Jerenice Esdras Ferreira

**Caracterização molecular de vírus associados à encefalite em
São Paulo, Brasil**

Tese apresentada a Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do título
de Doutora em Ciências

Programa de Medicina Tropical

Área de concentração: Doenças Tropicais e Saúde
Internacional

Orientadora: Profa. Dra. Ester Cerdeira Sabino

São Paulo

2020

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Ferreira, Jerenice Esdras

Caracterização molecular de vírus associados à
encefalite em São Paulo, Brasil / Jerenice Esdras
Ferreira. -- São Paulo, 2020.

Tese (doutorado) -- Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo.

Programa de Medicina Tropical. Área de
Concentração: Doenças Tropicais e Saúde Internacional.
Orientadora: Ester Cerdeira Sabino.

Descritores: 1. Encefalite viral 2. Líquido
cefalorraquidiano 3. Sistema nervoso central
4. Arbovirus 5. Infecções por herpesviridae 6.
Enterovirus

USP/FM/DBD-235/20

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

DEDICATÓRIA

Ao Senhor meu Deus e meu Pai,

Senhor, eu Te agradeço por tudo que tens me proporcionado: pela vida, a alegria de viver a força em todos os momentos difíceis, os dons, a minha família.

Aos meus Pais,

que graças à dedicação, ao apoio e ao amor demonstrados, estou conquistando esse sonho. Não há palavras para exprimir o meu eterno agradecimento, vocês são o melhor da minha vida. Mãe você é minha fortaleza.

À minha irmã Suzete C Ferreira S Lombardi,

pelo companheirismo, apoio incondicional e incentivo em todos os momentos da minha vida. Obrigada por acreditar em mim, mesmo quando eu não acreditava.

Aos meus irmãos,

pela amizade e que acompanharam a realização desse sonho.

Aos meus sobrinhos e sobrinhas,

que são importantes na minha vida, pois os considero como meus “filhos postiços”.

Ao meu cunhado, cunhadas,

por participarem desse momento tão importante.

Aos meus amigos e professores, que me incentivaram e colaboraram em todas as etapas desse trabalho.

AGRADECIMENTOS

À Professora Dra. Ester Cerdeira Sabino, que aceitou ser minha orientadora, que me recebeu, me integrou à sua equipe de pesquisa. Os seus ensinamentos, seu apoio, paciência e compreensão, foram fundamentais para o êxito desse trabalho. Por tudo, gostaria de expressar a minha sincera gratidão.

Ao Professor Dr. César de Almeida Neto, gostaria de expressar a minha sincera gratidão, pelos seus ensinamentos, apoio, disponibilidade para esclarecimentos teóricos durante a realização dessa dissertação.

Ao Dr. Alfredo Mendrone Júnior, Diretor Técnico da Fundação Pró-Sangue, por ter proporcionado a realização desse estudo, pelo apoio, colaboração e compreensão.

A minha querida amiga, minha irmã, Suzete, que é uma maravilhosa profissional, pelo apoio, motivação, incentivo e compreensão, e me ensinou cada etapa para poder realizar esse trabalho.

A todos os funcionários da Fundação Pró-Sangue Hemocentro de São Paulo, pelo apoio e colaboração.

As minhas queridas amigas Eliane Margareth P Carneiro, do Instituto Adolfo Lutz, Anna Shoko Niyshia e Cecília Salete, da Fundação Pró-Sangue Hemocentro de São Paulo, Gisele R Gouveia do Instituto de Psiquiatria do Hospital das Clínicas da FMUSP, pelo apoio, motivação, companheirismo durante a realização desse estudo.

A minha diretora do Instituto Adolfo Lutz, Raimunda Telma de Macedo Santos pelo apoio e compreensão.

Ao Dr Hélio Gomes da Seção de Análise Especial / Líquor do Laboratório Central do HC-FMUSP, pelo apoio e fornecer as amostras e os dados dos pacientes para a realização desse estudo.

Ao Dr Dr. Steven S. Witkin, Professor emérito de Infectologia e Imunologia, do Departamento de Obstetrícia e Ginecologia da Weill Cornell Medicine, Nova Iorque pelo apoio na revisão do artigo científico.

Aos pacientes do Hospital das Clínicas da FMUSP, pela confiança em participarem desse estudo.

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP, processo nº. 2011/52094-3, pelo financiamento do projeto de pesquisa, tornando possível a realização desta tese.

“A força não provém da capacidade física.

Provém de uma vontade indomável.”

Mahatma Gandhi

*Não deixe o ruído das opiniões dos outros,
abafar a sua própria voz interior.”*

Steve Jobs

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas, siglas e símbolos

Lista de figuras

Lista de tabelas

Resumo

Abstract

1 INTRODUÇÃO.....	18
1.1 Infecções virais do Sistema Nervoso Central.....	18
1.2 Encefalite Viral.....	28
1.3 Agentes etiológicos de encefalite viral.....	39
1.3.1 Herpesvírus.....	39
1.3.1.1 Herpesvírus simples (HSV- 1 e HSV- 2).....	41
1.3.1.2 Vírus Varicella-Zoster (VZV).....	43
1.3.1.3 Epstein-Barr Vírus (EBV).....	45
1.3.1.4 Citomegalovírus (CMV).....	47
1.3.1.5 Herpesvírus humano tipo 6 (HHV-6).....	49
1.3.1.6 Herpesvírus humano tipo 7 (HHV-7).....	50
1.3.2 Arbovírus.....	51
1.3.2.1 Vírus da Dengue.....	57
1.3.2.2 Vírus da encefalite de Saint Louis (SLEV).....	58
1.3.2.3 Vírus do Oeste do Nilo (WNV).....	59
1.3.2.4 Vírus Rocio (ROCV).....	60
1.3.3 Enterovírus.....	62

2 OBJETIVOS.....	64
2.1. Objetivo Principal.....	64
2.2 Objetivos Específicos.....	64
3 MÉTODOS.....	65
3.1 Casuística.....	65
3.2 Coleta.....	66
3.3 Local do Estudo.....	67
3.4 Métodos.....	67
3.4.1 Extração de ácidos nucleicos.....	67
3.4.2 Síntese de cDNA.....	68
3.4.3 D-RT-PCR.....	68
3.4.4 PCR em tempo real.....	71
3.4.4.1 PCR em tempo real para Dengue (DENV).....	71
3.4.4.2 PCR em tempo real para Febre Amarela (YFV).....	72
3.4.4.3 PCR em tempo real para West Nile Vírus (WNV).....	73
3.4.4.4 PCR em tempo real para Enterovírus.....	74
3.4.4.5 Reação de microarray - CLART ® ENTHERPEX.....	74
3.4.5 Sequenciamento.....	75
3.4.6 Análise Estatística.....	76
4 RESULTADOS.....	77
5 DISCUSSÃO.....	83
6 CONCLUSÃO.....	89
7 REFERÊNCIAS.....	90
APÊNDICE.....	100

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

% - porcentagem

< - menor

> - maior

~ - aproximadamente

μL - microlitro

ADEM- encefalomielite aguda disseminada

ATPase –enzima adenina trifosfatase

AURAV- Vírus Aura

BHE – barreira hematoencefálica

BHL- barreira hematoliquórica

BHR - barreira hematorretiniana

BUSV - vírus Bussuquara

CAPPesqCEP - Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa

CDC - Centro de Controle e Prevenção de Doenças

cDNA - DNA complementar

CHIKV - *vírus Chikungunya*

Cl⁻ - íons cloreto

CML - vírus da Coriomeningite linfocitária

CMV - citomegalovírus

CPCV- vírus Cacicaporé -

Ct - (*Cycle Threshold*) limiar do ciclo ou número do ciclo no qual a quantidade de fluorescência indica que a amostra é positiva.

CV- coxsackievírus

DEN-1, DEN-2, DEN-3 e DEN-4,

DENV - vírus da Dengue -

DEPC - pirocarbonato de dietila

DNA - Ácido desoxirribonucleico

dNTP - desoxirribonucleotídeos fosfato

D-RT-PCR - Duplex transcriptase reversa na reação em cadeia da polimerase

dsDNA - DNA fita dupla

dTT - Ditioneitol

E - ecovírus

EBNA - antígeno nuclear IgG do EBV

EBV ou HHV- 4 - vírus Epstein-Barr

EEEV - encefalite equina oriental

EEG - eletroencefalograma

EV - enterovírus

FMUSP - Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

FPS/HSP - Fundação Pró-Sangue Hemocentro de São Paulo

g/dL - gramas por decilitro

H - hora

H⁺ - íons hidrogênio

HC - Hospital das Clínicas

HCMV ou HHV-5 - citomegalovírus humano

HCO₃⁻ - íons bicarbonato

HHV - herpesvírus humano

HHV6 - herpesvírus humano tipo 6

HHV-6A - herpesvírus humano tipo 6A

HHV-6B - herpesvírus humano tipo 6B

HHV7 - herpesvírus humano tipo 7

HIV - Vírus da Imunodeficiência Humana

HSV-1 ou HHV- 1 - Herpes vírus simplex do tipo 1

HSV-2 ou HHV- 2- Herpes vírus simplex do tipo 2

HTLV-I - vírus linfotrópico de células T humanas tipo 1

IgG - imunoglobulina G

IgM- imunoglobulina M

IGUV – vírus Iguape

III - terceiro

ILHV- Vírus Ilhéus

IV - quarto

K⁺ - íons potássio

kb - quilobase (correspondente a 1000 pares de bases de DNA ou RNA)

KCC4 - Cotransportador de cloro e potássio

KCl - cloreto de potássio

KSHV ou HHV-8 -herpesvírus humano tipo 8 ou vírus do Sarcoma de Kaposi

LCMV - Vírus da coriomeningitelinfocítica

LCR - Líquido Cefalorraquidiano

MAYV - Vírus Mayaro

mg/dL - miligramas por decilitro

MgCl₂ - cloreto de magnésio

mL - mililitro

mL/dia - mililitro por dia

mL/hora - mililitro por hora

mL/min - mililitro por minuto

mM - milimolar

mm³ – mililitro cúbico

MUCV - VírusMucambo

Na⁺ - íons sódio

NBCe2 - Cotransportador de bicarbonato de sódio

NCBI - Centro Nacional de Informações em Biotecnologia

nm- nanômetro

nº. - número

°C - graus Celsius

PBMCs- células mononucleares do sangue periférico

PCR - Reação em cadeia da polimerase

PIXV- Vírus Pixuna

PV- poliovírus

qsp - quantidade suficiente para

RM - Ressonância magnética

RN – recém –nascido

RNA - Ácido ribonucleico

RNaseOUT - inibidor da ribonuclease recombinante

ROCV - Vírus Rocio

rpm- rotações por minuto

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

SGB - síndrome de Guillain-Barré

SLEV- Vírus da encefalite de Saint Louis

SN - Sistema Nervoso

SNC - Sistema Nervoso Central

SNP - Sistema Nervoso Periférico

TBE – solução tampão Tris/Borato/EDTA

TBE - vírus da encefalite transmitida por carrapatos

TC - Tomografia computadorizada

U - unidade

UNAV - vírus UNA

UNV- unidade neurovascular

VEEV - Vírus da Encefalite Equina Venezuelana

Vírus da Dengue (DENV) subtipos 1,2,3 e 4;

VJC - vírus JC ou vírus John Cunningham

VZV - vírus da Varicella-Zoster

VZV ou HHV- 3 - vírus da varicela zoster

WEEV - Vírus da Encefalite Equina do Oeste

WNV - West Nile Vírus

YFV – vírus da febre amarela

ZIKV - vírus Zika

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Produção, circulação e reabsorção do LCR no SNC.....	22
Figura 2 - Barreiras hemato-neurais.....	25
Figura 3 - Mecanismos envolvidos na passagem microbiana da barreira hematoencefálica.....	26
Figura 4 - Amplificação em gel de agarose a 2% dos resultados positivos no D-RT-PCR.....	79
Figura 5 - Distribuição dos casos de encefalite viral por localidade atendidos no Hospital das Clínicas - HC-FMUSP.....	80
Figura 6 - Análise do Blast da paciente do Grupo 1, identificado com o vírus da encefalite de St. Louis.....	81
Figura 7 - Análise do Blast da paciente do Grupo 2, identificado com o vírus da encefalite de St. Louis.....	81

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Agentes etiológicos de infecção viral no sistema nervoso central.....	30
Tabela 2 - Arbovírus emergentes e reemergentes no Brasil.....	56
Tabela 3 - Iniciadores (primers) utilizados nas reações de D-RT-PCR.....	69
Tabela 4 - Sequência de iniciadores (primers) para os arbovírus.....	70
Tabela 5 - Sequência de iniciadores (primers) Dengue 1, 3 e 4 e Dengue 2....	72
Tabela 6 - Distribuição dos pacientes dos Grupos 1 e 2 com suspeita de encefalite viral, segundo gênero e faixa etária.....	77
Tabela 7 - Identificação molecular dos casos positivos de encefalite viral nos pacientes dos Grupos 1 e 2.....	78
Tabela 8 - Dados do LCR dos pacientes dos Grupos 1 e 2 com resultado positivo na identificação molecular.....	82

RESUMO

Ferreira JE. *Caracterização molecular de vírus associados à encefalite em São Paulo, Brasil* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2020.

A encefalite viral é um processo inflamatório agudo e frequentemente difuso do parênquima cerebral. Na maioria das vezes, há acometimento associado das meninges e do espaço subaracnóideo. O objetivo deste estudo foi avaliar a prevalência de encefalite viral por arbovírus das famílias *Togaviridae* e *Flaviviridae* em São Paulo, Brasil. Um total de 500 amostras de líquido cefalorraquidiano (LCR) coletadas entre agosto de 2012 e janeiro de 2013, de pacientes com sintomas de encefalite aguda foram analisadas. Achados sugestivos de encefalite viral - elevações na concentração celular, glicose e proteína total - foram observados em 234 (46,8%) amostras, designadas como Grupo 1. As 266 amostras restantes compuseram o Grupo 2. Todas as amostras foram testadas para Flavivírus (vírus da dengue 1, 2, 3 e 4, vírus da febre amarela e vírus do Nilo Ocidental), Alphavirus (região NS5) e enterovírus por RT-PCR e para herpesvírus e enterovírus usando Enterpex-CLART. Um agente etiológico viral presuntivo foi detectado em 26 amostras (5,2%), 18 (8,0%) no Grupo 1 e 8 (3,0%) no Grupo 2. No Grupo 1, herpesvírus humanos foram detectados em 9 casos, enterovírus em 7 casos, dengue vírus (DENV) em 2 CSFs e vírus da encefalite de St. Louis (SLEV) em um caso. No Grupo 2 havia 3 CSFs positivos para herpesvírus humanos, 2 para enterovírus, 2 para DENV e 1 para SLEV. A detecção de arbovírus, embora presente em uma minoria de pacientes infectados identificam esses vírus como possível agente etiológico da encefalite. Esta é uma preocupação especial em regiões onde esta classe de vírus é endêmica e tem sido associada a outras epidemias recentes.

