackievirus A (MAZZULLI, 2008). A célula RD é altamente susceptível a infecção por vários enterovírus, o que pode explicar a alta taxa de detecção do RNA viral após uma passagem em célula (WHO, 2015).

O exame do líquido dos oito pacientes positivos para enterovírus revelou pleocitose em cinco deles. Contudo, o número de leucócitos em nenhum dos casos estava acima de  $100/\text{mm}^3$ , o que é típico de líquido com padrão de infecção viral (MONTEIRO DE ALMEIDA *et al.*, 2007). Três dos pacientes não apresentaram pleocitose. Dois deles tinham menos de dois meses e idade e o outro possuía sete meses. Um estudo retrospectivo na Coreia (KO *et al.*, 2019) investigou a diferença entre várias características em pacientes com meningite por enterovírus com e sem pleocitose e relatou uma diferença na frequência dos casos em que não há pleocitose de acordo com a idade. Os casos em que não há pleocitose são mais comuns em pacientes com menos de três meses de idade (82,8%), seguido por pacientes com idade entre três meses e três anos (53,8%). Não houve alteração nos valores de glicose e proteínas dos oito pacientes analisados. A porcentagem de neutrófilos e linfócitos também não apresentou valores alterados nesses mesmos pacientes.

A realização de testes laboratoriais para a identificação do agente etiológico é necessária para o diagnóstico de infecções virais, uma vez que apenas as manifestações clínicas não podem diferenciar os agentes etiológicos na maior parte dos casos. Nesse sentido, a PCR é muito importante para diagnóstico em infecções do sistema nervoso central. A técnica pode ser executada em poucas horas em um laboratório de diagnóstico e pode ter sensibilidade e especificidade extremamente elevadas, quando realizada com os iniciadores corretos. Além disso, a PCR pode ser feita em laboratórios NB2, sendo considerada de menor risco para o operador que o isolamento viral.

O isolamento viral é uma técnica importante, mas que possui várias limitações para o diagnóstico, sendo a principal delas o tempo necessário, que pode variar de poucos dias a mais de uma semana. Além disso, outra limitação do isolamento é a disponibilidade de

células adequadas, visto que diferentes vírus precisam de células específicas para multiplicação e que nem todos os vírus são cultiváveis, até o momento.

Este estudo mostrou a detecção de RNA viral de enterovírus e zika virus em LCR de crianças com suspeita de infecção do SNC. Enquanto os enterovírus são a causa mais comum de meningite viral em crianças (HASBUN *et al.*, 2019), este trabalho mostrou que o zika virus pode ser um importante agente infeccioso do SNC. O diagnóstico correto das infecções do SNC é importante para o manejo clínico do paciente, já que pode reduzir o uso desnecessário de antibióticos e antivirais, ambos capazes de causar efeitos diversos em pacientes já debilitados. Este trabalho também fornece dados para a caracterização epidemiológica das meningites em Minas Gerais. Essa caracterização é importante pois pode ajudar na caracterização e prevenção de surtos de meningite, bem como guiar a implementação e desenvolvimento contínuo de vacinas para prevenção da doença.

Mais testes precisam ser feitos para aumentar o conhecimento sobre a etiologia das infecções do sistema nervoso central, uma vez que mesmo com os avanços e ampliação do diagnóstico molecular, o número de casos com etiologia desconhecida permanece alto.

## **6. Conclusões**

- Foram analisadas 170 amostras de pacientes com menos de 16 anos atendidos no Hospital Infantil João Paulo II entre 2019 e 2021, oito delas foram positivas para enterovírus e uma para zika vírus;
- Pacientes com amostras positivas para enterovírus eram majoritariamente do sexo masculino;
- Análise de características do líquido e sangue de pacientes positivos para enterovírus revelou o perfil típico de meningite viral;
- A partir de oito amostras positivas para enterovírus inoculadas em células RD, foram isolados os vírus em cinco amostras;
- Echovirus 6 foi identificado e seu papel como agente causador de meningite viral é reconhecido mundialmente;
- Enterovírus exibem importância epidemiológica em casos de meningite asséptica.

## 7. Referências bibliográficas

ACEVEDO, N. *et al.* Zika virus, chikungunya virus, and dengue virus in cerebrospinal fluid from adults with neurological manifestations, Guayaquil, Ecuador. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, n. JAN, 24 jan. 2017.

ACOSTA-AMPUDIA, Yeny *et al.* Mayaro: an emerging viral threat?. **Emerging Microbes & Infections**, [s.l.], v. 7, n. 1, p.1-11, dez. 2018. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1038/s41426-018-0163-5>.

ACRANI, Gustavo Olszanski *et al.* Apoptosis induced by Oropouche virus infection in HeLa cells is dependent on virus protein expression. **Virus Research**, [s.l.], v. 149, n. 1, p.56-63, abr. 2010. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.virusres.2009.12.013>.

AGUILAR, Patricia V. *et al.* Genetic Characterization of Venezuelan Equine Encephalitis Virus from Bolivia, Ecuador and Peru: Identification of a New Subtype ID Lineage. **Plos Neglected Tropical Diseases**, [s.l.], v. 3, n. 9, p.1-8, 15 set. 2009. Public Library of Science (PLoS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0000514>.

AKKAYA, O. *et al.* Real-time PCR Detection of the Most Common Bacteria and Viruses Causing Meningitis. **Clinical Laboratory**, v. 63, n. 04/2017, 2017.

ALICE, F. J. Infecção humana pelo vírus “leste” da encefalite equina. **Bol Inst Biol Bahia**, v. 3, p. 3-9, 1956.

ALMEIDA BENTES, A.; KROON, E. G.; ROMANELLI, R. M. DE C. Neurological manifestations of pediatric arboviral infections in the Americas. **Journal of Clinical Virology**, v. 116, jul. 2019.

ALTSCHUL, S. F. *et al.* Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**, v. 215, n. 3, out. 1990.

ANDERSEN, K. G. *et al.* The proximal origin of SARS-CoV-2. **Nature Medicine**, v. 26, n. 4, 17 abr. 2020.

BASTOS, M. S. *et al.* Detection of herpesvirus, enterovirus, and arbovirus infection in patients with suspected central nervous system viral infection in the Western Brazilian Amazon. **Journal of Medical Virology**, v. 86, n. 9, p. 1522–1527, 2014.

BECK, C. E.; WYCKOFF, R. W. G.. VENEZUELAN EQUINE ENCEPHALOMYELITIS. **Science**, [s.l.], v. 88, n. 2292, p.530-530, 2 dez. 1938. American Association for the Advancement of Science (AAAS). <http://dx.doi.org/10.1126/science.88.2292.530>.

BENSON, Dennis A. *et al.* GenBank. **Nucleic Acids Research**, [s.l.], v. 41, n. 1, p.36-42, 26 nov. 2012. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gks1195>.

BERGREN, N. A. *et al.* Western Equine Encephalitis Virus: Evolutionary Analysis of a Declining Alphavirus Based on Complete Genome Sequences. **Journal Of Virology**, [s.l.], v. 88, n. 16, p.9260-9267, 4 jun. 2014. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/jvi.01463-14>.

BLOHM, Gabriela M; A LEDNICKY, John; WHITE, Sarah K; MAVIAN, Carla N; MÁRQUEZ, Marilianna C; GONZÁLEZ-GARCÍA, Kellyh P; SALEMI, Marco; MORRIS, J Glenn; PANIZ-

MONDOLFI, Alberto e. Madariaga Virus: identification of a lineage iii strain in a venezuelan child with acute undifferentiated febrile illness, in the setting of a possible equine epizootic. **Clinical Infectious Diseases**, [S.L.], v. 67, n. 4, p. 619-621, 27 abr. 2018. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/cid/ciy224>.