Descritores: Encefalite viral; Líquido cefalorraquidiano; Sistema nervoso central; Arbovírus; Infecções por herpesviridae; Enterovírus.

ABSTRACT

Ferreira JE. *Molecular characterization of viruses associated with encephalitis in São Paulo, Brazil* [thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2020.

Viral encephalitis is an acute and often diffuse inflammatory process of cerebral parenchyma. The objective of this study was to evaluate the prevalence of viral encephalitis due to arbovirus infection of the Togaviridae and Flaviviridae families in São Paulo, Brazil. A total of 500 cerebrospinal fluid (CSF) samples collected between August 2012 and January 2013, from patients with symptoms of acute encephalitis were analyzed. Findings suggestive of viral encephalitis-elevations in cell concentration, glucose and total protein-were observed in 234 (46.8%) samples, designated as Group 1. The remaining 266 samples comprised Group 2. All samples were tested for Flaviviruses (dengue virus 1, 2, 3 and 4, yellow fever virus and West Nile virus), Alphavirus (NS5 region) and enterovirus by RT-PCR and for herpesviruses and enteroviruses using CLART-Entherpex. A presumptive viral etiological agent was detected in 26 samples (5.2%), 18 (8.0%) in Group 1 and 8 (3.0%) in Group 2. In Group 1 human herpesviruses were detected in 9 cases, enteroviruses in 7 cases, dengue viruses (DENV) in 2 CSFs and St. Louis encephalitis virus (SLEV) in one case. In Group 2 there were 3 CSFs positive for human herpesviruses, 2 for enteroviruses, 2 for DENV and 1 for SLEV. Detection of arboviruses, even though present in a minority of infected patients, identifies these viruses as a probable etiological agent of encephalitis. This is of special concern in regions where this class of viruses is endemic and has been linked to other recent epidemics.

Descriptors: Encephalitis, viral; Cerebrospinal fluid; Central Nervous System; Arboviruses; Herpesviridae infections; Enterovirus.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Infecções virais do Sistema Nervoso Central

As infecções do sistema nervoso central (SNC) são importantes causas de morbimortalidade em todo o mundo¹. Os vírus são a principal causa de infecções do sistema nervoso central (SNC), e estão entre os motivos mais comuns e de interesse na saúde pública, pois mais de 100 vírus são responsáveis por um amplo espectro de danos neurológicos, que ocasionam meningite asséptica, encefalite, meningoencefalite e vasculopatia, acometendo crianças, adultos, idosos e imunodeprimidos^{2,3,4}.

A infecção viral do SNC produz inflamação em regiões anatômicas distintas, como meninges, parênquima cerebral e nervos cranianos e/ou simultaneamente em várias regiões⁵. A inflamação isolada das meninges produz meningite asséptica, o envolvimento do parênquima cerebral causa encefalite, e quando há um contínuo inflamatório entre essas regiões anatômicas adjacentes (menínge e parênquima) ocorre a meningoencefalite⁵.

Anatomicamente, o sistema nervoso (SN) é constituído por dois subsistemas, o sistema nervoso central (SNC) e sistema nervoso periférico (SNP). O SNP é formado por 12 pares de nervos cranianos, 31 pares de nervos raquidianos, gânglios e terminações nervosas^{6,7}. O SNC compreende o encéfalo - formado pelo cérebro, cerebelo e tronco encefálico - e medula

espinhal, que se localizam, respectivamente, no interior da cavidade craniana e coluna vertebral^{6,7}.

O SNC é revestido, de fora para dentro, pelas meninges, que são subdivididas em três membranas de tecido conjuntivo: a dura-máter constituída por um tecido conjuntivo espesso e mais resistente, que está anexado ao crânio e à camada aracnoide, além de conter nervos e vasos; aracnóide membrana delgada, justaposta à dura-máter sendo separada pelo espaço subdural, que contém uma pequena quantidade de líquido para lubrificação das superfícies de contato das membranas, e separa-se da pia-máter pelo espaço subaracnóideo, que contém o líquido cefalorraquidiano (LCR), permitindo a comunicação entre os espaços subaracnóideos do encéfalo e da medula; a pia-máter meninge mais interna, que adere à superfície do encéfalo e da medula, e recebe numerosos prolongamentos dos astrócitos do tecido nervoso, além de acompanhar os vasos que penetram no tecido nervoso pelo espaço subaracnóideo^{6,7,8}. As meninges com o LCR têm a função de proteger as estruturas cerebrais^{6,7,8,9}.

O LCR é um fluido aquoso claro, estéril que apresenta uma osmolaridade em equilíbrio com a sanguínea. Em sua composição apresenta 99% de água e 1% de íons, proteínas, glicose e neurotransmissores^{10,11,12}. Comparado ao plasma, é composto em maior concentração de cloreto, sódio e magnésio, e em menor concentração de potássio e cálcio, sendo que essa diferença está associada ao transporte ativo de íons H^+ e HCO_3^- pelas anidrases carbônicas citoplasmáticas, por Na^+ e Cl^- pelas proteínas de transporte basolaterais^{10,11,12}.

A maior produção do LCR se concentra no epitélio do plexo coróide dos ventrículos cerebrais e somente um quarto é sintetizado no epitélio endimário, parênquima cerebral e líquido intersticial. O processo de secreção de LCR ocorre em dois estágios nos quatro plexos coróides. No primeiro, o plasma é filtrado de forma passiva pelo endotélio capilar entre as frestas no espaço intersticial coróide, devido ao gradiente de pressão osmótica entre as duas superfícies, e no segundo, o ultrafiltrado passa por transporte ativo pelo epitélio coróide para os espaços ventriculares^{10,11,12,13}.

Nos seres humanos a taxa de secreção de LCR varia entre 0,3-0,4 mL/min, correspondente a 18-25 mL/hora e 430-530 mL/dia, sendo totalmente substituído a cada 4 horas. Estima-se que o volume total de LCR num indivíduo adulto normal seja de 100 a 150 mL, em recém-nascidos (RN), varia de 10 mL a 60 mL^{10,11}.

O LCR produzido pelos plexos coróides nos ventrículos laterais circula pelo cérebro e medula espinhal pelo espaço subaracnóideo, ventrículos cerebrais e canal central da medula. O esquema de circulação se resume em: o LCR passa para o III ventrículo na linha média do cérebro pelos forames interventriculares (forames de Monro), e em seguida, passa pelo aqueduto cerebral (aqueduto de Sylvius) para o IV ventrículo, e atravessa as aberturas medianas (abertura de Magendie) e laterais (aberturas de Luschka) para o espaço subaracnóideo, respectivamente da medula espinhal e cérebro. Posteriormente é reabsorvido pelas granulações aracnóideas, que se localizam no interior da dura-máter. Essas granulações predominam no eixo sagital superior, onde a circulação do LCR ocorre de baixo para cima, atravessando o espaço entre a incisura da tenda e o mesencéfalo. No espaço subaracnóideo

da medula, o LCR circula em direção caudal, sendo que apenas uma parte retorna, pois, a outra é reabsorvida pelas granulações aracnóideas existentes nos prolongamentos da dura-máter, que acompanham as raízes dos nervos espinhais. O LCR é produzido continuamente ao longo da via circulatória, e quaisquer alterações em seu volume são influenciadas pela osmolaridade do LCR (Figura 1)^{7,10,11,12}.

O SNC está protegido por barreiras, das quais podemos destacar a barreira hematoencefálica (BHE), que restringe a permeabilidade de substâncias do sangue para o tecido nervoso; a barreira hematoliquórica (BHL), limita a passagem do sangue para o LCR, barreira encéfalo-liquórica que restringe a circulação do líquido para o tecido nervoso, barreira hematorretiniana (BHR) que atua contra macromoléculas e proporciona um mecanismo de controle do fluxo de fluidos e metabólitos; e barreira hematoneural existente no SNP, que também limita a interação entre os nervos periféricos e o sangue circulante^{1,14}.

A BHE é uma barreira física, metabólica e de transporte, que apresenta uma interface dinâmica e complexa entre o sangue e o SNC, com a função de regular o microambiente cerebral, estrita limitação de fornecer nutrientes para o cérebro, proteger de substâncias tóxicas e micro-organismos no parênquima cerebral^{1,15}.

Figura 1- Produção, circulação e reabsorção do LCR no SNC.

A: Localização dos locais de produção, circulação e reabsorção do LCR, as setas indicam a direção do fluxo. B: Síntese do LCR no plexo coroide. C: Esquema da circulação do LCR.

Fonte: Modificado de Lopes*, Aula de Anatomia** (post em blog)

*Lopes LS. Meninges, Líquido Cerebroespinal, Barreiras Encefálicas Vascularização do Sistema Nervoso Central. Neuroanatomia. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto. [internet]. Disponível em:

https://edisciplinas.usp.br/pluginfile.php/2298248/mod_resource/content/1/Meninges%2C%20LCR%20e%20Vasculariza%C3%A7%C3%A3o.pdf.

**Aula de Anatomia. [internet]. Disponível em: <https://www.auladeanatomia.com/novosite/pt/sistemas/sistema-nervoso/meninges-e-liquor/>

A BHE é formada por células endoteliais microvasculares cerebrais cercadas por pericitos, astrocíticos, micróglia, neurônios e matriz extracelular e as interações dessas células constituem a unidade neurovascular (UNV), que garantem a integridade da BHE^{1,15,16}. Entre as células endoteliais cerebrais, ficam alinhadas as junções estreitas intercelulares (junções oclusivas), com a finalidade de controlar a abertura e fechamento da BHE, impedindo a passagem de substâncias do sangue para o SNC; os prolongamentos dos astrócitos auxiliam na constituição da BHE, pois formam uma rede delgada próxima ao endotélio e envolvem os neurônios aos capilares sanguíneos, atuando no controle do tônus vascular; os pericitos se unem as células endoteliais, com funções na estabilidade vascular e regulação da homeostase cerebral, sendo que sua ruptura ocasiona uma alteração na BHE, causando uma inflamação no SNC (Figura 2)^{1,15,16,17,18,19,20}. Além disso, a falta de aberturas, baixa atividade pinocitótica e bombas de efluxo no endotélio cerebral bloqueiam a entrada de moléculas entre o sangue e o cérebro^{1,15,16,17,18,19}.

Em situações fisiológicas, a permeabilidade da BHE é regulada principalmente por fatores derivados de astrócitos, que controlam as propriedades de transporte do endotélio e a organização da arquitetura das junções oclusivas²¹.

A barreira hematoliquórica (BHL) é formada pelo epitélioependimário, que reveste os plexos coróides localizado nos ventrículos cerebrais, pelas células imunes e capilares fenestrados e pela presença das junções de oclusão que unem as células próximas à superfície ventricular (Figura 2)^{14,15,20}. As células epiteliais do plexo coróide apresentam moléculas transportadoras como

as $\text{Na}^+/\text{K}^+\text{ATPase}$, transportador $\text{Na}^+/\text{NaHCO}_3$ (co-transportador eletrogênico-NBCE2) e co-transportador de potássio e cloreto (KCC4). A BHL exerce uma função de manter a homeostase do cérebro, pois permite a passagem direta de água, íons e nutrientes para o interior LCR^{20,21,22}.

Embora o SNC esteja protegido pelas barreiras fisiológicas que separam a corrente sanguínea e o cérebro, há vários patógenos que são capazes de invadir o cérebro, ocasionando uma disfunção da BHE, com a perda da homeostase, sendo considerado o mecanismo de progressão de várias doenças no SNC^{23,24}.

A penetração de vírus no cérebro pode levar à disfunção BHE, incluindo aumento da permeabilidade, pleocitose e encefalopatia. A fisiopatologia da infecção pode ocorrer de forma paracelular, transcelular e/ou em fagócitos infectados (mecanismo de “cavalo de Tróia”)^{1,20}. A via transcelular ocorre com a penetração do vírus através das células da barreira, sem qualquer evidência de micro-organismos entre as células ou de dano intracelular das junções estreitas intercelulares^{1,20}. A via paracelular é caracterizada pela penetração do vírus entre as células da barreira, com ou sem danos nas junções estreitas intercelulares, enquanto o mecanismo “cavalo de Tróia” envolve a penetração viral nas células da barreira usando transmigração nos fagócitos infectados (Figura 3)^{1,20}.

Figura 2 - Barreiras hemato-neurais: A - Barreira Hematoencefálica; B - Barreira do líquido cefalorraquidiano; C - Barreira hematorretiniana; D - Barreira hemato-espinhal.
Fonte: Adaptado de Kim, 2008¹.

A neuroinflamação tem um papel central nas patologias das doenças cerebrais, pois uma resposta inflamatória exacerbada ou descontrolada pode ser fatal e progredir para doenças neurológicas agudas e crônicas, como a

encefalite²⁵. A diversidade de componentes moleculares e celulares envolvidos no processo inflamatório incluem a infiltração do parênquima cerebral e ativação de células imunes, superprodução de citocinas, quimiocinas e moléculas de adesão, que ocasionam disfunção e/ou destruição neuronal²⁵.

Figura 3 - Mecanismos envolvidos na passagem microbiana da barreira hematoencefálica. a. Travessia transcelular; b. Travessia paracelular; c. O mecanismo de cavalo de Tróia.
Fonte: Adaptado de Kim, 2008¹.

As infecções virais no SNC, principalmente meningite e encefalite, ocorrem quando o vírus penetra o espaço subaracnóideo e causa um processo inflamatório, podendo desencadear a liberação de fatores inflamatórios, como citocinas, que levam a danos teciduais localizados, como aumento da permeabilidade tecidual e rompimento da barreira hematoencefálica^{5,9,13,24}.

A meningite viral, também denominada de meningite asséptica, é um processo inflamatório das meninges, que pode ocorrer em indivíduos de qualquer faixa etária, ao início agudo de sintomas e febre meníngea, pleocitose do líquido cefalorraquidiano, e geralmente apresenta um processo autolimitado, sendo que o agravamento do quadro pode provocar uma encefalite ou meningoencefalite^{5,9,13}.

Na meningite viral, os agentes mais comumente responsáveis em causar a infecção são os enterovírus, herpesvírus (HSV-2, VZV, CMV e EB), vírus da Coriomeningite linfocitária (CML), arbovírus, adenovírus e vírus da imunodeficiência humana (HIV)^{9,13}. A sintomatologia geralmente se manifesta com cefaleia, fotofobia, rigidez de nuca e outros sinais característicos de irritação meníngea^{5,9,13}.

Na encefalite, uma característica marcante é o estado mental alterado, sinais neurológicos focais ou difusos, déficits motores ou sensoriais, alterações de comportamento ou de personalidade e distúrbios da fala ou movimento^{9,13}.

Apesar do SNC seja protegido por um sistema de barreira altamente complexo, os patógenos virais são capazes de estabelecer infecção nas células endoteliais vasculares cerebrais, que permitem a passagem direta através da BHE para as células da glia e neurônios adjacentes, sendo que podem infectar por outros mecanismos, que incluem infecção direta do epitélio

do plexo coróide, células hematopoiéticas infectadas por vírus e que são transportadas para o SNC por fluxo sanguíneo direto por células linfóide, ou ainda pela quebra induzida por inflamação da BHE⁵. Outra forma de invasão ao SNC ocorre quando os vírus infectam e migram por neurônios sensoriais, motores periféricos ou neurônios sensoriais olfativos, cujos dendritos são diretamente expostos às vias aéreas nasais⁵. Em geral, os vírus que atingem as células das meninges ou do revestimento ventricular, plexo coróide e ependimário geralmente induzem meningite, enquanto aqueles que infectam o parênquima do SNC dão origem a meningoencefalite, encefalite ou mielite⁵.

O tecido cerebral lesionado se recupera de forma lenta e em alguns casos pode ocorrer de forma incompleta. Mesmo em pacientes que se recuperam totalmente da encefalite viral, podem ser necessários meses para o retorno à função normal. Embora muitas vezes a etiologia definitiva dessas infecções virais do SNC não seja confirmada, a encefalite viral e a meningite ocorrem com frequência e devem ser reconhecidas⁹.

1.2 Encefalite Viral

A encefalite viral é um processo inflamatório agudo e difuso do parênquima cerebral, e na maioria dos casos há acometimento associado das meninges e do espaço subaracnóideo, ocasionando o quadro de meningoencefalite^{26,27,28,29}. A situação habitual é de uma doença aguda por um

processo inflamatório o qual pode comprometer de forma grave a função cerebral, algumas vezes de maneira irreversível, pois o resultado do dano viral ao sistema nervoso central (SNC) é determinado pela combinação da resposta imune do hospedeiro e da neurovirulência viral^{26,27,28,29}.

A encefalite é uma doença comum e grave, e suas manifestações clínicas variam de pessoa para pessoa, predomina em idosos, crianças e pacientes imunossuprimidos, e pode apresentar significativa morbimortalidade^{27,29,30,31,32}. Suas principais características incluem estado mental alterado e várias combinações de febre aguda, convulsões, déficits neurológicos, pleocitose do líquido cefalorraquidiano (LCR) e anormalidades no eletroencefalográfico (EEG)^{29,33}. Embora existam muitos motivos para essa doença, às causas mais comumente identificadas são os vírus neurotrópicos^{29,33}.

A etiologia da encefalite viral ainda é um desafio, pois em muitos casos não são detectados²⁷. Entretanto, vários vírus estão associados à causa das encefalites, como vírus Herpes Simplex (HSV) -1 (comumente implicado na encefalite esporádica fatal), seguido dos demais vírus da família herpes (HSV-2, varicela-zoster, citomegalovírus, Epstein-Barr e HHV 6 e 7); paramixovírus (sarampo, rubéola); enterovírus (EV 70 e 71, vírus da poliomielite, eco e cox); flavivírus (Nilo Ocidental, encefalite japonesa, dengue e vírus do zika); retrovírus (vírus da imunodeficiência humana); alfavírus (equino venezuelano, equino oriental, encefalite equina ocidental); bunyavírus (vírus de La Crosse); rabdovírus (vírus da raiva); parvovírus (B19); ortomixovírus (vírus influenza A); e astrovírus (Tabela 1)³⁴.

Tabela 1 - Agentes etiológicos de infecção viral no sistema nervoso central.

Tipo de Vírus: RNA		
Família	Gênero	Vírus
Arenaviridae	Arenavírus	Vírus da coriomeningitelinfocítica (LCMV), vírus Sabiá, vírus Lassa
Bunyaviridae (Arbovírus)	Bunyavírus	Vírus da encefalite La Crosse
Filoviridae	Filovírus	Vírus Ebola, vírus Marburg
Flaviridae (Arbovírus)	Flavivírus	Vírus St. Louis, West Nile vírus, vírus da Encefalite Japonesa B, vírus Rocio, vírus Iguape, vírus Tick-borne, Zikavírus
Orthomyxoviridae	Influenzavirus A	Vírus Influenza A
Paramyxoviridae	Paramixovírus	Vírus da caxumba, vírus do sarampo
Picornaviridae	Enterovírus	Poliovírus, Cocksackievírus, Echovírus
Reoviridae (Arbovírus)	Coltívírus	Febre do carrapato do Colorado
Retroviridae	Lentivírus	Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV)
Rhabdoviridae	Lyssavírus	Vírus da Raiva
Togaviridae (Arbovírus)	Alphavírus	Vírus das Encefalites equinas Leste, Oeste e Venezuelana, Vírus Chikungunya, Vírus Mayaro
Togaviridae	Rubivírus	Vírus da Rubéola
Tipo de Vírus: DNA		
Família	Gênero	Vírus
Herpesviridae	Herpesvírus	Herpes vírus simplex (HSV-1 e HSV-2) vírus da Varicella-Zoster (VZV), vírus Epstein-Barr (EBV), citomegalovírus (CMV), herpes vírus humano tipo 6 (HHV 6), herpes vírus humano tipo 7 (HHV7)
Adenoviridae	Adenovírus	Adenovírus humano

Fonte: Modificado de Kennedy, 2004⁴ e Tuppeny, 2013¹³.

No entanto, até 60% dos casos de encefalite viral presumida permanecem sem explicação devido a falha nas técnicas convencionais de

laboratório para detectar um agente infeccioso^{31,34}. Dessa forma, é importante avaliar os indícios para a identificação dos vírus que incluem: a localização geográfica; idade; comorbidades; história epidemiológica sobre viagens recentes, exposição a vetores, animais ou contatos de doentes; sintoma prodromico; manifestações sistêmica e neurológica^{27,28}.

A patogênese da encefalite viral pode ocorrer quando os vírus penetram o Sistema Nervoso Central (SNC) por via hematogênica ou por via intraneuronal, mas em alguns casos pode haver um comprometimento dos vasos sanguíneos, ocasionando uma vasculite, e em outros pacientes foram relatados um processo de desmielinização após a infecção^{2,5,35}.

A disseminação hematogênica durante uma viremia é a mais comum e resulta em transporte passivo do vírus pelo endotélio do plexo coróide ou pela replicação viral ativa em células endoteliais, ocasionando uma reação inflamatória e alteração da barreira hematoencefálica, sendo que isso ocorre com os enterovírus, poliovírus e arbovírus^{2,5,35}. A infiltração linfocítica perivascular resulta da transferência passiva do vírus através do endotélio nas junções pinocitóticas do plexo coróide (via paracelular) ou da replicação ativa do vírus nas células endoteliais capilares (via transcelular)^{1,2,5}.

Os vírus podem infectar o SNC por via intraneuronal, sendo que a infecção viral do trato olfativo permite a disseminação do vírus para o SNC por intermédio do trigêmeo, olfatório e simpático/parassimpático, como ocorre com o HSV^{1,2}. A migração do vírus consiste desde a extremidade do axônio ou de um dendrito em direção ao corpo do neurônio, onde a replicação pode continuar intraneuronal, ou propagar de célula a célula no meio extracelular, como exemplo ocorre pela infecção pelo vírus da raiva².

O processo infeccioso viral pode induzir distúrbios neurológicos durante a infecção primária, ou em determinadas situações em que ocorre a reativação do vírus (fase latente para lítica), e também por mecanismos imunomediados no caso de encefalomielite disseminada aguda³⁶. Na infecção primária a entrada e replicação viral podem ser por via cutânea, conjuntivas e/ou pelas células epiteliais do trato respiratório ou gastrointestinal, e o período de incubação varia de 1 a 21 dias, ou entre o contato com o vírus e o início dos sintomas³⁶. A probabilidade de causar a infecção no SNC é dependente da eficiência da replicação do vírus em locais sistêmicos, pelos efeitos protetores das respostas imunes inatas ou adaptativas do hospedeiro, pela magnitude ou duração resultante da viremia e pela integridade das barreiras que compõem o SNC³⁶.

Os principais sintomas e sinais de encefalite viral têm início agudo apresentando uma tríade: febre, nível alterado de consciência e cefaleia, e outros sinais clínicos podem associar-se como náuseas, vômitos e progredir com sintomas neurológicos, como alterações do nível de consciência, desorientação, distúrbios comportamentais, déficit motor, afasia, hemiparesias e crises convulsivas. Entretanto, esses sinais vitais podem evoluir de confusão mental para torpor e coma^{3,32}.

As manifestações clínicas e a progressão da doença estão intimamente relacionadas às áreas do sistema nervoso acometidas, determinadas pelo neurotropismo viral, e com isso distinguem um paciente com encefalite de um com meningite viral, que pode ter cefaleia, rigidez nuchal e febre, mas não alterações sensoriais ou neurológicas focais alteradas³. A concomitância de determinados sinais ou sintomas como rash cutâneo, lesão labial herpética,

anosmia e alucinações olfatórias, podem ajudar na identificação do vírus envolvido na patogênese da doença³.

No mundo, os principais agentes causadores de encefalites são os herpesvírus, arbovírus e enterovírus não-polio^{3,36}. Nos países desenvolvidos, o herpes vírus tipo 1 (HSV-1) é a principal causa de encefalite esporádica em adultos, sendo observado em 65% dos estudos, enquanto o vírus varicela zoster (VZV) é responsável por até 22% dos casos pediátricos^{3,37}.

Globalmente, as diferenças regionais moldam a epidemiologia da encefalite, especialmente aquelas transmitidas por vetores^{3,37}. Na Ásia, vírus da encefalite japonesa (JEV) foi o agente infeccioso mais prevalente relatado em estudos e afeta principalmente crianças³⁷.

As etiologias diferem na Europa, com HSV e VZV como os agentes mais frequentes, além do enterovírus (EV) e vários arbovírus³⁷. Na França os agentes etiológicos mais frequentes foram HSV (22%), VZV (8%), já no Reino Unido foi de HSV (19%), VZV (5%), na Espanha foi de HSV (20%), VZV (5.3%), EV (2,6%), na Finlândia a prevalência foi de VZV (12%), HSV1 (9%), TBE (9%), enquanto na Itália foi de HSV (15%), VZV (7%), arbovírus (0,5%)³⁷.

Na Nova Zelândia e Austrália as prevalências dos agentes etiológicos foram respectivamente: VZV (14%), HSV (11%), EV (3%) e: HSV (13%), VZV (3,8%)³⁷.

O vírus da encefalite transmitida por carrapatos (TBEV) foi mais frequentemente no leste, norte da Europa e principalmente na Rússia³⁷. Entretanto, outros flavivírus e alfavírus foram mais frequentemente observados, como o West Nile Vírus (WNV), que é o agente etiológico mais prevalente em

partes da Europa, Rússia, África, Oriente Médio, Índia, Indonésia e América do Norte^{3,26,29,37}.

No Canadá, a prevalência dos principais agentes etiológicos responsáveis pelos casos de encefalite viral são o VZV (17,7%), HSV (9,3%), WNV (3,1%)³⁷.

Nos Estados Unidos, 20 a 50% dos casos de encefalite são ocasionadas por vírus, sendo que o vírus herpes simplex (HSV) ocupa 50 a 75% dos casos virais identificados, seguido pelo vírus da varicela-zoster (VZV), enterovírus e arbovírus²⁹. Entre as arboviroses o West Nile Vírus (WNV), é o responsável pela maioria dos casos de encefalite viral aguda, estimando um alto custo na hospitalização, cuidados após a alta (com cuidadores e na reabilitação)²⁹.

No Brasil, semelhante ao encontrado em outros países, os agentes responsáveis pela maioria dos casos de encefalites virais são os herpesvírus do tipo 1 e 2 (HSV-1 e HSV-2), seguido pelos arbovirus em destaque para os flavivírus, enterovírus não pólio, e influenza A³⁸. O risco do aparecimento de novas doenças emergentes e reemergentes causadas por vírus está relacionado com o fato que o país possui grandes centros urbanos com alta densidade populacional, infestados por mosquitos dos gêneros *Culex* e *Aedes*, os quais, além de serem vetores de arbovírus, são altamente antropofílicos³⁸. Entre os arbovírus que circulam no Brasil, os membros das famílias *Togaviridae*, *Flaviviridae*, *Peribunyaviridae*, *Reoviridae* e *Rhabdoviridae* causam o maior número de infecções e doenças em humanos, em que podemos destacar os vírus Bussuquara (BUSV), Cacicaporé (CPCV), Dengue (DENV) sorotipos 1-4, Rocio (ROCV), Iguape (IGUV), Ilhéus (ILHV), febre

amarela (YFV) e o vírus da encefalite de Saint Louis (SLEV) são todos flavivírus de importância médica que foram isolados no Brasil^{39,40,41}. No final de 2014, países sul-americanos, como Guiana Francesa, Venezuela, Colômbia, Suriname, Paraguai e Brasil, já haviam relatado a circulação local de vírus Chikungunya (CHIKV). Em 2015, é confirmada a entrada do vírus Zika (ZIKV) no país, em que foram relatados os primeiros casos humanos autóctones principalmente na Bahia e Rio Grande do Norte^{42,43,44,45,46}.

As manifestações clínicas da encefalite viral se baseiam nos sinais e sintomas que requer alteração do estado mental com alteração do nível de consciência, febre, dor de garganta, rigidez no pescoço, calafrios, náusea, vômito, diarreia, erupção cutânea, linfadenopatia, artralgia, mialgia, letargia, mudança de personalidade; e nos achados neurológicos: focal e difuso, pode apresentar sonolência e coma profundo^{26,35,36,47}. A manifestação focal é caracterizada pela disseminação neuronal do vírus com sintomas de convulsões, déficits motores, afasia, mudanças comportamentais e de personalidade⁴⁷. A difusa resulta da disseminação hematogênica do vírus que atravessa a barreira hematoencefálica pelas células endoteliais, com alterações do estado mental e convulsões generalizadas⁴⁷. A encefalite leve pode apresentar quadro focal ou difuso, sem comprometimento neurológico⁴⁷. Quando grave, a encefalite pode estar associada à hipotensão ou hipertensão, hepatite, insuficiência renal, comprometimento respiratório e morte por complicações sistêmicas graves^{36,48}.