BRADSHAW, M. J.; VENKATESAN, A. Herpes Simplex Virus-1 Encephalitis in Adults: Pathophysiology, Diagnosis, and Management. **Neurotherapeutics**, v. 13, n. 3, 22 jul. 2016.

BRAUNOVA, A. *et al.* Clinical and laboratory characteristics of enteroviral meningitis in children, including qrt-pcr and sequencing analysis. **Biomedical Papers**, v. 163, n. 4, p. 355–361, 1 dez. 2019.

BRASIL. 2017. Ministério da Saúde. Gabinete do Ministro. Portaria nº 2.349, de 14 de setembro de 2017. Aprova a Classificação de Risco dos Agentes Biológicos elaborada em 2017, pela Comissão de Biossegurança em Saúde (CBS), do Ministério da Saúde. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 22set. 2017. p. 51.

BRASIL. 2018. Ministério da Saúde. **Boletim epidemiológico**. Monitoramento dos casos de dengue, febre de chikungunya e doença aguda pelo vírus Zika até a Semana Epidemiológica 52 de 2017 Vol. 49. N° 2. Disponível em: <https://antigo.saude.gov.br/images/pdf/2018/janeiro/23/Boletim-2018-001-Dengue.pdf>

BRASIL. 2019. Ministério da Saúde. **Boletim epidemiológico**. Monitoramento dos casos de dengue, febre de chikungunya e doença aguda pelo vírus Zika até a Semana Epidemiológica 52 de 2018 Vol. 50. N° 4. Disponível em: <https://antigo.saude.gov.br/images/pdf/2019/janeiro/28/2019-002.pdf>

BRASIL. 2021a. Ministério da Saúde. **Boletim epidemiológico**. Monitoramento dos casos de dengue, febre de chikungunya e doença aguda pelo vírus Zika semanas epidemiológicas 1 a 53, 2020 Vol. 52. N° 3. Disponível em: [https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/media/pdf/2021/fevereiro/01/boletim\\_epidemiologico\\_svs\\_3.pdf](https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/media/pdf/2021/fevereiro/01/boletim_epidemiologico_svs_3.pdf)

BRASIL. 2021b. Ministério da Saúde. **Boletim epidemiológico**. Monitoramento dos casos de dengue, febre de chikungunya e doença aguda pelo vírus Zika semanas epidemiológicas 1 a 8, 2021 Vol. 52. N° 8. Disponível em: [https://www.gov.br/saude/pt-br/media/pdf/2021/marco/15/boletim\\_epidemiologico\\_svs\\_8.pdf](https://www.gov.br/saude/pt-br/media/pdf/2021/marco/15/boletim_epidemiologico_svs_8.pdf)

BRAULT, A C; SHOPE, R e; LOPEZ, R N; WEAVER, S C; TESH, R B; KANG, W; CHAVEZ, C L; GUTIERREZ, L F; CACHÓN, M F; POWERS, A M. Genetic and antigenic diversity among eastern equine encephalitis viruses from North, Central, and South America. **The American Journal Of Tropical Medicine And Hygiene**, [S.L.], v. 61, n. 4, p. 579-586, 1 out. 1999. American Society of Tropical Medicine and Hygiene. <http://dx.doi.org/10.4269/ajtmh.1999.61.579>.

BRIESE, Thomas *et al.* **Create a new order, Bunyavirales, to accommodate nine families (eight new, one renamed) comprising thirteen genera.** 2016. Disponível em:

<<https://talk.ictvonline.org/ictv/proposals/2016.030a-vM.A.v6.Bunyavirales.pdf>>.  
Acesso em: 18 jul. 2016.

BRONZONI, Roberta V.m. *et al.* Multiplex nested PCR for Brazilian Alphavirus diagnosis. **Transactions Of The Royal Society Of Tropical Medicine And Hygiene**, [s.l.], v. 98, n. 8, p.456-461, ago. 2004. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1016/j.trstmh.2003.09.002>.

BRUNINI, Sandra; FRANÇA, Divânia Dias Silva; SILVA, Juliana Brasiel; SILVA, Leandro Nascimento; SILVA, Flúvia Pereira Amorim; SPADONI, Mariana; REZZA, Giovanni. High Frequency of Mayaro Virus IgM among Febrile Patients, Central Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, [S.L.], v. 23, n. 6, p. 1025-1026, jun. 2017. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). <http://dx.doi.org/10.3201/eid2306.160929>.

Bruno-Lobo, J. *et al.* 1961. Estudo sobre os arbovírus III – Isolamento de um vírus sorològicamente relacionado ao sub-grupo Western-Sindbis, de um caso de encefalomielite eqüina, ocorrido no Rio de Janeiro

BURT, Felicity J *et al.* Chikungunya virus: an update on the biology and pathogenesis of this emerging pathogen. **The Lancet Infectious Diseases**, [s.l.], v. 17, n. 4, p.107-117, abr. 2017. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s1473-3099\(16\)30385-1](http://dx.doi.org/10.1016/s1473-3099(16)30385-1).

CALISHER, Charles H. *et al.* Identification of a New Venezuelan Equine Encephalitis Virus from Brazil. **The American Journal Of Tropical Medicine And Hygiene**, [s.l.], v. 31, n. 6, p.1260-1272, 1 nov. 1982. American Society of Tropical Medicine and Hygiene. <http://dx.doi.org/10.4269/ajtmh.1982.31.1260>.

CAREY, Brian D. *et al.* New World alphavirus protein interactomes from a therapeutic perspective. **Antiviral Research**, [s.l.], v. 163, p.125-139, mar. 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.antiviral.2019.01.015>.

CARNEIRO, V. & CUNHA, R. 1943 Estudos sobre a encefalomielite infecciosa dos equideos no Brasil. *Arch. Inst. Biol.*, 14: 157-194.

CARTEAUX, Guillaume *et al.* Zika Virus Associated with Meningoencephalitis. **New England Journal Of Medicine**, [s.l.], v. 374, n. 16, p.1595-1596, 21 abr. 2016. Massachusetts Medical Society. <http://dx.doi.org/10.1056/nejmc1602964>.

CASALS, Jordi; WHITMAN, Loring. Mayaro Virus: a new human disease agent. **The American Journal Of Tropical Medicine And Hygiene**, [S.L.], v. 6, n. 6, p. 1004-1011, 1 nov. 1957. American Society of Tropical Medicine and Hygiene. <http://dx.doi.org/10.4269/ajtmh.1957.6.1004>.

CAUSEY, Ottis R. *et al.* Epizootic eastern equine encephalitis in the Bragança region of Pará, Brazil (Publicado originalmente em 1962). In: INSTITUTO EVANDRO CHAGAS (Belém). *Memórias do Instituto Evandro Chagas*, v. 7. Belém: Instituto Evandro Chagas, 2002. p. 107-113. (Produção científica, v. 7).

CDC. CDC 2019-Novel Coronavirus (2019-nCoV) Real-Time RT-PCR Diagnostic Panel. 2019. Disponível em: <https://www.fda.gov/media/134922/download>

CHADWICK, David R.. Viral meningitis. **British Medical Bulletin**, [s.l.], v. 75-76, n. 1, p.1-14, 1 jan. 2005. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/bmb/ldh057>.

CHERRY, JAMES. D. The chronology of the 2002–2003 SARS mini pandemic. **Paediatric Respiratory Reviews**, v. 5, n. 4, dez. 2004.