No diagnóstico laboratorial, a punção lombar para a obtenção do líquido cefalorraquidiano (LCR) permite investigar inicialmente, pela contagem de

células e concentração de glicose, a presença ou ausência de infecção, e também ser um indício do provável agente etiológico envolvido nessa infecção^{34,35,36}. A análise do LCR apresenta pleocitose com predomínio linfocítico, proteinarraquia e glicorraquia que pode apresentar normal ou aumentada^{35,36}. A contagem de leucócitos pode ser acentuadamente aumentada na encefalite causada pelo HSV-1, enquanto a glicorraquia pode ser um pouco reduzida na infecção por enterovírus³⁶. Na encefalite por HSV pode ser comum à presença de eritrócitos no líquido cefalorraquidiano, devido a lesões hemorrágicas no parênquima cerebral¹³.

A análise molecular do LCR por meio da técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) para a detecção do antígeno é o método de referência para o diagnóstico de infecções virais no SNC, pois permite a detecção de vírus de forma rápida e favorece a terapêutica dos pacientes, a fim de limitar a necrose cerebral, por exemplo, na encefalite herpética, e na economia de custos na hospitalização^{35,36,49}. Além disso, a quantificação da carga viral por PCR em tempo real é útil para monitorar a eficácia da terapia antiviral, bem como para estabelecer o prognóstico da doença^{35,36,49,50}. No entanto, o pequeno volume de LCR disponível, combinado com o grande número de vírus DNA e RNA potencialmente responsáveis por meningite ou encefalite, dificulta a busca do agente etiológico num perfil diagnóstico exaustivo⁵⁰.

O avanço nos métodos de PCR, como o desenvolvimento de tecnologias multiplex, permite identificar simultaneamente mais de um patógeno em amostras clínicas e agilizar o diagnóstico laboratorial⁵⁰.

A técnica de microarranjos (*microarray*) de ácidos nucleicos possibilita a avaliação simultânea de milhares de genes utilizando sondas específicas

marcadas com fluoróforos sob uma plataforma sólida, e com isso permite a identificação dos agentes etiológicos,^{50,51,52}. Atualmente, há várias plataformas para identificação dos agentes etiológicos do SNC, como, por exemplo, estão disponíveis sistemas para herpesvírus e enterovírus, e para herpesvírus, enterovírus e flavivirus^{51,52}.

A pesquisa de anticorpos de infecções virais no SNC, requer a síntese de IgM antiviral específica que pode ser sintetizada a partir de 7 a 10 dias após a infecção do SNC, sendo que a mesma não atravessa a barreira hematoencefálica devido ao seu tamanho^{32,35}. Cerca de 50% dos casos desenvolvem índice de IgG elevado e apresenta relevância diagnóstica nos casos de infecções virais do SNC, tais como sarampo, rubéola, HSV, VZV, CMV, HTLV-I e VJC³². A detecção de IgM é útil para infecções por flavivírus e menos para herpesvírus, que geralmente são reativações³². Ao contrário da IgM, a IgG é normalmente encontrada no LCR, portanto, em uma infecção aguda primária no SNC, a IgG aumenta mais tarde que a IgM no LCR e no soro, entretanto, nas reativações e infecções secundárias, a IgG tende a aumentar precocemente do que a IgM³².

O neurodiagnóstico por imagem pode ser realizado pela ressonância magnética (RM) - em que esse método apresenta melhor sensibilidade na captura das imagens-, e pela tomografia computadorizada (TC) de crânio, sendo que ambos permitem auxiliar no diagnóstico das encefalites, pois permite revelar a presença de edema difuso e lesão focal^{32,36}. A RM e TC podem parecer normais quando realizada antecipadamente, entretanto, quando utilizada a RM ponderada por difusão pode demonstrar alterações precoces³⁶.

A análise da atividade cerebral é realizada pelo diagnóstico do eletroencefalograma (EEG), que permite um estudo neurodiagnóstico adjuvante, pois as alterações podem ser focais ou difusas e depende do local das lesões, em que varia de acordo com o agente etiológico e a gravidade da encefalite^{32,36}.

O prognóstico dos casos de encefalite viral está associado à alta morbidade e mortalidade, apresentando sequelas tardias, e depende em grande parte da idade, agente etiológico e gravidade do episódio clínico⁵³. Entretanto, os pacientes que permanecem sintomáticos têm dificuldades em concentração, distúrbios comportamentais e de fala e/ou perda de memória, e em casos raros, os pacientes podem permanecer em estado vegetativo^{3,4,26}. A complicação mais comum em longo prazo após o processo infeccioso são as convulsões, que podem ocorrer em 10 a 20% dos pacientes, e geralmente são resistentes à terapia médica³. Cerca de 60% dos pacientes sofrem de distúrbio de memória grave, que se apresenta como demência clínica²⁶. Além do custo pessoal, familiar e social, a sobrevivência desses pacientes raramente tornam-os produtivos novamente^{26,27}. O prognóstico das encefalites virais depende do agente etiológico, pois algumas encefalites ocasionadas por arbovírus - como as encefalites equina ocidental, Japonesa B, da primavera-verão Russa, do vale de Murray - deixam sequelas graves como demência, convulsões e sinais deficitários focais em até 50% dos casos^{13,26,27,28,31,33,34,35,37}. Outras apresentam um desenvolvimento benigno como o caso da Encefalite Venezuelana e do Colorado. A encefalite pelo vírus da raiva se caracteriza de forma progressiva e aguda, portanto, fatal na totalidade dos casos acometidos^{13,26,27,28,31,33,34,35,37}. A encefalite herpética causa morbimortalidade podendo desenvolver sequelas

motoras, distúrbios de comportamento ou epilepsia. Nos pacientes idosos, crianças e em imunodeprimidos, ocorre quadros com sinais neurológicos mais graves, podendo causar sequelas graves e incapacitantes, como convulsões^{13,26,27,28,31,33,34,35,37}. A incidência de encefalite varia de 1,5 a 8/100.000 habitantes, sendo maior em crianças menores de um ano de idade^{38,54}.

Na literatura, estudos indicam que a letalidade por encefalite ocasionada por arbovírus é, em média de 7%, entretanto, a encefalite herpética pode apresentar um alto índice de mortalidade, ocorrendo em até 70% dos casos quando não tratado^{26,32}.

A maioria das infecções transmitidas por artrópodes, o controle vetorial e a prevenção de picadas continuam sendo as melhores abordagens para a prevenção, pois a terapia antiviral específica para encefalite viral é geralmente limitada às doenças causadas por herpesvírus³.

1.3 Agentes etiológicos de encefalite viral

1.3.1 Herpesvírus

Os herpesvírus humano (HHVs), pertencentes da família *Herpesviridae*, estão distribuídos em todo mundo, adultos e crianças são infectados por um ou

mais HHVs, provocando a disseminação de doenças⁵⁵. A família *Herpesviridae* está subdividida em três subfamílias que compreende: alfa [herpesvírus simples (HSV ou HHV- 1 e HSV ou HHV- 2) e vírus da varicela zoster (correspondente ao VZV ou HHV- 3)]; beta: [citomegalovírus humano (HCMV ou HHV-5), HHV6 e HHV7)]; e gama: [vírus Epstein-Barr (EBV ou HHV- 4 e herpesvírus associado ao sarcoma de Kaposi (KSHV ou HHV-8)]^{56,57,58}.

Esses vírus são relativamente grandes, cerca de 100-200 nm, encapsulado num capsídeo com forma icosaédrica, coberto com uma camada heterogênea de proteínas virais e RNAs chamados tegumento, e externamente apresenta uma membrana de bicamada lipídica, o envelope, que contém várias glicoproteínas codificadas pelo vírus^{55,56,57,58}. O genoma de DNA linear de fita dupla (dsDNA) de 120 a 240 kb^{55,56,58}. Quanto à diversidade genética, estão entre os vírus humanos mais complexos, por exemplo, no caso do citomegalovírus (CMV), ocorre *splicing* alternativo de códons de início que dão origem a mais de 700 proteínas virais diferentes^{57,58}.

Os herpesvírus apresentam uma característica típica de estabelecer infecção latente ao longo da vida de seu hospedeiro, e sofre reativação lítica em certas condições fisiopatológicas^{56,58}. A infecção primária ocorre nos epitélios, seguido pelo estabelecimento de uma infecção latente em células neuronais ou linfócitos, servindo de reservatório viral⁵⁸. A recorrência da infecção é causada pela reativação do vírus, a partir de seu estado latente⁵⁸.

As infecções por herpesvírus são mais comumente diagnosticadas pela presença de anticorpos e antígenos específicos ou pela detecção de DNA viral por PCR⁵⁸.

1.3.1.1 Herpesvírus simples (HSV- 1 e HSV- 2)

O vírus herpes simples (HSV) é a causa não epidêmica mais comum de encefalite infecciosa na maioria dos países^{27,55,58}. O HSV-1 é um herpesvírus neurotrópico humano associado ao herpes labial, paralisia de Bell e neurite vestibular⁵⁸. O HSV-2 é transmitido pela mucosa genital em adultos e os recém-nascidos podem ser infectados durante o parto, causando uma infecção disseminada e podendo se propagar para o SNC³⁵.

O HSV-1 é responsável por cerca de 90% dos casos de encefalite em crianças e adultos, exceto na população neonatal, em que o HSV-2 predomina por causar infecção durante o parto normal ou vaginal^{27,32,55}. A encefalite por HSV segue uma distribuição etária bimodal, sendo que um terço dos pacientes tem menos de vinte anos, e metade deles, mais de 50 anos^{3,32,55}. Casos de encefalite por HSV podem resultar de infecção primária ou reativação viral (fase latente)^{55,56,57,58}. Após a infecção inicial, o HSV-1 estabelece uma infecção latente nos gânglios neurais sensoriais, podendo ser reativado periodicamente^{27,58}. Em pacientes mais jovens, principalmente crianças, a encefalite por HSV-1 ocorre durante a infecção primária^{27,32,58}.

A patogênese do HSV-1 no SNC ocorre é pela invasão via nervo trigêmeo ou via olfativa, após infecção primária na orofaringe, e observa-se lesão inflamatória e necrosante focal nos lobos temporais, nas estruturas límbicas e no córtex frontal orbital^{27,58}. O HSV-1 está presente em cerca de

70% dos casos de encefalite, com anticorpos, mostrando que a reativação viral deve ser um mecanismo comum, mas não está esclarecido se a reativação ocorre no gânglio trigêmeo ou se teve latência já estabelecida no próprio cérebro^{27,58}.

A maioria dos pacientes apresenta sintomas inespecíficos, incluindo febre, dor de cabeça, confusão e comportamento alterado^{3,59}. Características neurológicas menos frequentes incluem disfasia, convulsões, neuropatias cranianas e outros déficits neurológicos focais^{3,59}. As manifestações clínicas geralmente evoluem ao longo de alguns dias, com cerca de um terço dos pacientes ficando em coma^{3,59}.

A encefalite herpética é a causa mais frequente de encefalite esporádica aguda (não sazonal) nos Estados Unidos (EUA) e Europa e estima-se que a frequência de encefalite herpética nos EUA seja de um caso por 250.000 a 500.000 habitantes^{3,58}. Nos EUA, o HSV-2 é soroprevalente em 20% dos indivíduos, e causam síndromes neurológicas como meningite recorrente, encefalite, principalmente em neonatos e radiculite lombossacra³⁵.

A análise do LCR apresenta pleocitose de células mononucleares (~40 leucócitos/mm³), aumento discreto de proteinorraquia, os níveis de glicose são normais na maioria dos casos, mas foram relatadas hipoglicorraquias, e a presença de glóbulos vermelhos não é sensível nem específica para a encefalite por HSV²⁷.

O diagnóstico é baseado na análise do LCR para detecção do DNA do HSV-1 e HSV-2 por reação em cadeia da polimerase (PCR), com sensibilidade e especificidade superiores a 95%, e resultado falso negativo pode acontecer nas primeiras 72 h após o início dos sintomas neurológicos^{3,27,47,49,59}.

1.3.1.2 Vírus Varicella-Zoster (VZV)

O vírus varicela-zoster (VZV) é um herpesvirus neurotrópico, que causa uma infecção primária denominada varicela, e a inflamação secundária designa-se de herpes zoster, que ocorre pela reativação do vírus da fase de latência presente nos neurônios do nervo craniano, raiz dorsal e gânglios sensoriais^{27,31,59,60,61}. O VZV é a segunda causa mais comum de encefalite viral, e acomete crianças, que apresentam manifestação comum como ataxia cerebelar e/ou encefalite difusa; e em pacientes idosos ou imunocomprometidos ocorre a reativação viral^{27,31,59,60,61,62}.

A encefalite por VZV é reconhecida pelo termo vasculopatia cerebral, pois se caracteriza por uma inflamação nos vasos endoteliais cerebrovasculares causando déficit neurológico focal agudo após a distribuição trigeminal por semanas a meses, e/ou infecção de células coróides^{27,32,62}. Essa infecção ocorre com maior frequência no SNC e causa cerebelite, predominando em crianças com varicela^{27,31,59,62}. A encefalite associada ao herpes zoster pode manifestar um quadro de vasculite^{27,31,59,62}. Entretanto, em pacientes imunocomprometidos, apresenta vasculopatia multifocal envolvendo artérias de pequeno e médio porte, provocando alterações do estado mental, déficits focais e pleocitose mononuclear no LCR²⁷.

O dano neurovascular ocasionado pelo VZV relata quadro de neuralgia pós-herpética; paralisia de nervos cranianos; mielite; encefalite; vasculite de grandes vasos, e em estados mais graves pode ocasionar acidente vascular

cerebral isquêmico, e em pequenos vasos lesões desmielinizantes. Em casos raros, pode causar ventriculite, ao infectar o epêndima, em pacientes imunocomprometidos; encefalomielite, uma complicação pós-infecciosa com ataxia cerebelar, que ocorre após erupção cutânea primária em crianças; e meningite^{27,31,32,35,37}.

A síndrome de Reye, uma encefalopatia grave, incomum e às vezes fatal, pode se desenvolver em associação com varicela ou herpes zoster, até mesmo em pacientes imunocompetentes⁶³. A maioria dos casos de encefalopatia em crianças resultou dessa síndrome, que associa uma encefalomielite a uma infiltração gordurosa hepática e renal de evolução grave^{26,63}. Os sintomas típicos são neuropatias cranianas, estado mental alterado, sinal neurológico focal, e às vezes, convulsões^{47,59}.

A análise laboratorial do LCR mostra uma pleocitose linfocítica leve (~7-260 leucócitos/mm³), e níveis normais ou discretamente elevados de proteinorraquia (máximo de 76 mg/dL) e glicorraquia^{3,27,60}.

A pesquisa de anticorpos intratecais anti-VZV, IgM pode estar presente após cinco dias do início dos sintomas, e pode contribuir para confirmar o diagnóstico da doença do VZV no LCR, mesmo quando os estudos de PCR são negativos, com isso a análise do genoma viral e a pesquisa de anticorpos podem serem utilizadas como uma estratégia para determinar o agente etiológico^{27,32,60}.

O diagnóstico molecular deve ser baseado na análise do LCR para detecção do DNA do VZV por reação em cadeia da polimerase (PCR), que apresenta boa especificidade (~100%). Entretanto, há limitações na sensibilidade (29-100%)^{27,32,47,59,60}, pois o teste pode tornar-se negativo entre 1-

3 semanas sem início dos sintomas neurológicos^{27,32,59,60}. O prognóstico é relatado favorável em crianças, mas quando o contrário foi obtido durante estudos posteriores de monitoramento da encefalite; já nos adultos, o prognóstico é bom, mas pode indicar sequelas neurológicas mais graves, incluindo cognição^{27,32,59,60}.

1.3.1.3 Epstein-Barr Vírus (EBV)

O Epstein-Barr Vírus (EBV) é um vírus linfotrópico causador da mononucleose infecciosa, que infecta cerca de 90% da população mundial, entre crianças e adultos jovens, mas também, tem sido reportado como uma importante causa de encefalite em adolescentes. A transmissão ocorre por saliva, transplante de células-tronco e órgãos e transfusão de sangue^{27,31,64,65,66}. O EBV é um herpesvírus DNA de fita dupla envolvido por proteínas, sendo que as glicoproteínas do envelope viral possuem estruturas para fixação e entrada em células epiteliais e B no hospedeiro, e nessas realizam a replicação do genoma viral⁶⁴. O EBV faz com que as células B se diferenciem em células de memória, que se encontram no sistema circulatório ou fiquem latentes até serem reativadas⁶⁴.

A infecção aguda pelo vírus Epstein-Barr (EBV) no SNC está associada à meningoencefalite, outras síndromes neurológicas e a linfomas⁶⁶. A princípio, o EBV causa infecção do epitélio nasofaríngeo, e se dissemina pela via

orofaríngea e por linfócitos B, atingindo crianças menores de cinco anos (geralmente assintomáticas) e acima de 10 anos, em que se manifestam com mononucleose infecciosa⁶⁷. A manifestação clássica da infecção primária por EBV é a síndrome da mononucleose infecciosa, uma doença sistêmica caracterizada por linfadenopatia cervical, faringite, esplenomegalia, leucocitose com linfócitos atípicos, e a reativação do EBV da fase latente é clinicamente significativa em pacientes imunocomprometidos, pois causa uma doença linfoproliferativa^{27,65,66,67}.

As complicações da infecção pelo vírus Epstein-Barr (EBV) que envolvem o SNC ocorrem entre 1 a 18% dos pacientes com mononucleose infecciosa, e podem apresentar como meningite (a mais comum), encefalite, cerebelite, polirradiculomielite, mielite transversal, neurite óptica, neuropatias cranianas e periféricas, anormalidades psiquiátricas e síndrome de Guillain-Barré^{27,64,65,66,67}. Alguns pacientes podem exibir uma encefalomielorradiculite, e em outros casos podem imitar a encefalite por HSV-1^{27,66,67}. A encefalite por EBV pode ocorrer antes, durante ou após a mononucleose infecciosa, ou mesmo na sua ausência, e apresenta sintomatologia clínica como consciência alterada, coma, convulsões e déficits neurológicos focais^{27,65,66}.

O diagnóstico laboratorial é baseado em estudos sorológicos indicativos de infecção aguda, em que a presença de anticorpo IgM do antígeno capsídeo viral do EBV (VCA) é indicativa de infecção ativa e recém adquirida; e a detecção de antígeno nuclear IgG do EBV (EBNA) não é indicativa de doença no SNC^{27,31,66,67}. O diagnóstico específico é pela detecção do DNA do EBV no LCR por reação em cadeia da polimerase (PCR)^{27,49,66,67}. O EBV está

associado ao linfoma e encefalite do SNC e sua carga viral no LCR é maior do que nas complicações pós-infecciosas^{64,66,67}.

1.3.1.4 Citomegalovírus (CMV)

O citomegalovírus humano (CMV) também denominado de herpesvírus humano-5 (HHV-5) apresenta uma estrutura com diâmetro que varia de 120 a 250nm, composta pelo core que contém o material genético em DNA de fita dupla; capsídeo icosaédrico formado por 162 capsômeros; tegumento constituído por 27 proteínas virais; e envelope que contém várias espículas glicoproteicas⁶⁸.

O CMV causa infecção congênita, que quando sintomática leva a um quadro de hepatoesplenomegalia, retinite, erupção cutânea e envolvimento do SNC; na infância, na maioria das vezes, é totalmente assintomática²⁷; adolescentes e adultos se expressa como uma síndrome *mono-like*, semelhante à mononucleose infecciosa, caracterizada por sintomas de febre, faringite, linfadenopatia, linfocitose atípica e mal-estar; e em pacientes imunocomprometidos, como receptores de transplante e indivíduos infectados pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV), causa uma infecção oportunista, podendo levar a uma encefalite^{27,68,69}.

Esse vírus ocasiona uma infecção primária, que após o processo infeccioso o mesmo pode permanecer latente nas células mielóides contidas pela imunidade das células T citotóxicas^{27,68}. Entretanto, quando ocorre a reativação, os vírus são liberados na corrente sanguínea e em outros fluidos

corporais, e os pacientes, principalmente os imunocomprometidos, retorna a apresentar quadro sintomático^{27,32,68,69}. A reativação viral ocorre durante o comprometimento do sistema imunológico com a imunossupressão^{27,32,68}. A encefalite por CMV é uma consequência da reativação da infecção por vírus previamente latente, causada por retinite ou doença gastrointestinal^{27,32}. No SNC, o vírus tem predileção pelas células endoteliais dos ventrículos laterais, causando uma ventriculite, que pode ser observada na RM com espessamento em torno dos ventrículos laterais²⁷.

Na maioria dos pacientes o quadro de citomegalomononucleose é benigno e autolimitado, e quadros neurológicos ocorrem em menos de 1% dos casos de encefalite, mielite, mielorradiculite, neuropatia e síndrome de Guillain-Barré^{27,32,68}.

O CMV está presente e pode ser adquirido pelo contacto com fluidos biológicos como saliva, sangue, sêmen, secreção vaginal, urina, leite materno e órgãos transplantados de indivíduos infectados^{68,69}.

Nos países desenvolvidos, a prevalência do CMV na população adulta representa 60% a 70%, enquanto nos países emergentes pode estar próximo a 100%^{68,69}.

A análise laboratorial do LCR mostra uma pleocitose polimorfonuclear, a glicorraquia pode estar diminuída e proteinorraquia elevada^{27,32}. A sorologia específica para CMV mostra uma variação nos títulos de anticorpos, pois a síntese intratecal de anticorpo está associada ao período de recuperação³².

O diagnóstico molecular do LCR pelo método de PCR apresenta maior sensibilidade e especificidade (entre 91 e 100%) é o método de escolha, pois supera a cultura viral e detecção de anticorpos de CMV^{27,31,32,49}.

1.3.1.5 Herpesvírus humano tipo 6 (HHV-6)

O HHV-6 é um vírus linfotrópico T que causa doenças como exantema súbito (roséola infantil), síndromes de linfadenopatia, e meningite, encefalite e meningoencefalite^{27,70,71}. Em receptores de transplante de medula óssea é reconhecido que o HHV-6 é o agente etiológico de encefalite límbica^{27,37,70,71}.

Em 2012, o Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus (ICTV) classificou o HHV-6 em dois betaherpesvírus humanos distintos: herpesvírus humano-6A (HHV-6A) e o herpesvírus humano-6B (HHV-6B), ambos neurotrópicos, que são detectados com frequência semelhante no plasma de pacientes transplantados de medula óssea, com exceção, o HHV-6A que causa doença neurológica mais grave em relação ao HHV-6B^{70,71}. O HHV-6B é o vírus predominante nas células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) de adultos saudáveis; e encontrado em adenóides e amígdalas de crianças; associado na maioria dos casos de reativação pós-transplante de órgãos sólidos e células-tronco; e detectado no sistema gastrointestinal^{70,71}. Enquanto o HHV-6A foi encontrado predominantemente no SNC de pacientes com romboencefalite, esclerose múltipla, e também identificada em 72% dos tumores gliais⁷¹.

O tamanho do genoma dos vírus HHV-6A ou HHV-6B varia de 159 a 162 kbp e consiste em várias regiões distintas⁷⁰. O HHV-6A e o HHV-6B replicam-se nas células T, mas, difere no uso do receptor, o HHV-6A liga-se ao CD46 e o HHV-6B ao CD134⁷⁰.

Os pacientes apresentam distúrbios comportamentais, comprometimento grave da memória, agitação, hemiplegia, epilepsia do lobo temporal, paralisia de nervos cranianos, paresia permanente e retardo mental^{27,70,71}.

Na África, a prevalência de HHV-6A é de 85% em crianças saudáveis e 57% em crianças sintomáticas, enquanto para o HHV-6B é 20% em crianças com menos de dois anos⁷⁰. Nos Estados Unidos, Japão e regiões da Europa, o HHV-6B é o vírus mais prevalente nas infecções infantis⁷⁰. Nessas regiões, a infecção primária pelo HHV-6B ocorre tipicamente aos dois anos, sendo a causa etiológica do exantema súbito⁷⁰.

Na análise laboratorial do LCR há a presença de uma discreta pleocitose líquórica²⁷. A determinação sorológica não diferencia entre HHV-6A e o HHV-6B, sendo necessário o uso de métodos específicos^{70,71}.

O diagnóstico molecular, como o PCR e a pesquisa por *microarrays*, permite detectar o DNA viral no LCR dos pacientes, pois são ensaios mais específicos, e para diferenciação é necessária a realização do sequenciamento de nucleotídeos^{70,71}.

1.3.1.6 Herpesvírus humano tipo 7 (HHV-7)

O herpesvírus humano tipo 7 (HHV-7) é um vírus linfotrópico de células T-CD4⁺ identificado como betaherpesvírus, e se encontra intimamente relacionado ao herpesvírus humano tipo 6 (HHV-6), sendo associado a síndrome febril inespecífica, exantema súbito e síndrome do tipo EBV⁷².

A infecção primária pelo HHV-7 pode causar desordens neurológicas observado em crianças com exantema súbito, seguida a um estado de latência ao longo da vida, que pode ser desencadeado por um estado imunocomprometido, entretanto, há relatos de infecção em adultos imunocompetentes, podendo ser uma infecção primária tardia ou a reativação do vírus a partir de macrófagos e/ou células T CD4⁺^{72,73,74}. As manifestações clínicas estão associadas a convulsões, hemiplegia, meningite asséptica, encefalite, encefalomielite aguda disseminada (ADEM), paralisia facial, neurite vestibular e convulsões febris^{72,73}.

O diagnóstico molecular pelos métodos de PCR, como PCR em tempo real é a melhor metodologia a ser utilizada para a caracterização do agente etiológico, pois na sorologia pode ocorrer reação cruzada com outros herpesvírus^{72,73}. O achado do DNA do HHV-7 no LCR está associado com diversas desordens neurológicas do SNC na infância^{72,73}.

1.3.2 Arbovírus

Os arbovírus são vírus transmitidos por artrópodes hematófagos, mosquitos e carrapatos, sendo que parte de seu ciclo replicativo ocorre nesses insetos, podendo ser transmitidos para os seres humanos e outros animais^{27,28,32,75}. As arboviroses são causadas por vírus provenientes das famílias *Togaviridae*, *Flaviviridae*, *Peribunyaviridae*, *Reoviridae* e *Rhabdoviridae*, sendo que há mais de 150 espécies que ocasionam doença

nos seres humanos, representando a principal causa de encefalite em todo o mundo^{27,28,32,75}. Essas famílias apresentam em comum um genoma de RNA, que permite à adaptação as mudanças constantes do hospedeiro e condições ambientais⁷⁶.

Os aspectos estruturais dos arbovírus neuroinvasivos demonstram os três grupos de vírus RNA: alfavírus que consiste em vírus envelopados de 70 nm, que possuem um capsídeo icosaédrico, com genoma de RNA de cadeia simples positivo de 11,8 kilobases, incluindo oito genes, cinco deles de proteínas estruturais (capsídeo, E3, E2, 6K e E1); flavivírus são vírus envelopados de 60 nm com capsídeo icosaédrico e fita simples de RNA polaridade positiva de 10,5 kilobases, incluindo dez genes, três deles de proteínas estruturais (C, prM e E); e os bunyavírus são vírus envelopados de 80 a 120 nm que possui três segmentos de RNA de sentido negativo de cadeia simples denominados grandes (L) , médio (M) e pequeno (S)^{27,77,80}.

Os artrópodes infectados com vírus transmitem ao picar outros animais, sendo que aves e pequenos mamíferos agem como reservatórios^{78,79}. A infecção humana resulta da picada de um mosquito ou carrapato infectado, e o ciclo é completado quando um novo artrópode se infecta ao se alimentar com o sangue de um animal em viremia^{78,79}. Geralmente, os seres humanos são expostos acidentalmente, em trabalho rural e ecoturismos, mas há alguns arbovírus que circulam em ciclos urbanos, e os homens passam a ser hospedeiros de vetores urbanos antropofílicos, causando surtos de problema de saúde pública^{78,79}. A transmissão de arbovírus de humano para humano é incomum, mas é possível com produtos sanguíneos infectados ou transplante de órgãos^{79,80}.

A emergência ou reaparecimento de uma arbovirose é um fenômeno que pode estar relacionado a um ou vários dos seguintes eventos: seleção pelos próprios hospedeiros de cepas virais mais virulentas e adaptadas; ocorrência de mutações genômicas no vírus; mudanças ecológicas produzidas pelo homem que levam a um aumento na prevalência do vetor e/ou criação de um novo reservatório, e viagens por longas distâncias que as arboviroses podem sofrer entre países ou mesmo entre continentes⁸⁰.

Os casos de encefalite viral podem seguir dois padrões de acordo com a atividade do vetor: sazonais, que ocorre de forma epidêmica e não sazonais em que a etiologia dos casos acontece esporadicamente^{27,38}.