CIANCIA, S. *et al.* Encephalitis due to herpes zoster without rash in an immunocompetent 12-year-old girl: case report and review of the literature. **BMC Pediatrics**, v. 20, n. 1, 18 dez. 2020.

COHEN, J. I. Epstein–Barr Virus Infection. **New England Journal of Medicine**, v. 343, n. 7, 17 ago. 2000.

COSTA, M.C. de Souza; MAIA, L.M. Siqueira; SOUZA, V. Costa de; GONZAGA, A.M.; AZEVEDO, V. Correa de; MARTINS, L. Ramos; PAVONI, J.H. Chavez; NAVECA, F. Gomes; SLHESSARENKO, R. Dezengrini. Arbovirus investigation in patients from Mato Grosso during Zika and Chikungunya virus introduction in Brazil, 2015–2016. **Acta Tropica**, [S.L.], v. 190, p. 395-402, fev. 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.actatropica.2018.12.019>.

COSTA, B. K. DA; SATO, D. K. Viral encephalitis: a practical review on diagnostic approach and treatment. **Jornal de Pediatria**, v. 96, mar. 2020.

COTTEN, M. *et al.* Transmission and evolution of the Middle East respiratory syndrome coronavirus in Saudi Arabia: a descriptive genomic study. **The Lancet**, v. 382, n. 9909, dez. 2013.

CRISPIM, Ana Paula Correia. **DETECÇÃO E ISOLAMENTO DE FLAVIVÍRUS EM LÍQUIDO CEFALORRAQUIDIANO DE PACIENTES EM MINAS GERAIS NO PERÍODO DE 2018 A 2019**. 2020. 90 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Microbiologia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2020.

CUNHA, R. 1945 Estudos sôbre uma amostra de vírus da encefalomielite equina isolada de material proveniente de Recife. *Bol. Soc. Bras. Med. Vet.*, 14: 201.

CUNHA, E. M. S. *et al.* PREVALÊNCIA DE ANTICORPOS CONTRA AGENTES VIRAIS EM EQUÍDEOS NO SUL DO ESTADO DE SÃO PAULO. **Arquivos do Instituto Biológico**, [s. l.], v. 76, n. 2, p. 165-171, jun. 2009.

CUNHA, M. S. *et al.* Chikungunya Virus: An Emergent Arbovirus to the South American Continent and a Continuous Threat to the World. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, 26 jun. 2020.

DARRIBA, Diego *et al.* JModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. **Nature Methods**, [s.l.], v. 9, n. 8, p.772-772, 30 jul. 2012. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1038/nmeth.2109>.

DA SILVA, I. R. F. *et al.* Neurologic Complications Associated With the Zika Virus in Brazilian Adults. **JAMA Neurology**, v. 74, n. 10, 1 out. 2017.

DEARDORFF, Eleanor R.; WEAVER, Scott C.. Vector Competence of *Culex (Melanoconion) taeniopus* for Equine-Virulent Subtype IE Strains of Venezuelan Equine Encephalitis Virus. **The American Journal Of Tropical Medicine And Hygiene**, [s.l.], v. 82, n. 6, p.1047-1052, 1 jun. 2010. American Society of Tropical Medicine and Hygiene. <http://dx.doi.org/10.4269/ajtmh.2010.09-0556>.

DE 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, abr. 2017.

DE OLIVEIRA FIGUEIREDO, P. *et al.* Re-Emergence of Yellow Fever in Brazil during 2016–2019: Challenges, Lessons Learned, and Perspectives. **Viruses**, v. 12, n. 11, 30 out. 2020.

DESFORGES, M. *et al.* Human Coronaviruses and Other Respiratory Viruses: Underestimated Opportunistic Pathogens of the Central Nervous System? **Viruses**, v. 12, n. 1, 20 dez. 2019.

FARES, Rafaelle C. G. *et al.* Epidemiological Scenario of Dengue in Brazil. **Biomed Research International**, [s.l.], v. 2015, p.1-13, 2015. Hindawi Limited. <http://dx.doi.org/10.1155/2015/321873>.

FERNÁNDEZ, Zoraida; RICHARTZ, Rosária; ROSA, Amélia Travassos da; SOCCOL, Vanete T. Identificação do vírus causador de encefalomyelite equina, Paraná, Brasil. **Revista de Saúde Pública**, [S.L.], v. 34, n. 3, p. 232-235, jun. 2000. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0034-89102000000300004>.

FERREIRA, J. E. *et al.* Molecular characterization of viruses associated with encephalitis in São Paulo, Brazil. **PLoS ONE**, v. 14, n. 1, 1 jan. 2019.

FERREIRA, Ivani B. *et al.* Surveillance of arbovirus infections in the atlantic forest region, State of São Paulo, Brazil: I. detection of hemagglutination-inhibition antibodies in wild birds between 1978 and 1990. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, [s.l.], v. 36, n. 3, p.265-274, jun. 1994. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0036-46651994000300011>.

FRAGOSO, D. C. *et al.* COVID-19 AS A CAUSE OF ACUTE NEONATAL ENCEPHALITIS AND CEREBRAL CYTOTOXIC EDEMA. **The Pediatric infectious disease journal**, 7 abr. 2021.

FRY, E. E.; STUART, D. I. Virion Structure. In: **The Picornaviruses**. Washington, DC, USA: ASM Press, 2014.

GENEROSO, J. S. *et al.* Neurobiology of COVID-19: how can the virus affect the brain? **Brazilian Journal of Psychiatry**, 10 fev. 2021.

GEORGE, B. P.; SCHNEIDER, E. B.; VENKATESAN, A. Encephalitis Hospitalization Rates and Inpatient Mortality in the United States, 2000-2010. **PLoS ONE**, v. 9, n. 9, 1 set. 2014.

GILTNER, L. T.; SHAHAN, M. S.. TRANSMISSION OF INFECTIOUS EQUINE ENCEPHALOMYELITIS IN MAMMALS AND BIRDS. **Science**, [S.L.], v. 78, n. 2012, p. 63-64, 21 jul. 1933. American Association for the Advancement of Science (AAAS). <http://dx.doi.org/10.1126/science.78.2012.63>.

GONZÁLEZ-SÁNCHEZ, J. A.; RAMÍREZ-ARROYO, G. F. • **REVIEW ARTICLE • Chikungunya Virus: History, Geographic Distribution, Clinical Picture, and Treatment** PRHSJ. [s.l.: s.n.].

GO, Yun Young; BALASURIYA, Udeni B. R.; LEE, Chong-kyo. Zoonotic encephalitides caused by arboviruses: transmission and epidemiology of alphaviruses and flaviviruses. **Clinical And Experimental Vaccine Research**, [s.l.], v. 3, n. 1, p.58-77, 2014. Korean Vaccine Society (KAMJE). <http://dx.doi.org/10.7774/cevr.2014.3.1.58>.

GRAHN, A.; STUDAHL, M. Varicella-zoster virus infections of the central nervous system – Prognosis, diagnostics and treatment. **Journal of Infection**, v. 71, n. 3, set. 2015.

GUAN, Y. Isolation and Characterization of Viruses Related to the SARS Coronavirus from Animals in Southern China. **Science**, v. 302, n. 5643, 10 out. 2003.

GUINDON, Stéphane; GASCUEL, Olivier. A Simple, Fast, and Accurate Algorithm to Estimate Large Phylogenies by Maximum Likelihood. **Systematic Biology**, [s.l.], v. 52, n. 5, p.696-704, 1 out. 2003. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1080/10635150390235520>.