As infecções por arbovírus podem ser assintomáticas, neuroinvasivas ou não neuroinvasivas⁷⁶. Os sintomas neurológicos geralmente surgem após um antecedente infeccioso sistêmico^{27,75,76,77,78,79,80}. Em geral, os arbovírus podem causar meningite, encefalite e meningoencefalite, e com menor frequência, podem afetar os nervos periféricos ou medula espinhal, com predileção pelas células do corno anterior, manifestando-se como paralisia flácida aguda^{27,75,76,77,78,79,80}.

O acesso dos vírus ao SNC pode ocorrer por vias hematogênicas ou neuronais, sendo que a disseminação hematogênica é mais comum e pode resultar em uma barreira hematoencefálica alterada, causada por infecções virais transmitidas por artrópodes, que após uma picada de inseto com replicação viral local na pele, a viremia transitória ocorre com a semeadura pelo sistema reticuloendotelial e, às vezes, pelo músculo⁸¹. Com a replicação viral contínua, a viremia secundária leva à infecção de outros órgãos, incluindo o SNC⁸¹.

Nos seres humanos, as manifestações clínicas ocasionadas pelas arboviroses pode ocasionar uma doença febril de leve a grave, gripe, cefaleia, dor retro-orbital, artralgia, exantema maculopapular, mialgia, erupções cutâneas e síndromes hemorrágicas (petéquias, hemorragia e choque, com significativa redução de plaquetas) e neurológicas (mielite, meningite e /ou encefalite, com mudanças de comportamento, convulsões, paralisia e paresia)⁷⁹.

O diagnóstico clínico diferencial das arboviroses é muito difícil, principalmente na fase aguda da infecção quando os sintomas das doenças virais, em geral são muito similares^{27,78,80}. O diagnóstico laboratorial das arboviroses pode ser realizado pela presença de pleocitose no LCR, pelo isolamento do vírus ou por testes sorológico com a detecção de IgM no LCR^{27,31,78,80}. Os resultados sorológicos falso-negativos nos primeiros dias da doença e reação cruzada dos anticorpos com antígenos de outros vírus pertencentes ao mesmo gênero são comuns^{27,31,78,80}. Para resolver tais problemas ao diagnóstico, ensaios baseados na reação em cadeia da polimerase (PCR) usando primers espécie-específicos têm sido descritos para vírus dos gêneros *Alphavirus* e *Flavivirus*^{27,31,78,80}.

Os arbovírus estão distribuídos por todo o mundo, como exemplo, na Ásia a presença do vírus da encefalite japonesa, na Europa e Rússia Oriental o vírus da encefalite transmitida por carrapatos, na América do norte e sul os Flavivírus ou Alphavírus; sendo que podemos citar os casos de encefalite em 2001 nos Estados Unidos causados pelo vírus do Oeste do Nilo (WNV); pelo na Argentina em 2005 pelo vírus neurotrópico Saint-Louis (SLEV), e pelo vírus Rocio no Estado de São Paulo entre 1973 e 1980^{37,82,83}.

O Brasil é um país tropical de grande extensão territorial, sendo que grande parte é recoberto por florestas tropicais e outros ecossistemas naturais que oferecem condições ideais para a ocorrência de várias arboviroses, e também, está relacionado com o fato do país possuir grandes centros urbanos com alta densidade populacional, infestados por mosquitos dos gêneros *Culex* e *Aedes*, que são vetores de arbovírus, sendo a maioria dos arbovírus causadores de doenças em humanos (Tabela 2) pertencem às famílias *Togaviridae* (gênero *Alphavirus*) e *Flaviviridae*, (gênero *Flavivírus*)^{78,80}.

Os arbovírus pertencentes aos gêneros *Alphavirus* e *Flavivirus*, que podem causar encefalite, isolados ou que têm alta probabilidade de emergir em nosso país nos próximos anos, são: *Alphavirus*: Vírus das encefalites equinas tipo leste (EEEV) descrito um caso de encefalite em humanos há cinquenta anos; Vírus das encefalites equinas tipo oeste (WEEV) e tipo Venezuelana (VEEV, subtipo I, variante C); Vírus Aura (AURAV); Vírus Mucambo (MUCV, subtipo III); Vírus Pixuna (PIXV, subtipo IV); Vírus Mayaro (MAYV); Vírus Una (UNAV); e os *Flavivirus*: Vírus da Dengue (DENV) subtipos 1,2,3 e 4; Vírus da encefalite de Saint Louis (SLEV); Vírus Ilhéus (ILHV); Vírus Rocio (ROCV); West Nile Vírus (WNL)^{78,80}.

Tabela 2 - Arbovírus emergentes e reemergentes no Brasil.

Família	Vírus (Sigla)	Doença	Vetor	Clínica	Diagnóstico
Flaviviridae	Dengue (DENV)	Febre Hemorrágica Meningite encefalite	Mosquito: <i>Aedes aegypti</i>	Febre, mialgia, artralgia	Apresentação clínica, sorologia aguda e convalescente, PCR de ácido nucleico
	Encefalite de Saint Louis (SLEV)	Meningite encefalite	Mosquito: <i>Culex</i>	Febre, mialgia, meningismo, estado mental alterado	Sorologia IgM no LCR, PCR de ácido nucleico
	Rocio (ROCV)	Encefalite	Mosquitos <i>Aedes</i> , <i>Psorophora</i> e <i>Culex</i>	Febre, cefaleia, anorexia, náusea, vômitos, mialgia e convulsões	Sorologia, PCR de ácido nucleico
	Oeste do Nilo (WNV)	Meningite encefalite	Mosquito: <i>Culex</i>	Febre, mialgia, estado mental alterado	Sorologia e LCR IgM, PCR de ácido nucleico
	Febre Amarela (YFV)	Febre Hemorrágica encefalite	Mosquitos: <i>Haemagogus</i> e <i>Aedes aegypti</i>	Febre, dor de cabeça, náuseas e vômitos	Sorologia e LCR IgM, PCR de ácido nucleico
	Cacipacore (CACV)	Doença Febril, encefalite	Mosquito: <i>Culicidae</i> Carrapatos	Doença Febril	Sorologia e LCR IgM, PCR de ácido nucleico
	Ilheus (ILHV)	Doença Febril, encefalite	Mosquito: <i>Psorophora ferox</i>	Febre, cefaleia, calafrios, astenia mialgias artralgia	PCR de ácido nucleico
	Bussuquara (BUSV)	Doença Febril	Mosquito: <i>Culex</i>	Doença Febril	PCR de ácido nucleico
	Iguape (IGUV)	Doença Febril	Mosquito: <i>Culex</i>	Febre	PCR de ácido nucleico
	Mayaro (MAYV)	Doença Febril, artralgias	Mosquito: <i>Haemagogus</i>	Febre, dor de cabeça, mialgia, erupção cutânea, artrite	Sorologia, PCR de ácido nucleico
Togaviridae	Encefalite Equina do Leste (EEEV)	Doença Febril, meningite	Mosquitos: espécies de <i>Aedes</i> e <i>Culex</i>	Febre, estado mental alterado, neuropatias	Sorologia e LCR IgM, PCR de ácido nucleico
	Encefalite Equina venezuelana (VEEV)	Encefalite	Mosquito: espécies de <i>Aedes</i> e <i>Culex</i>	Febre, dor de cabeça, dor de garganta, estado mental alterado	Sorologia soro IgM positivo, IgM LCR positivo, PCR para ácido nucleico viral
Bunyaviridae	Oropouche (OROV)	Febre hemorrágica, meningite	Mosquito: <i>Aedes serratus</i> e <i>Culex quinquefasciatus</i>	Febre, mialgia, dor de cabeça, calafrios e náuseas	Sorologia, PCR de ácido nucleico

PCR: Reação em cadeia da polimerase; LCR: líquido cefalorraquidiano.

Fonte: Modificado de Beckan, 2015⁷⁶, Salimi, 2016⁷⁷, Lopes, 2014⁷⁸, Figueiredo, 2007⁸⁰, de Figueiredo, 2017⁸².

1.3.2.1 Vírus da Dengue (DENV)

A dengue representa a mais frequente arbovirose humana comum na Índia, China, Sudeste Asiático, África e América Central e do Sul, sendo que o Brasil possui cerca de 80% dos casos^{27,32,59,76,77,78,83}. O vírus da dengue (DENV) é um flavivírus, transmitido aos seres humanos pela picada de mosquitos fêmeas do gênero das espécies *Aedes aegypti* ou *albopictus*, que após o repasto de sangue infectado, o mosquito está apto a transmitir o vírus depois de 8 a 12 dias de incubação extrínseca. Existem quatro sorotipos: DEN-1, DEN-2, DEN-3 e DEN-4, sendo que subtipos DEN-2 e DEN-3 apresentam propriedades neurotrópicas^{27,32,59,76,77,78,83}.

Afeta pessoas de todas as idades (recém-nascidos, crianças, adultos e idosos), sendo que o indivíduo pode permanecer assintomático ou desenvolver a forma clássica da dengue e até as formas mais graves: dengue hemorrágica e síndrome do choque da dengue^{27,32,59,76,77,78,83}.

As manifestações no SNC ocorrem em cerca de 1 a 5% dos casos de dengue que evoluem com encefalopatia/encefalite, meningite, mielite, encefalomielite disseminada aguda (ADEM), síndrome de Guillain-Barré (SGB)/Miller Fisher, polineuropatia, mononeuropatia facial e ulnar e hemorragia cerebromeningea, sendo que o quadro pode evoluir benigno, porém cerca de 20% progride com sequelas^{27,32,59,76,77,78}. Os sintomas predominantes são sonolência, afasia, crise convulsiva, confusão mental, agitação psicomotora, perda de memória, ataxia, disartria, mioclonia e coma^{27,32,59,76,77,78}.

O diagnóstico laboratorial para confirmação da invasão viral consiste na demonstração do vírus no LCR pela presença de antígenos virais no SNC e produção intratecal de anticorpos específicos em pacientes com enfermidades neurológicas associadas à dengue^{27,32,76,77,78}.

1.3.2.2 Vírus da encefalite de Saint Louis (SLEV)

O vírus Encefalite de Saint Louis (SLEV) é um vírus neurotrópico, pertencente à família *Flaviviridae*, gênero *Flavivirus* é amplamente distribuído nas Américas: do Canadá à Argentina, da costa leste à costa oeste da América do Norte e nas ilhas do Caribe, sendo que provavelmente as aves migratórias são as responsáveis por espalhar este vírus por todo o continente americano, porém, há diferenças biológicas e genéticas entre os isolados da América do Norte e América do Sul^{13,37,76,78,85,86,87}.

Os reservatórios naturais do SLEV incluem pássaros, marsupiais, primatas, preguiças e outros animais silvestres, e os seus vetores são os mosquitos do gênero *Culex*^{76,78,85,86,87}.

A doença causada pelo SLEV pode variar de sintomas leves, incluindo febre e cefaleia, até doença severa, como a meningite e encefalite, sendo que os danos neurológicos podem variar de 5% em jovens e 20% em idosos^{13,76,78}. A doença varia em severidade de uma simples doença febril à grave meningoencefalite, sendo que menos de 1% das infecções pelo SLEV em humanos são clinicamente aparentes^{13,76,78}.

Em 1932, um surto em Illinois, EUA, de SLEV foi reconhecido como causador de encefalite humana^{13,76,78}. Em 1960, ocorre o primeiro isolamento brasileiro do vírus, a partir de mosquitos *Sabethes belisarioi* capturados na rodovia Belém-Brasília^{13,76,78}. No ano de 2004, novamente esse vírus é isolado no sudeste do Brasil em um paciente com doença febril aguda que apresentou fortes dores de cabeça e diagnosticado a princípio como dengue^{13,76,78,85,86,87}.

O vírus SLEV são identificados por RT-PCR, e a caracterização genética da cepa isolada neste paciente revelou diferenças filogenéticas em relação a todas as outras cepas previamente isoladas no Brasil^{13,76,78,85,86,87}.

1.3.2.3 Vírus do Oeste do Nilo (WNV)

A febre do Nilo Ocidental (WNV) é do gênero *Flavivírus*, família *Flaviviridae*, e é endêmica na África, Ásia Ocidental, Oriente Médio, Europa, Américas do Norte e Central^{13,27,37}. O principal gênero de mosquito identificado como vetor do vírus da febre do Nilo Ocidental é o *Culex*, sendo que no Brasil, a espécie mais abundante é o *Culex quiquefasciatus*, além do *Aedes albopictus* e *Anopheles*^{13,27,37,76,78}. O principal reservatório são espécies de aves que apresentam uma viremia alta e prolongada, servindo como fonte de infecção para os vetores, que infetam humanos, cavalos e outros mamíferos^{13,27,37,76,78}. A transmissão por transfusão sanguínea ou após transplante de órgãos é possível, devido ao alto número de pacientes assintomáticos infectados (cerca de 80% dos casos)^{13,27,37,76,78}. As apresentações neurológicas pelo WNV são encefalite, meningite, paralisia

flácida aguda ou mielite que ocorrem em menos de 1% dos casos e imunodeficiência^{13,27,37,76,78}. Em cada 150 infecções resultam em doença neurológica severa como a encefalite, principalmente em pacientes com idade avançada^{13,27,37,76,78}.

As infecções pelo WNV geralmente cursam com assintomáticos, sintomatologia leve, sendo que os primeiros sintomas da doença são febre acompanhada de mal-estar, anorexia, náuseas, vômito, dor retro-ocular, cefaléia, mialgia, exantema máculo-papular, paralisia flácida e linfadenopatia, sendo que pode estar acompanhada de outros sinais e sintomas como: ataxia e sinais extra-piramidais, anormalidades dos nervos cranianos, mielite, neurite ótica, poliradiculite e convulsão^{13,27,37,76,78}.

Na análise do LCR para encefalite por WNV há um predomínio de polimorfonucleares, nível de proteína superior a 100mg/dL, sem hipoglicorragia^{13,27}. A infecção por WNV pode ser confirmada pela detecção de anticorpos do tipo IgM específica para WNV no soro ou no LCR pelo método MAC-ELISA^{13,27}. O PCR permite identificar a presença do vírus no LCR, no diagnóstico de doença neurológica^{13,27}.

1.3.2.4 Vírus Rocio (ROCV)

O vírus Rocio (ROCV), neurotrópico, pertence ao gênero *Flavivirus*, da família *Flaviviridae*, sendo isolado do cerebelo de um caso humano fatal durante uma epidemia de encefalite no Vale do Ribeira, no sudeste de São

Paulo, em 1975^{78,80,88,89,90}. No Brasil, acredita-se que o ROCV pode estar circulando em áreas rurais do sudeste e nordeste^{78,80,88,90}.

O ROCV é transmitido pelos mosquitos *Aedes* e *Psorophora*, que são mantidos num ciclo no qual aves selvagens, incluindo algumas espécies migratórias, são os reservatórios^{78,80,88,90}.