HAMRE, D.; PROCKNOW, J. J. A New Virus Isolated from the Human Respiratory Tract. **Experimental Biology and Medicine**, v. 121, n. 1, 1 jan. 1966.

HAMMON, William McD.; HO, Monto. Viral encephalitis. **Disease-A-Month**, [S.L.], v. 19, n. 2, p. 1-47, fev. 1973. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0011-5029\(73\)80010-0](http://dx.doi.org/10.1016/s0011-5029(73)80010-0).

HASBUN, Rodrigo *et al.* Epidemiology of Meningitis and Encephalitis in the United States, 2011–2014. **Clinical Infectious Diseases**, [s.l.], v. 65, n. 3, p.359-363, 17 abr. 2017. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/cid/cix319>.

HASBUN, R. *et al.* Epidemiology of Meningitis and Encephalitis in Infants and Children in the United States, 2011-2014. **The Pediatric infectious disease journal**, v. 38, n. 1, p. 37–41, 1 jan. 2019.

HE, Taojun *et al.* Laboratory Diagnosis of Central Nervous System Infection. **Current Infectious Disease Reports**, [s.l.], v. 18, n. 11, p.1047-1071, 30 set. 2016. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s11908-016-0545-6>.

HEINEN, Letícia Borges da Silva *et al.* SAINT LOUIS ENCEPHALITIS VIRUS IN MATO GROSSO, CENTRAL-WESTERN BRAZIL. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, [s.l.], v. 57, n. 3, p.215-220, jun. 2015. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0036-46652015000300006>.

HJALMARSSON, A.; BLOMQVIST, P.; SKOLDENBERG, B. Herpes Simplex Encephalitis in Sweden, 1990-2001: Incidence, Morbidity, and Mortality. **Clinical Infectious Diseases**, v. 45, n. 7, 1 out. 2007.

HUANG, H.-I.; SHIH, S.-R. Neurotropic Enterovirus Infections in the Central Nervous System. **Viruses**, v. 7, n. 11, 24 nov. 2015.

ICTV – International Committee on Taxonomy of Viruses. In the genus Alphavirus, create a species named Madariaga virus comprising some of the virus strains currently classified in the species Eastern equine encephalitis virus. Disponível em: <https://talk.ictvonline.org/ictv/proposals/2012.007aV.A.v1.Alphavirus-sp.pdf> Acesso em: 03 set 2019



IGARASHI, A.. Isolation of a Singh's *Aedes albopictus* Cell Clone Sensitive to Dengue and Chikungunya Viruses. **Journal Of General Virology**, [s.l.], v. 40, n. 3, p.531-544, 1 set. 1978. Microbiology Society. <http://dx.doi.org/10.1099/0022-1317-40-3-531>.

IVANOVA, O. E. *et al.* Environmental Surveillance for Poliovirus and Other Enteroviruses: Long-Term Experience in Moscow, Russian Federation, 2004–2017. **Viruses**, v. 11, n. 5, 8 maio 2019.

IVERSSON, Lygia Busch; ROSA, Amélia P.a. Travassos da; ROSA, Jorge Travassos da. Estudos sorológicos para pesquisa de anticorpos de arbovírus em população humana da região do Vale do Ribeira: II - inquérito em pacientes do Hospital Regional de Pariqueira-Açú, 1980. **Revista de Saúde Pública**, [s.l.], v. 15, n. 6, p.587-602, dez. 1981. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0034-89101981000600002>.

JAVED, Farakh *et al.* Zika virus: what we need to know?. **Journal Of Basic Microbiology**, [s.l.], v. 58, n. 1, p.3-16, 13 nov. 2017. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/jobm.201700398>.

JOHNSON KM, MARTIN DH. **Venezuelan equine encephalitis**. *Adv Vet Sci Comp Med*. 1974;18:79–116.

JUNQUEIRA, Luiz C.;CARNEIRO, José. **Histologia Básica**. 11.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.

KHAN, A. H. *et al.* COVID-19 transmission, vulnerability, persistence and nanotherapy: a review. **Environmental Chemistry Letters**, 7 abr. 2021.

KINNEY, R. M.; TRENT, D. W.; FRANCE, J. K.. Comparative Immunological and Biochemical Analyses of Viruses in the Venezuelan Equine Encephalitis Complex. **Journal Of General Virology**, [s.l.], v. 64, n. 1, p.135-147, 1 jan. 1983. Microbiology Society. <http://dx.doi.org/10.1099/0022-1317-64-1-135>.

KLEBER DE OLIVEIRA, W. *et al.* Increase in Reported Prevalence of Microcephaly in Infants Born to Women Living in Areas with Confirmed Zika Virus Transmission During the First Trimester of Pregnancy — Brazil, 2015. **MMWR. Morbidity and Mortality Weekly Report**, v. 65, n. 9, 11 mar. 2016.

KNIPE, David M., e Peter M. Howley, organizadores. *Fields virology*. 6th ed, Wolters Kluwer/Lippincott Williams & Wilkins Health, 2013.

KO, Y. *et al.* Clinical characteristics of enteroviral meningitis without pleocytosis in children: a retrospective single center observational study in the Republic of Korea. **BMC Pediatrics**, v. 19, n. 1, 14 dez. 2019.

KOTAIT, I; PEIXOTO, Z M P; COIMBRA, T L M. ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DO VIRUS DA ENCEFALOMIELE EQUINA, TIPO LESTE, EM EQUINOS DO ESTADO DE SÃO PAULO, BRASIL. **Arquivos do Instituto Biológico**, [s. l], v. 59, n. 1, p. 37-41, dez. 1992.

KRAMER, M. *et al.* Echovirus infection causes rapid loss-of-function and cell death in human dendritic cells. **Cellular Microbiology**, v. 9, n. 6, jun. 2007.

KUMAR, Sudhir *et al.* MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. **Molecular Biology And Evolution**, [s.l.], v. 35, n. 6, p.1547-1549,

2 maio 2018. Oxford University Press (OUP).  
<http://dx.doi.org/10.1093/molbev/msy096>.

LANCASTER, K. Z.; PFEIFFER, J. K. Limited Trafficking of a Neurotropic Virus Through Inefficient Retrograde Axonal Transport and the Type I Interferon Response. **PLoS Pathogens**, v. 6, n. 3, 5 mar. 2010.

LANCIOTTI, R. S.. Origin of the West Nile Virus Responsible for an Outbreak of Encephalitis in the Northeastern United States. **Science**, [s.l.], v. 286, n. 5448, p.2333-2337, 17 dez. 1999. American Association for the Advancement of Science (AAAS).  
<http://dx.doi.org/10.1126/science.286.5448.2333>.

LEDNICKY, John A.; WHITE, Sarah K.; MAVIAN, Carla N.; BADRY, Maha A. El; TELISMA, Taina; SALEMI, Marco; OKECH, Bernard A.; ROCHARS, V. Madsen Beau de; MORRIS, J. Glenn. Emergence of Madariaga virus as a cause of acute febrile illness in children, Haiti, 2015-2016. **Plos Neglected Tropical Diseases**, [S.L.], v. 13, n. 1, p. 672-680, 10 jan. 2019. Public Library of Science (PLOS).  
<http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0006972>.

LEE, G.-H. *et al.* Clinical significance of Epstein-Barr virus in the cerebrospinal fluid of immunocompetent patients. **Clinical Neurology and Neurosurgery**, v. 202, mar. 2021.

LEE, H.-Y. *et al.* Clinical features of echovirus 6 and 9 infections in children. **Journal of Clinical Virology**, v. 49, n. 3, nov. 2010.

LEMANT, Jérôme *et al.* Serious acute chikungunya virus infection requiring intensive care during the reunion island outbreak in 2005–2006\*. **Critical Care Medicine**, [s.l.], v. 36, n. 9, p.2536-2541, set. 2008. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health).  
<http://dx.doi.org/10.1097/ccm.0b013e318183f2d2>.

LENETTE, Edwin H.; FOX, John P.. Anticorpos neutralizantes para a amostra leste do virus de encefalomielite equina em equídeos no Brasil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, [S.L.], v. 38, n. 1, p. 85-92, 1943. FapUNIFESP (SciELO).  
<http://dx.doi.org/10.1590/s0074-02761943000100009>.

LI, Y. C.; ZHANG, Y.; TAN, B. H. **What can cerebrospinal fluid testing and brain autopsies tell us about viral neuroinvasion of SARS-CoV-2** *Journal of Medical Virology* John Wiley and Sons Inc, , 2021.

LINDENBACH, Brett D *et al.* Flaviviridae. In: KNIPE, David M *et al.* **Fields Virology**. 6. ed. Philadelphia: Wolters Kluwer, 2013. Cap. 25. p. 734-769.

LONG, Kanya C.; TESH, Robert B.; HIGGS, Stephen; HAUSSER, Nicole L.; THANGAMANI, Saravanan; KOHEL, Tadeusz J.; ZIEGLER, Sarah A.. Experimental Transmission of Mayaro Virus by *Aedes aegypti*. **The American Journal Of Tropical Medicine And Hygiene**, [S.L.], v. 85, n. 4, p. 750-757, 1 out. 2011. American Society of Tropical Medicine and Hygiene. <http://dx.doi.org/10.4269/ajtmh.2011.11-0359>.

LUCHS, A. *et al.* ECHOVIRUS 6 ASSOCIATED TO ASEPTIC MENINGITIS OUTBREAK, IN SÃO JOAQUIM DA BARRA, SÃO PAULO, BRAZIL. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 39, p. 28–31, 2008.

LUCIANI, Kathia; GARCÍA, Mariana; CISNEROS, Julio; CARRERA, Jean-Paul; GUERRA, Ilka; ABADÍA, Iván; MARTÍNEZ-TORRES, Alex O.; ESTRYPEAUT, Dora. Madariaga Virus Infection Associated with a Case of Acute Disseminated Encephalomyelitis. **The American Journal Of Tropical Medicine And Hygiene**, [S.L.], v. 92, n. 6, p. 1130-1132, 3 jun. 2015. American Society of Tropical Medicine and Hygiene. <http://dx.doi.org/10.4269/ajtmh.14-0845>.

MAIA, Felipe Gonçalves Motta *et al.* Infection with Saint Louis encephalitis virus in the city of Ribeirao Preto, Brazil: report of one case. **International Journal Of Infectious Diseases**, [s.l.], v. 26, p.96-97, set. 2014. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijid.2014.05.018>.

MAJER, A.; MCGREEVY, A.; BOOTH, T. F. Molecular Pathogenicity of Enteroviruses Causing Neurological Disease. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, 9 abr. 2020.

MARINHO, Paula Eillanny Silva *et al.* Meningitis Associated with Simultaneous Infection by Multiple Dengue Virus Serotypes in Children, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, [s.l.], v. 23, n. 1, p.115-118, jan. 2017. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). <http://dx.doi.org/10.3201/eid2301.160817>.

MARINHO, Paula Eillanny Silva. **DETECÇÃO E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE FLAVIVIRUS EM LÍQUIDO CEFALORRAQUIDIANO DE CRIANÇAS COM SUSPEITA DE INFECÇÃO NO SISTEMA NERVOSO CENTRAL**. 2019. 123 f. Tese (Doutorado) - Curso de Microbiologia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2019.

MARINHO, Paula E.s. *et al.* Wild-Type Yellow Fever Virus RNA in Cerebrospinal Fluid of Child. **Emerging Infectious Diseases**, [s.l.], v. 25, n. 8, p.1567-1570, ago. 2019. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). <http://dx.doi.org/10.3201/eid2508.181479>.

MAY, F. J. *et al.* Genetic variation of St. Louis encephalitis virus. **Journal Of General Virology**, [s.l.], v. 89, n. 8, p.1901-1910, 1 ago. 2008. Microbiology Society. <http://dx.doi.org/10.1099/vir.0.2008/000190-0>.

MAZZULLI, T. Laboratory Diagnosis of Infection Due to Viruses, Chlamydia, Chlamydoghila, and Mycoplasma. In: **Principles and Practice of Pediatric Infectious Disease**. [s.l.] Elsevier, 2008.

MENDES, Adriano; KUHN, Richard. Alphavirus Nucleocapsid Packaging and Assembly. **Viruses**, [s.l.], v. 10, n. 3, p.138-153, 20 mar. 2018. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/v10030138>.

MESSACAR, Kevin *et al.* Encephalitis in US Children. **Infectious Disease Clinics Of North America**, [s.l.], v. 32, n. 1, p.145-162, mar. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.idc.2017.10.007>.

MEYER, K. F.; HARING, C. M.; HOWITT, B.. THE ETIOLOGY OF EPIZOOTIC ENCEPHALOMYELITIS OF HORSES IN THE SAN JOAQUIN VALLEY, 1930. **Science**, [S.L.], v. 74, n. 1913, p. 227-228, 28 ago. 1931. American Association for the Advancement of Science (AAAS). <http://dx.doi.org/10.1126/science.74.1913.227>.

MICHOS, A. G. *et al.* Aseptic Meningitis in Children: Analysis of 506 Cases. **PLoS ONE**, v. 2, n. 8, 1 ago. 2007.

MINAS GERAIS. 2021. **Boletim epidemiológico arboviroses urbanas: dengue, Chikungunya e zika.** N° 214. Disponível em: [https://www.saude.mg.gov.br/images/noticias\\_e\\_eventos/000\\_2021/Boletim\\_Arboviroses%20N%C2%BA%20214%20-%2018-05-2021.pdf](https://www.saude.mg.gov.br/images/noticias_e_eventos/000_2021/Boletim_Arboviroses%20N%C2%BA%20214%20-%2018-05-2021.pdf)

MIRAND, A. *et al.* Prospective Identification of Enteroviruses Involved in Meningitis in 2006 through Direct Genotyping in Cerebrospinal Fluid. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 46, n. 1, 1 jan. 2008.

MONDINI, Adriano *et al.* Simultaneous infection by DENV-3 and SLEV in Brazil. **Journal Of Clinical Virology**, [s.l.], v. 40, n. 1, p.84-86, set. 2007. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcv.2007.06.007>.

MONTEIRO DE ALMEIDA, S. *et al.* **Laboratorial Diagnosis of Lymphocytic Meningitis** *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*. [s.l.: s.n.]. Disponível em: <[www.bjid.com.br](http://www.bjid.com.br)>.

MUSSO, Didier *et al.* Potential Sexual Transmission of Zika Virus. **Emerging Infectious Diseases**, [s.l.], v. 21, n. 2, p.359-361, fev. 2015. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). <http://dx.doi.org/10.3201/eid2102.141363>.

NAGEL, M. A.; GILDEN, D. Neurological complications of varicella zoster virus reactivation. **Current Opinion in Neurology**, v. 27, n. 3, jun. 2014.

NGHIEM, Peter P.; SCHATZBERG, Scott J.. Conventional and molecular diagnostic testing for the acute neurologic patient. **Journal Of Veterinary Emergency And Critical Care**, [s.l.], v. 20, n. 1, p.46-61, fev. 2010. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1476-4431.2009.00495.x>.