A infecção pelo ROCV pode ser assintomática ou ocasionar encefalite aguda num período de incubação de sete a 14 dias, e afetando homens jovens. As manifestações clínicas são febre aguda, cefaleia, anorexia, náusea, vômito, mialgia e mal-estar^{78,80,88,90}.

Quando atinge o SNC, os sintomas de encefalite são tardios e incluem confusão mental, distúrbios do reflexo, incapacidade motora, irritação meníngea e síndrome cerebelar, alguns apresentaram convulsões e podem produzir sequelas graves como alterações visuais, olfativos e auditivos, dificuldades de equilíbrio e de deglutição, falta de coordenação motora e distúrbios de memória^{78,80,88,90}.

O diagnóstico laboratorial é realizado pela presença de anticorpos e pela reação em cadeia da polimerase (PCR)^{78,80,88,90}. O Rocio vírus teve seu genoma caracterizado completamente, e tem sido responsável por epidemias graves de encefalites no Brasil, e podendo ser o responsável por novos surtos em nosso país^{78,80,88,90}.

1.3.3 Enterovírus

Os enterovírus (EV) são vírus neurotrópicos, pequenos com diâmetro de 25 a 30 nm, esféricos e não-envelopados, pertencentes à família *Picornaviridae*, e consistem em um capsídeo de sessenta subunidades constituídas de quatro proteínas (VP1–VP4), disposto em simetria icosaédrica, em torno de um genoma formado por uma única fita de Ácido Ribonucléico (RNA) de polaridade positiva^{13,27,31,32,59,91}.

Os principais agentes etiológicos que podem causar encefalite incluem: EV-D68, -71, -75, -76 e -89; coxsackievirus A9 e A10, coxsackie B; echovírus 4, 5, 9, 11, 19 e 30; e parecovírus humano 3⁵⁹.

A infecção por EV ocorre geralmente em crianças, com predomínio no verão, em surtos que disseminam por via fecal-oral ou respiratória, num período de incubação da infecção que varia de 4 a 6 dias, causando faringite, doença gastrointestinal, doença mão-pé-boca e herpangina^{13,27,32,59}.

Entretanto, os EV podem se agravar e causar manifestações neurológicas como meningite - com sintomas de cefaléia frontal ou orbital, fotofobia, febre e sinais meníngeos - e estima-se que 3% evoluam para encefalite, que pode estar acompanhado com quadro de edema e hemorragia pulmonar fatal^{13,27,32,59}. A encefalite por EV acomete entre 2% a 25% em pacientes imunodeficientes com hipogamaglobulinemia e em neonatos^{13,27,32,59}.

Epidemiologicamente, os EV são encontrados em vários países como Austrália, Malásia, Tailândia, Estados Unidos da América (EUA), Bulgária e Hungria e Brasil^{27,32}.

A análise do LCR apresenta pleocitose mononuclear, proteinorraquia elevada e glicorraquia normal, e o PCR apresenta melhor diagnóstico das infecções por enterovirus no SNC, por ser mais rápido que a cultura, maior acurácia (sensibilidade de 70% e a especificidade de 100%) e necessita pouca quantidade de material para análise^{27,31,32}.

A diversidade de agentes etiológicos causadores de encefalites virais dificulta o processo de avaliação, que associa a anamnese ao exame físico, mas particularmente os casos de encefalites permanecem sendo primariamente clínico. Apesar dos avanços tecnológicos nos métodos diagnósticos existe a dificuldade em identificar o agente etiológico, e com isso estabelecer a melhor terapia para cada neuroinfecção. Em países como o Brasil, com poucos laboratórios capacitados no diagnóstico específico de infecções virais, esta assertiva toma ainda um maior vulto, justificando a importância desse estudo, no qual a introdução de novas metodologias para diferentes agentes virais para melhoria na identificação das encefalites, e assim definir a terapia.

A relevância desse estudo também deve considerar as migrações, imigrações e o turismo, pois esses fatores socioeconômicos contribuem para a introdução de novos agentes virais que podem ser transmissíveis por artrópodes, aumentando a possibilidade de novos casos de encefalites virais no país. Ademais, as infecções por arboviroses é um problema de saúde pública, sendo necessário avaliar e planejar programas de controle de artropódes para evitar casos de surtos ou epidemias.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo principal

O objetivo principal deste estudo foi caracterizar a etiologia das encefalites virais esporádicas e não sazonal em pacientes atendidos em um hospital de referência na cidade de São Paulo, Brasil.

2.2 Objetivos específicos

- Identificar os agentes etiológicos de casos de encefalites virais causadas pelos arbovírus (flavivírus e alphavírus), herpesvírus e enterovírus não pólio;
- Avaliar a prevalência dos agentes etiológicos associados aos casos de encefalites virais;
- Analisar a distribuição dos casos de encefalite viral por sexo, idade, localidade e características do líquido cefalorraquidiano (LCR).

3 MÉTODOS

3.1 Casuística

No período de agosto de 2012 a janeiro de 2013, foi realizado estudo descritivo da etiologia e prevalência de 500 amostras de líquido cefalorraquidiano de pacientes de ambos os sexos e qualquer faixa etária atendidos no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HC-FMUSP).

Os critérios de inclusão no estudo foram:

- Pacientes com suspeita clínica de meningoencefalite aguda, com pelo menos duas sintomatologias: como febre, alteração do nível de consciência, cefaleia, déficits neurológicos focais e convulsões;
- Não ter diagnóstico etiológico definido e virgem de tratamento em pacientes imunocompetentes;
- Coleta adequada de amostra de líquido suficiente para análise por biologia molecular.

Os critérios de exclusão no estudo foram:

- Impossibilidade de coleta de amostra de líquido para análise por biologia molecular;
- Impossibilidade de assinatura do consentimento livre e esclarecido.

Os pacientes foram classificados em dois grupos:

- Grupo 1: foram incluídos pacientes com pleocitose (celularidade >4 células/mm³) compreendendo predominantemente linfócitos, glicose >50 mg/dL e proteína >10 g/dL no LCR;
- Grupo 2: foram incluídos os pacientes com um ou mais dos parâmetros bioquímicos do líquido, citados no grupo 1, que estavam ausentes.

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo - HCFMUSP (CAPPesqCEP) sob o registro on-line nº. 8874, CAPPesq nº 00696312.9.0000.0068.

3.2 Coleta

A coleta da amostra desses pacientes foi realizada na Seção de Análise Especial / Líquor do Laboratório Central do HC-FMUSP, em que foi efetuada a aspiração de líquido cefalorraquidiano (LCR) da região lombar da medula espinhal, e o material obtido foi enviado para análise bioquímica, microbiológica e citológica.

Foi separada uma alíquota de 1mL de líquido cefalorraquidiano (LCR) das amostras coletadas, e foram encaminhadas para o Laboratório de Biologia Molecular da Divisão de Sorologia da Fundação Pró-Sangue Hemocentro de São Paulo (FPS/HSP).

3.3 Local do Estudo

A investigação molecular dos agentes virais foi realizada no Laboratório de Biologia Molecular da Divisão de Sorologia da Fundação Pró-Sangue Hemocentro de São Paulo (FPS/HSP).

3.4 Métodos

3.4.1 Extração de ácidos nucleicos

Os ácidos nucleicos totais presentes no líquido cefalorraquidiano foram extraídos com o kit QiagenUltraSens (QIAmpUltraSens - Cat.No53706 - QiagenGmbH®, Hilden, Alemanha) utilizando um volume inicial de 250µL, e o procedimento de extração foi realizado de acordo com o protocolo do fabricante.

Como controle interno exógeno foi utilizado 2µL de adenovírus canino (DNA-CAV Vanguard HTLP 5/CV-L 86-4230 65) na diluição de 1/100, apresentando um resultado de CT (*Cycle Threshold*) de 26-33.

3.4.2 Síntese de cDNA

O cDNA foi sintetizado a partir de 10uL do RNA extraído, 2μL de Randon primer (Life Technologies, Carlsbad, Califórnia), e incubada durante 10 minutos a 70°C. Depois foi adicionado 8 μL do mix para RT, com 4 μL de tampão 5 X concentrado de 250 mM Tris-HCl [pH 8.3], 375 mM KCl, 15 mM MgCl₂, 1,5 μL de dTT 0,1M, 0,4 μL dNTP 25 mM (Life Technologies, Carlsbad, Califórnia), 20U de Inibidor de RNaseOUT (Life Technologies, Carlsbad, Califórnia), 200U de Transcriptase reversa (Superscript; Invitrogen, Carlsbad, Califórnia, EUA), e água ultrapura DEPC (Invitrogen, Carlsbad, Califórnia, EUA) qsp para um volume final de 20 μL. As amostras foram incubadas a 42°C durante 90 minutos e a transcriptase reversa foi inativada a 70°C durante 15 minutos.

3.4.3 D-RT-PCR

A amplificação do RNA viral das amostras de LCR foi submetida a PCR duplex para Flavivírus e Alphavírus (D-RT-PCR), utilizando a metodologia descrita por Bronzoni *et al.*, 2005⁹² (Tabela 3).

Tabela 3 - Iniciadores (*primers*) utilizados nas reações de D-RT-PCR.

Tabela 3 – Iniciadores (primers) utilizados nas reações de PCR.			
Iniciadores (Primers)		Sequências (5'-3')	Amplicação (pb)
Alphavirus			
M2W-sense	5'- YAGAGCDTTTTCGCAYSTRGCHW-3'		434 pb
cM3W-anti-sense	5' ACATRAANKGNGTNGTRTCRAANCCDAYCC-3'		
Flavivirus			
FG1 – sense	5'- TCAAGGAACTCCACACATGAGATGTACT-3'		958 pb
FG2-anti-sense	5'-GTGTCCCATCCTGCTGTGTGCATCAGCATACA-3'		

Fonte: Adaptado de Bronzoni *et al.*, 2005⁹².

A reação de PCR foi realizada contendo 8 µL de cDNA, 5 µL de tampão 10 X (200 mM Tris-HCl [pH 8.4], 500 mM KCl), 2 µL de MgCl₂ (50 mM), 1 µL de iniciadores internos M2W e FG1(50 e 15 µM, respectivamente), 1 µL de dNTP 10mM, 1U de Taq DNA polimerase (Platinum *Taq* DNA polymerase cat.nº 10966-034; Life Technologies, Carlsbad, Califórnia), e água ultrapura DEPC (Invitrogen, Carlsbad, Califórnia, EUA) qsp para um volume final de 50 µL. A reação foi submetida a 30 ciclos de 94°C durante 1 minuto, 53°C durante 1 minuto e 72°C durante 2 minutos, seguido de uma extensão final a 72°C durante 5 minutos no termociclador Eppendorf Grandiente® (Eppendorf, Hamburgo, Alemanha). Após a amplificação da primeira etapa com os iniciadores internos, foi preparado um novo mix com os iniciadores MN-PCR Flavivirus para a identificação dos flavivírus brasileiros mais importantes como: DENV 1, DENV 2, DENV 3 e YFV e MN-PCR Alphavirus para VEEV, EEEV, WEEV, AURAV e MAYV. Em seguida foi transferido 5 µL do produto amplificado da primeira para a segunda etapa e colocado no termociclador

Eppendorf Gradient® (Eppendorf, Hamburgo, Alemanha). A reação foi submetida a 25 ciclos a 94°C por 1 min, 53°C por 1 min, e 72°C por 2 min e uma extensão final de 72°C por 5 min. A análise do produto amplificado foi realizada em gel de agarose a 2% em TBE 1X, e a visualização no aparelho Dolphin-Doc Plus (Wealtec Corporation, Sparks, Nevada) (Tabela 4).

Tabela 4 - Sequência de iniciadores (*primers*) para os arbovírus.

Ensaio	Primer ^a	Sequências (5'-3')	Amplificação (pb)
M-N-PCR alphavirus	nVEE (+)	ACGGAGGTAGACCCATCCGA	400 ^b
	nEEE (+)	CCACGGTACCGTTGCC	124 ^b
	nWEE (+)	GGCGGCAGACCTGCTGGAA	208 ^b
	nAURA (+)	TCAATGCACCTTCGACCA	86 ^b
	nMAY (+)	GGAAGTTGGCCAAGGC	270 ^b
M-N-PCR flavivirus	nDEN1 (-)	CGTTTTGCTCTTGTGTGCGC	472 ^c
	nDEN2 (-)	GAACCAGTTTGTTRTTTCATAGCTGCC ^{d,e}	316 ^c
	nDEN3 (-)	TTCCTCGTCCTCAACAGCAGCTCTCGCACT	659 ^c
	nYF (-)	TCAGAAGACCAAGAGGTCATGT ^d	253 ^c
N-PCR	nDEN4 (-)	GCAATCGCTGAAGCCTTCTCCC	222 ^c
	nSLE (-)	ATTCTTCTCTCAATCTCCGT ^d	232 ^c
	nBSQ (-)	AAGTGACACCTGTTTCAGGGTA	388 ^c
	nILH (-)	TCCACCGCTGATCTGAGCCCGTGA	474 ^c
	nROC (-)	TCACTCTTCAGCCTTTTCG	230 ^c

^a (+), verso; (-), reverso. ^bCom primer cM3W. ^cCom primer FG1. ^dPrimer consenso. ^ePrimer degenerado. Fonte: Adaptado de Bronzoni *et al.*, 2005⁹².

3.4.4 PCR em tempo real

As amostras de LCR foram submetidas a PCR em tempo real para o Dengue 1, 2, 3 e 4, febre amarela e West Nile Virus; PCR em tempo real usando primers genéricos que detectam todos os subtipos de enterovírus.

As reações de PCR em Tempo Real QT foram realizadas de acordo com os protocolos das sequências de primers para Dengue 1, 3 e 4⁹³, Dengue 2⁹⁴, Febre Amarela – YFV⁹⁵; West Nile Virus (WNV) para a região NS5⁹⁶.

3.4.4.1 PCR em tempo real para Dengue (DENV)

A reação de PCR em tempo real para Dengue foi realizada para cada subtipo de dengue isoladamente. Os *primers* e *probes* para cada subtipo está relacionado na tabela 2. Utilizamos 10 µL de cDNA e adicionamos 12,5 µL do mix TaqMan® Fast Universal PCR Master Mix (2X), (cat. 4352042, Life Technologies, Carlsbad, Califórnia), 1,0 mM de primer Dengue 1,2,3 ou 4 - sense anti-sense, 0,5mM de probes para Dengue 1,2,3 ou 4 e água ultrapura DEPC (Invitrogen, Carlsbad, Califórnia, EUA) qsp para um volume final de 25µL. O ensaio foi realizado no StepOne™ System (Waltham, Massachusetts, EUA) , com 95°C durante 10 minutos, 40 ciclos de 95°C por 30 segundos seguido de 60°C por 1 minutos. Os dados de fluorescência são registrados no final de cada ciclo (Tabela 5).