NICHOLLS, J. M. *et al.* Time Course and Cellular Localization of SARS-CoV Nucleoprotein and RNA in Lungs from Fatal Cases of SARS. **PLoS Medicine**, v. 3, n. 2, 3 jan. 2006.

NUNES, Marcio Roberto Teixeira *et al.* Emergence and potential for spread of Chikungunya virus in Brazil. **Bmc Medicine**, [s.l.], v. 13, n. 1, p.1-10, 30 abr. 2015. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1186/s12916-015-0348-x>.

OLIVEIRA, Danilo Bretas de. **DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO DE UMA PLATAFORMA DE DIAGNÓSTICO PARA MENINGOENCEFALITES VIRAIS POR PCR EM TEMPO REAL**. 2015. 172 f. Tese (Doutorado) - Curso de Microbiologia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2015.

OLIVEIRA, Lilian G.; PERON, Jean Pierre Schatzmann. Viral receptors for flaviviruses: Not only gatekeepers. **Journal Of Leukocyte Biology**, [s.l.], p.1-7, 7 maio 2019. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/jlb.mr1118-460r>.

PALMENBERG, A.; NEUBAUER, D.; SKERN, T. Genome Organization and Encoded Proteins. In: **The Picornaviruses**. Washington, DC, USA: ASM Press, 2014.

PAPA, A. *et al.* Molecular epidemiology of Echovirus 6 in Greece. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 28, n. 6, 8 jun. 2009.

PEER, V.; SCHWARTZ, N.; GREEN, M. S. Consistent, Excess Viral Meningitis Incidence Rates in Young Males: A Multi-country, Multi-year, Meta-analysis of National Data. The Importance of Sex as a Biological Variable. **EClinicalMedicine**, v. 15, out. 2019.

PELLEGRINELLI, L. *et al.* Molecular Characterization and Phylogenetic Analysis of Enteroviruses and Hepatitis A Viruses in Sewage Samples, Northern Italy, 2016. **Food and Environmental Virology**, v. 11, n. 4, 16 dez. 2019.

PFEFFER, Martin *et al.* Genus-Specific Detection of Alphaviruses by a Semi-Nested Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction. **The American Journal Of Tropical Medicine And Hygiene**, [s.l.], v. 57, n. 6, p.709-718, 1 dez. 1997. American Society of Tropical Medicine and Hygiene. <http://dx.doi.org/10.4269/ajtmh.1997.57.709>.

PHELPS, Amanda *et al.* Susceptibility and Lethality of Western Equine Encephalitis Virus in Balb/c Mice When Infected by the Aerosol Route. **Viruses**, [s.l.], v. 9, n. 7, p.163-179, 27 jun. 2017. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/v9070163>.

POSSAS, Cristina *et al.* Yellow fever outbreak in Brazil: the puzzle of rapid viral spread and challenges for immunisation. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, [s.l.], v. 113, n. 10, p.1-12, 3 set. 2018. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/0074-02760180278>.

RAJ, V. S. *et al.* MERS: emergence of a novel human coronavirus. **Current Opinion in Virology**, v. 5, abr. 2014.

RAJASINGHAM, Radha *et al.* Epidemiology of Meningitis in an HIV-Infected Ugandan Cohort. **The American Journal Of Tropical Medicine And Hygiene**, [s.l.], v. 92, n. 2, p.274-279, 4 fev. 2015. American Society of Tropical Medicine and Hygiene. <http://dx.doi.org/10.4269/ajtmh.14-0452>.

REED, Douglas s. *et al.* Aerosol Exposure to Western Equine Encephalitis Virus Causes Fever and Encephalitis in Cynomolgus Macaques. **The Journal Of Infectious Diseases**, [s.l.], v. 192, n. 7, p.1173-1182, out. 2005. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1086/444397>.

RIBEIRO, A. F. *et al.* Neurologic Disease after Yellow Fever Vaccination, São Paulo, Brazil, 2017–2018. **Emerging Infectious Diseases**, v. 27, n. 6, jun. 2021.

RIVAS, F. *et al.* Epidemic Venezuelan Equine Encephalitis in La Guajira, Colombia, 1995. **The Journal Of Infectious Diseases**, [s.l.], v. 175, n. 4, p.828-832, abr. 1997. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1086/513978>.

ROBINSON, Marion C. An epidemic of virus disease in Southern Province, Tanganyika territory, in 1952–1953. **Transactions Of The Royal Society Of Tropical Medicine And Hygiene**, [s.l.], v. 49, n. 1, p.28-32, jan. 1955. Oxford University Press (OUP). [http://dx.doi.org/10.1016/0035-9203\(55\)90080-8](http://dx.doi.org/10.1016/0035-9203(55)90080-8).

ROCHA, L. C. DA *et al.* Enteric viruses circulating in undiagnosed central nervous system infections at tertiary hospital in São José do Rio Preto, São Paulo, Brazil. **Journal of Medical Virology**, v. 93, n. 6, p. 3539–3548, 1 jun. 2021.

ROE, K. *et al.* West Nile virus-induced disruption of the blood-brain barrier in mice is characterized by the degradation of the junctional complex proteins and increase in

multiple matrix metalloproteinases. **Journal Of General Virology**, [s.l.], v. 93, n. 6, p.1193-1203, 7 mar. 2012. Microbiology Society. <http://dx.doi.org/10.1099/vir.0.040899-0>.

ROSS, R. W. The Newala epidemic: III. The virus: isolation, pathogenic properties and relationship to the epidemic. **Journal of Hygiene**, v. 54, n. 2, 15 jun. 1956.

SACCHETTO, L. *et al.* Re-emergence of yellow fever in the neotropics — quo vadis? **Emerging Topics in Life Sciences**, v. 4, n. 4, 11 dez. 2020.

SADEGHI, F. *et al.* Short Communication Masoumeh Talebi-Nesami (MD) 2 Elahe Ferdosi-Shahandashti (MSc) 4 Human enteroviruses in cerebrospinal fluid of children with suspected aseptic meningitis: A study in northern Iran. **Caspian J Intern Med**, v. 8, n. 2, p. 112–115, 2017.

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A. R. **DNA sequencing with chain-terminating inhibitors (DNA polymerase/nucleotide sequences/bacteriophage 4X174)**. [s.l: s.n.].

SANTOS, J.A., LESSA, J., & PASSOS, W. 1946 Estudos sôbre um foco de encefalomielite equina (vírus Este) observado no Distrito Federal. Anais 1º Congr. Inter-Amer. Med., p. 11.

SCIENCE, M. *et al.* Central Nervous System Complications of Varicella-Zoster Virus. **The Journal of Pediatrics**, v. 165, n. 4, out. 2014.

SEYMOUR, C.; PERALTA, P. H.; MONTGOMERY, G. G. Serologic evidence of natural togavirus infections in Panamanian sloths and other vertebrates. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 32, n. 4, p. 854–861, 1983.

SILVA MARINHO, P. E.; KROON, E. G. Flaviviruses as agents of childhood central nervous system infections in Brazil. **New Microbes and New Infections**, v. 30, 1 jul. 2019.

SILVA, N. I. O. *et al.* Recent sylvatic yellow fever virus transmission in Brazil: the news from an old disease. **Virology Journal**, v. 17, n. 1, 23 dez. 2020.

SILVA, M. L. C. R.; AUGUSTE, A. J.; TERZIAN, A. C. B.; VEDOVELLO, D.; RIET-CORREA, F.; MACÁRIO, V. M. K.; MOURÃO, M. P. G.; ULLMANN, L. S.; ARAËJO, J. P.; WEAVER, S. C.. Isolation and Characterization of Madariaga Virus from a Horse in Paraíba State, Brazil. **Transboundary And Emerging Diseases**, [S.L.], v. 64, n. 3, p. 990-993, 25 nov. 2015. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/tbed.12441>.

SIMMONDS, P. *et al.* Recommendations for the nomenclature of enteroviruses and rhinoviruses. **Archives of Virology**, v. 165, n. 3, 25 mar. 2020.

SLEGGERS, C.A.D.; KEUTER, M.; GÜNTHER, S.; SCHMIDT-CHANASIT, J.; VEN, A.J. van Der; MAST, Q. de. Persisting arthralgia due to Mayaro virus infection in a traveler from Brazil: is there a risk for attendants to the 2014 fifa world cup?. **Journal Of Clinical Virology**, [S.L.], v. 60, n. 3, p. 317-319, jul. 2014. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcv.2014.04.020>.

SMITH, J. S.; ROBINSON, N. J. Age-Specific Prevalence of Infection with Herpes Simplex Virus Types 2 and 1: A Global Review. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 186, n. s1, 15 out. 2002.

SOARES, Cristiane N. *et al.* Review of the etiologies of viral meningitis and encephalitis in a dengue endemic region. **Journal Of The Neurological Sciences**, [s.l.], v. 303, n. 1-2, p.75-79, abr. 2011. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jns.2011.01.012>.

STEINER, I. *et al.* Viral meningoencephalitis: a review of diagnostic methods and guidelines for management. **European Journal Of Neurology**, [s.l.], v. 17, n. 8, p.999-1009, 3 mar. 2010. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1468-1331.2010.02970.x>.

STEINER, I.; BENNINGER, F. Update on Herpes Virus Infections of the Nervous System. **Current Neurology and Neuroscience Reports**, v. 13, n. 12, 20 dez. 2013.

TABOR-GODWIN, J. M. *et al.* A Novel Population of Myeloid Cells Responding to Coxsackievirus Infection Assists in the Dissemination of Virus within the Neonatal CNS. **Journal of Neuroscience**, v. 30, n. 25, 23 jun. 2010.

Tamura K. and Nei M. (1993). Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Molecular Biology and Evolution* **10**:512-526.

TERZIAN, A. C. B. *et al.* Detection of Saint Louis Encephalitis Virus in Dengue-Suspected Cases During a Dengue 3 Outbreak. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, v. 11, n. 3, mar. 2011.

THIBOUTOT, Michelle M. *et al.* Chikungunya: A Potentially Emerging Epidemic?. **Plos Neglected Tropical Diseases**, [s.l.], v. 4, n. 4, p.623-631, 27 abr. 2010. Public Library of Science (PLOS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0000623>.

TOCZYLOWSKI, K. *et al.* Pediatric Enteroviral Central Nervous System Infections in Bialystok, Poland: Epidemiology, Viral Types, and Drivers of Seasonal Variation. **Viruses**, v. 12, n. 8, 15 ago. 2020.

TSETSARKIN, Konstantin A. *et al.* A Single Mutation in Chikungunya Virus Affects Vector Specificity and Epidemic Potential. **Plos Pathogens**, [s.l.], v. 3, n. 12, p.201-212, 2007. Public Library of Science (PLOS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.ppat.0030201>.

TUNKEL, Allan R.; GLASER, Carol A.; BLOCH, Karen C.; SEJVAR, James J.; MARRA, Christina M.; ROOS, Karen L.; HARTMAN, Barry J.; KAPLAN, Sheldon L.; SCHELD, W. Michael; WHITLEY, Richard J.. The Management of Encephalitis: clinical practice guidelines by the infectious diseases society of america. **Clinical Infectious Diseases**, [S.L.], v. 47, n. 3, p. 303-327, 1 ago. 2008. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1086/589747>.

TYLER, Kenneth L.. Emerging Viral Infections of the Central Nervous System. **Archives Of Neurology**, [s.l.], v. 66, n. 9, p.939-948, 1 set. 2009. American Medical Association (AMA). <http://dx.doi.org/10.1001/archneur.2009.189>.

VENKATESAN, A.; MURPHY, O. C. Viral Encephalitis. **Neurologic Clinics**, v. 36, n. 4, nov. 2018.

VERMA, Saguna *et al.* West Nile virus infection modulates human brain microvascular endothelial cells tight junction proteins and cell adhesion molecules: Transmigration across the in vitro blood-brain barrier. **Virology**, [s.l.], v. 385, n. 2, p.425-433, mar. 2009. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.virol.2008.11.047>.

VIANA, D. V.; IGNOTTI, E. A ocorrência da dengue e variações meteorológicas no Brasil: revisão sistemática. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 16, n. 2, jun. 2013.

VIEIRA, Marcelo A. C. S. *et al.* West Nile Virus Encephalitis: The First Human Case Recorded in Brazil. **The American Journal Of Tropical Medicine And Hygiene**, [s.l.], v. 93, n. 2, p.377-379, 5 ago. 2015. American Society of Tropical Medicine and Hygiene. <http://dx.doi.org/10.4269/ajtmh.15-0170>.

VIEIRA, M. A. DA C. E S. *et al.* Encephalitis associated with Zika virus infection and reactivation of the varicella-zoster virus in a Brazilian child. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 51, n. 3, jun. 2018.

VU, David M.; JUNGKIND, Donald; LABEAUD, Angelle Desiree. Chikungunya Virus. **Clinics In Laboratory Medicine**, [s.l.], v. 37, n. 2, p.371-382, jun. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cll.2017.01.008>.

WAGGONER, Jesse J.; ROJAS, Alejandra; PINSKY, Benjamin A.. Yellow Fever Virus: Diagnostics for a Persistent Arboviral Threat. **Journal Of Clinical Microbiology**, [s.l.], v. 56, n. 10, p.1-13, 18 jul. 2018. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/jcm.00827-18>.

WALKER, P. J. *et al.* Changes to virus taxonomy and the Statutes ratified by the International Committee on Taxonomy of Viruses (2020). **Archives of Virology**, v. 165, n. 11, 20 nov. 2020.

WEAVER, S.c. *et al.* Molecular Epidemiological Studies of Veterinary Arboviral Encephalitides. **The Veterinary Journal**, [s.l.], v. 157, n. 2, p.123-138, mar. 1999. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1053/tvjl.1998.0289>.

WEAVER, Scott C. *et al.* VENEZUELANEQUINEENCEPHALITIS. **Annual Review Of Entomology**, [s.l.], v. 49, n. 1, p.141-174, 7 jan. 2004. Annual Reviews. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.ento.49.061802.123422>.

WIELANEK, A. C. *et al.* GUILLAIN-BARRE SYNDROME COMPLICATING A CHIKUNGUNYA VIRUS INFECTION. **Neurology**, [s.l.], v. 69, n. 22, p.2105-2107, 26 nov. 2007. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health). <http://dx.doi.org/10.1212/01.wnl.0000277267.07220.88>.

WRIGHT, William F. *et al.* Viral (aseptic) meningitis: A review. **Journal Of The Neurological Sciences**, [s.l.], v. 398, p.176-183, mar. 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jns.2019.01.050>.

XIA, Xuhua. DAMBE7: New and Improved Tools for Data Analysis in Molecular Biology and Evolution. **Molecular Biology And Evolution**, [s.l.], v. 35, n. 6, p.1550-1552, 14 abr. 2018. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/molbev/msy073>.



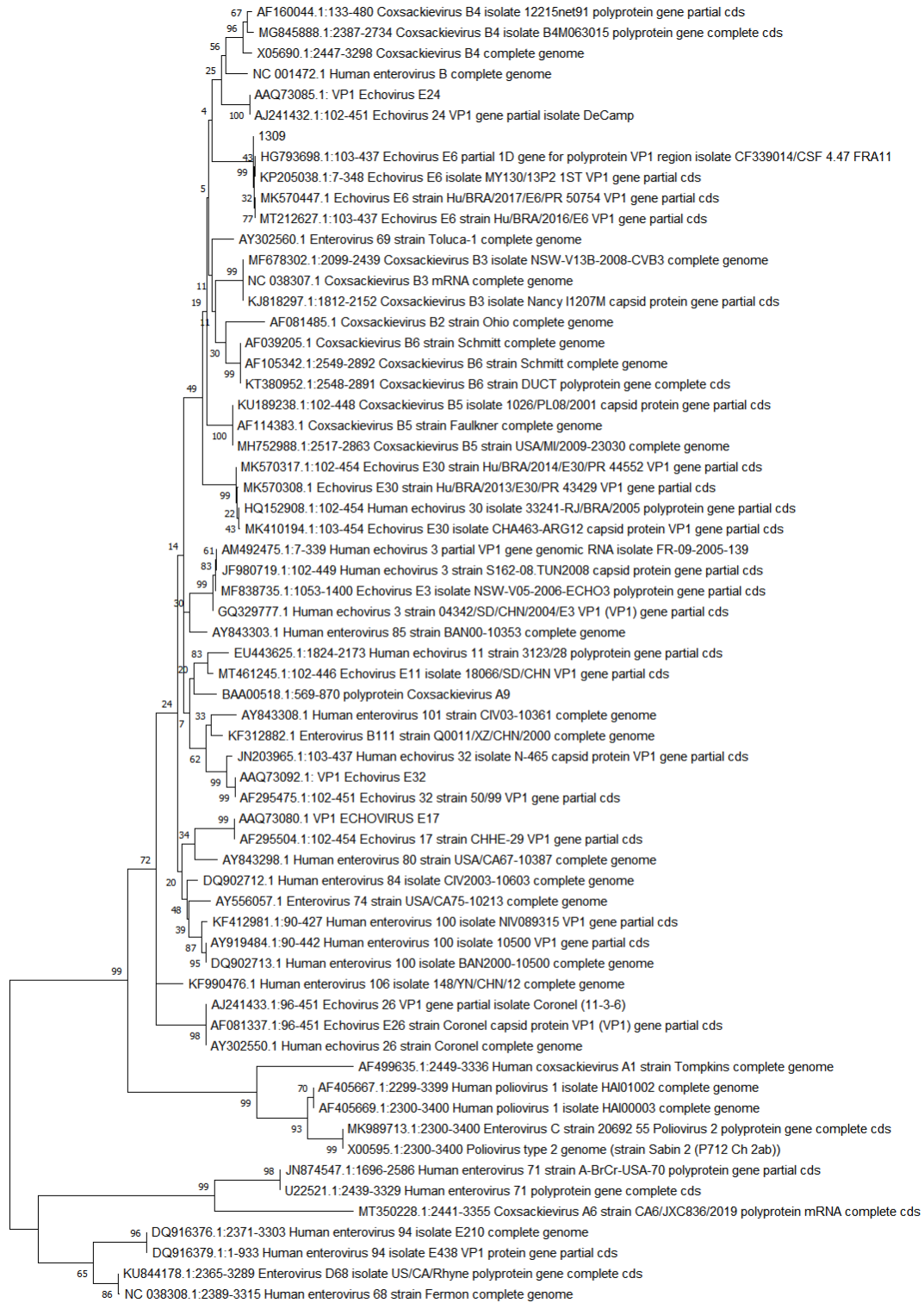
ZACKS, Michele A.; PAESSLER, Slobodan. Encephalitic alphaviruses. **Veterinary Microbiology**, [S.L.], v. 140, n. 3-4, p. 281-286, jan. 2010. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2009.08.023>.

ZHANG, M. *et al.* The nervous system—A new territory being explored of SARS-CoV-2. **Journal of Clinical Neuroscience**, v. 82, dez. 2020.

World Health Organization. *WHO Coronavirus (COVID-19) Dashboard*. Disponível em: <https://covid19.who.int/table> Acesso em: 26/05/2021.

World Health Organization e Regional Office for Europe. *Enterovirus Surveillance Guidelines: Guidelines for Enterovirus Surveillance in Support of the Polio Eradication Initiative*. World Health Organization, Regional Office for Europe, 2015.

## Apêndice 1 – Reconstrução filogenética mostrando agrupamento da amostra sequenciada com echovirus 6, sem compressões



## Anexo 1 – 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 suspeitado 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](mailto: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](mailto: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](mailto: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](mailto: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](mailto:coep@prpq.ufmg.br) / Horário de atendimento: 09:00 às 11:00 / 14:00 às 16:00

Rubricas: Pesquisador \_\_\_\_\_ Participante \_\_\_\_\_

<b>Termo de consentimento livre após esclarecimento dos pais ou responsáveis em caso de menor de idade</b>	
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	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
_____ Membro da equipe responsável por conduzir o processo Nome completo:	

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](mailto:coep@prpq.ufmg.br) / Horário de atendimento: 09:00 às 11:00 / 14:00 às 16:00

Rubricas: Pesquisador \_\_\_\_\_ Participante \_\_\_\_\_

**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 precisarmos 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](mailto:coep@prpq.ufmg.br) / Horário de atendimento: 09:00 às 11:00 / 14:00 às 16:00

Rubricas: Pesquisador \_\_\_\_\_ Participante \_\_\_\_\_



2

pesquisador responsável, e a outra será fornecida a você. Os pesquisadores tratarão a sua identidade com padrões profissionais de sigilo, atendendo a legislação brasileira (Resolução Nº 466/12 do Conselho Nacional de Saúde), utilizando as informações somente para os fins acadêmicos e científicos. O termo seguirá em duas vias com espaço destinado para rubricas.

O material coletado será armazenado em Biorrepositório no LabVirus na UFMG, sob a responsabilidade da pesquisadora, e usado nessa pesquisa ou se você permitir em outras, mas nesse caso será consultado novamente.

Eu, \_\_\_\_\_, portador (a) do documento de Identidade \_\_\_\_\_ (se já tiver documento), fui informado (a) dos objetivos da presente pesquisa, de maneira clara e detalhada e esclareci minhas dúvidas. Sei que a qualquer momento poderei solicitar novas informações, e o meu responsável poderá modificar a decisão de participar se assim o desejar. Tendo o consentimento do meu responsável já assinado, declaro que concordo em participar dessa pesquisa. Recebi o termo de assentimento e me foi dada a oportunidade de ler e esclarecer as minhas *dúvidas*.

Belo Horizonte, \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 20 \_\_\_\_.

\_\_\_\_\_  
Assinatura do (a) menor

\_\_\_\_\_  
Assinatura do (a) pesquisador (a)

\_\_\_\_\_  
Membro da equipe responsável por conduzir o processo  
Nome completo:

**Nome dos Pesquisadores Responsáveis:** Erna G Kroon / Talitah Candiani  
**Endereço:** Av. Antônio Carlos, 6627, Pampulha - Belo Horizonte - MG - CEP 31270-901/ Belo Horizonte Minas Gerais / **Fone:** (31) 3409-2755 / **E-mail:** 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](mailto:coep@prpq.ufmg.br) / Horário de atendimento: 09:00 às 11:00 / 14:00 às 16:00

Rubricas: Pesquisador \_\_\_\_\_ Participante \_\_\_\_\_