Tabela 5 - Sequência de iniciadores (*primers*) Dengue 1, 3 e 4 e Dengue 2.

Ensaio	Sequências
Deng_1f	gACACCACACCCTTTggACAA
Deng_1r	CACyTggCTgTCACCTCCAT
Deng_P1	FAM -AgAgggTgTTTAAAgAgAAAgTTgACACgCg- TAMRA
DEN-2F	CAGGTTATGGCACTGTCACGAT
DEN-2C	CCATCTGCAGCAACACCATCTC
DEN-2	FAM - CTCTCCGAGAACAGGCCTCGACTTCAA - NFQ
Deng_3f	gggAAAACCgTCTATCAATA
Deng_3r	CgCCATAACCAATTTTCATTgg
Deng_P3	FAM -CACAgTTggCgAAgAgATTCTCAAgAggA- TAMRA
Deng_4r	AATCCCTgCTgTTggTggg
Deng_4f	TgAAgAgATTCTCAACCggAC
Deng_P4	FAM -TCATCACgTTTTTgCgAgTCCTTTCCA- TAMRA

Fonte: Adaptado de Callahan, 2001⁹³ e Johnson, 2004⁹⁴.

3.4.4.2 PCR em tempo real para Febre Amarela (YFV)

A reação de PCR em tempo real para YFV foi de acordo com o descrito por Mantel et al., 2008⁹⁵. Para a reação foram utilizados 10µL de cDNA e adicionado 12,5µL do mix TaqMan® Fast Universal PCR Master Mix (2X) (cat. 4352042, Life Technologies, Carlsbad, Califórnia), 1,0 mM de primer YF-NS5-sense – 5'- GCACGGATGTAACAGACTGAAGA-3', 1,0 mM de primer YF-NS5-anti-sense-5'- CCAGGCCGAACCTGTCAT-3', e 0,5mM de probe YF-NS5-FAM-CGACTGTGTGGTCCGGCCCATC–TAMRA e água ultrapura DEPC (Invitrogen, Carlsbad, Califórnia, EUA) qsp para um volume final de 25µL. O ensaio foi realizado no equipamento StepOne™ System (Waltham,

Massachusetts, EUA), com a seguinte programação: 95°C durante 10 minutos, 40 ciclos de 95°C por 30 segundos seguido de 60°C por 1 minutos. Os dados de fluorescência foram registrados no final de cada ciclo.

3.4.4.3 PCR em tempo real para West Nile Vírus (WNV)

A reação de PCR em tempo real para YFV foi de acordo com o descrito por Brieese *et al.*, 2000⁹⁶. Para a reação foram utilizados 10 µL de cDNA adicionados a 12,5 µL do mix TaqMan® Fast Universal PCR Master Mix (2X), (cat. 4352042, Life Technologies), 1,0 mM de primer WNV-NS5-sense – 5'-GCTCCGCTGTCCCTGTGA-3', 1,0 mM de primer WNV-NS5-anti-sense-5'-CACTCTCCTCCTGCATGGATG-3', e 0,5mM de *probe* WNV-NS5-FAM-TGGGTCCCTACCGGAAGAACCACGT-TAMRA e água ultrapura DEPC (Invitrogen, Carlsbad, Califórnia, EUA) qsp para um volume final de 25µL. O ensaio foi realizado no equipamento StepOne™ System (Waltham, Massachusetts, EUA), com a seguinte programação: 95°C durante 10 minutos, 40 ciclos de 95°C por 30 segundos seguido de 60°C por 1 minutos. Os dados de fluorescência são registrados no final de cada ciclo.

3.4.4.4 PCR em tempo real para Enterovírus

A PCR em tempo real para enterovírus foi realizada de acordo com metodologia descrita por Volle et al., 2012⁹⁷.

Para a reação foram utilizados 10 µL de cDNA e adicionados 12,5 µL do mix TaqMan® Fast Universal PCR Master Mix (2X), (cat. 4352042, Life Technologies), 1,0 mM de primer EV1-sense – 5'-CCTGAATGCGGCTAATCC-3', 1,0 mM de primer EV2-anti-sense-5'-ATTGTCACCATAAGCAGCC-3', e 0,5mM de probe EVPb-FAM-ACCGACTACTTTGGGTGTCCGTGTTTC-TAMRA e água ultrapura DEPC (Invitrogen, Carlsbad, Califórnia, EUA) qsp para um volume final de 25µL. O ensaio foi realizado no equipamento StepOne™ System (Waltham, Massachusetts, EUA), com a seguinte programação: 95°C durante 10 minutos, 50 ciclos de 95°C por 30 segundos seguido de 60°C por 1 minutos. Os dados de fluorescência são registrados no final de cada ciclo.

3.4.4.5 Reação de microarray - CLART® ENTHERPEX

O kit CLART® ENTHERPEX (BioMérieux - Ivry-sur-Seine, França) permite identificar a presença de oito herpesvírus humanos: herpes-vírus simples humano tipos 1 e 2 (HSV-1, HSV-2), Vírus varicela-zoster (VZV), citomegalovírus (CMV), vírus Epstein-Barr (EBV), Herpesvirus humano 6 (HHV-6), Herpesvirus humano 7 (HHV-7) e Herpesvirus humano 8 (HHV-8); e os três

principais enterovírus: poliovírus (PV), ecovírus (E) e coxsackievírus (CV). A metodologia utilizada foi a de Microarray, que se baseia na detecção do produto amplificado de um fragmento localizado entre 106-328 pb por RT-PCR numa plataforma de baixa densidade. A análise dos microarrays se realiza de forma totalmente automatizada segundo protocolo do fabricante.

3.4.5 Sequenciamento

As amostras de LCR com resultados positivos para detecção viral em reações D-RT-PCR foram submetidas à análise de sequenciamento de acordo com o método de Sanger. A reação de sequenciamento foi realizada de acordo com as instruções do fabricante para uso do “kit” ABI PRISM Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction® (Applied Biosystems, Life Technologies, Califórnia, Estados Unidos) sequenciado no dispositivo Genetic Analyzer ABI 3100® (Applied Biosystems®, Life Technologies, Carlsbad, Califórnia, EUA).

As sequências foram analisadas utilizando o programa Sequencher 3.0 Sequencing Software® (Ann Arbor, Michigan, Estados Unidos), e comparadas com a base de dados genômica GenBank (Centro Nacional de Informações em Biotecnologia - NCBI - Bethesda, Maryland, EUA).

3.4.6 Análise Estatística

A análise estatística dos dados foi realizada no programa Epi Info™ versão 7.2, (Centro de Controle e Prevenção de Doenças - CDC, Atlanta, Geórgia, Estados Unidos) e na versão Microsoft® Excel Office 2010 (Redmond, Washington, Estados Unidos).

4 RESULTADOS

Entre os 500 pacientes com suspeita clínica de encefalite, 234 (46,8%) foram inseridos no Grupo 1, devido às amostras de LCR apresentarem concentrações aumentadas de células, proteínas e glicose, sugerindo encefalite viral. Os 266 (53,2%) pacientes restantes clinicamente sugestivos de encefalite viral foram inseridos no Grupo 2.

A Tabela 6 resume as características demográficas dos pacientes de acordo com as taxas de detecção do vírus nos grupos. O gênero foi igualmente dividido entre homens e mulheres, e na idade a frequência foi maior nos grupos entre os pacientes acima de 50 anos. Não houve diferenças em nenhuma das categorias entre aquelas positivas ou negativas para vírus, ou entre os Grupos 1 e 2.

Tabela 6 - Distribuição dos pacientes dos Grupos 1 e 2 com suspeita de encefalite viral, segundo gênero e faixa etária.

Dados	Grupo 1				Grupo 2			
(Variáveis)	Positivos	Negativos	Total	Valor p	Positivos	Negativos	Total	Valor p
	N=18 (8,0%)	N=216 (92,0%)	N=234 (100%)		N=8 (3,0%)	N=258 (97,0%)	N=266 (100%)	
Gênero								
Masculino	11 (5,0%)*	92 (39,0%)	103 (44,0%)	0,128	04 (1,5%)	133 (50,0%)	137 (51,5%)	0,931
Feminino	07 (3,0%)	124 (53,0%)	131 (56,0%)		04 (1,5%)	125 (47,0%)	129 (48,5%)	
Idade								
0 - 14	06 (2,7%)	14 (5,9%)	20 (8,6%)	0,000704	01 (0,4%)	19 (7,1%)	20 (7,5%)	0,926
15 - 29	01 (0,5%)	33 (14,0%)	34 (14,5%)		02 (0,75%)	53 (19,9%)	55 (20,7%)	
30 - 49	03 (1,3%)	79 (33,7%)	82 (35,0%)		02 (0,75%)	81 (30,5%)	83 (31,2%)	
> 50	08 (3,5%)	90 (38,4%)	98 (41,9%)		03 (1,1%)	105 (39,5%)	108 (40,6%)	

* Um paciente teve resultados positivos concomitantes para enterovírus (EV) e HHV-6. Teste do qui-quadrado.

A identificação molecular de um agente etiológico viral da encefalite foi positiva em apenas 18 (8,0%) nas amostras de LCR nos pacientes do Grupo 1 e em 8 (3,0%) nos do Grupo 2 (Figura 4).

No Grupo 1 predominaram os membros da família dos herpesvírus (9 casos) seguidos dos enterovírus (7 casos), e foram identificadas três infecções por arbovírus, dois de dengue (1 subtipo DENV-3 e outro DENV-4) e um caso de SLEV (Tabela 7). No Grupo 2 foi detectado um número igual de infecções por arbovírus: 2 DENV (1 do subtipo DENV-2 e 1 do subtipo DENV-3) e 1 SLEV; 3 casos de herpesvírus; seguido por 2 casos de enterovírus (Tabela 7).

A prevalência de encefalite, em ambos os grupos, relacionada à arbovírus em indivíduos do nosso estudo foi de 2,4%, incluindo 4 casos de DENV e 2 de SLEV. Já a prevalência de herpesvírus, em ambos os grupos, foi de 5,0%, e 3,8% nos enterovírus.

Tabela 7 - Identificação molecular dos casos positivos de encefalite viral nos pacientes dos Grupos 1 e 2.

Dados (Variáveis)	Arbovírus N (%)		Herpesvírus N (%)					Enterovírus	Etiologia Desconhecida
	DENV	SLEV	HSV-1	EBV	CMV	HHV-6	VZV	N (%)	
Grupo 1 (N=234)	2 (0,8%)	1 (0,4%)	1 (0,4%)	4 (1,7%)	1 (0,4%)	3 (1,3%)*	0 (0,0%)	7 (3,0%)*	216 (92,0%)
Grupo 2 (N=266)	2 (0,8%)	1 (0,4%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	1 (0,4%)	1 (0,4%)	1 (0,4%)	2 (0,8%)	258 (97,0%)

*Um paciente teve infecção concomitante com EV (enterovírus) e HHV-6 (Real Time PCR e CLART® Ethertherex). DENV: vírus da dengue (D-RT-PCR e PCR em tempo real); SLEV: vírus da encefalite de Saint Louis (D-RT-PCR); HSV-1: Vírus herpes simplex tipo 1 (CLART® Entherpex); EBV: vírus Epstein-Barr (CLART® Entherpex); CMV: Citomegalovírus (CLART® Entherpex); HHV-6: Herpesvírus humano 6 (CLART® Entherpex); VZV: vírus da varicela zoster (CLART® Entherpex).

As amostras dos casos positivos de SLEV, no D-RT-PCR, foram submetidas ao sequenciamento de nucleotídeos para confirmar sua identidade. O fragmento obtido para a análise inicial foi de 232 pb. A amostra do paciente do Grupo 1 foi semelhante em 98%, e o paciente do Grupo 2, apresentou uma identidade de 95% ao SLEV isolado do gene NS5 de BsAsARG-10 (ID de sequência: gb JQ003910.1) (Figuras 6 e 7).

Figura 4 - Amplificação em gel de agarose a 2% dos resultados positivos no D-RT-PCR. 1: PM de 1000pb; 2: SLEV; 3: SLEV; 4: DENV-2; 5: DENV-4; 6: DENV-3; 7: Controle Positivo DENV-4; 8: DENV-3; 9: Controle Negativo; 10: PM de 1000pb.

A maioria dos casos suspeitos de encefalites viral atendidos no HC-FMUSP foi proveniente da região metropolitana de São Paulo, em média 64,5% entre os dois grupos (grupo 1 = 60,2%, grupo 2 = 68,8%) (Figura 5).

Entre o período de coleta, houve maior frequência dos casos dentre os dois grupos de pacientes com suspeita de encefalite, no período de setembro (grupo 1 = 32,5%, grupo 2 = 27,4%) e outubro (grupo 1 = 30,8%, grupo 2 = 33,5%).

Figura 5 - Distribuição dos casos de encefalite viral por localidade atendidos no Hospital das Clínicas - HC-FMUSP.

Os dois casos positivos na identificação molecular de SLEV eram de mulheres de 32 e 40 anos, respectivamente, residentes na região metropolitana de São Paulo, sendo que uma apresentou paralisia facial, enquanto a outra paciente evoluiu sem sequelas.

GenBankGraphics Next Previous Descriptions					
St. Louis encephalitis virus isolate BsAsARG-10 NS5 gene, partial cds					
Sequence ID: gb JQ003910.1 Length: 552Number of Matches: 1					
Related Information					
Range 1: 1 to 87 GenBankGraphics Next Match Previous Match First Match					
Alignment statistics for match #1					
Score Expect Identities Gaps Strand Frame					
152 bits(82)	4e-34()	86/88(98%)	1/88(1%)	Plus/Plus	
Features:					
Query 1					
TCAAGGAACTCCACACATGAGATGTACTTGGGTWAGTGGAGCGGCTGGAAACATCATAC					
A 60					
Sbjct 1 TCAAGGAACTCCACACATGAGATGTAC-					
TGGGTTAGTGGAGCGGCTGGAAACATCATACA 59					
Query61 TGCCGTCAGTATGACTAGCCAAGTGCTC 88					
Sbjct60 TGCCGTCAGTATGACTAGCCAAGTGCTC 87					

Figura 6 - Análise do Blast da paciente do Grupo 1, identificado com o vírus da encefalite de St. Louis.

Fonte: GenBank (*National Center for Biotechnology Information - NCBI*).

GenBankGraphics Next Previous Descriptions
St. Louis encephalitis virus isolate BsAsARG-10 NS5 gene, partial cds
Sequence ID: gb JQ003910.1 Length: 552Number of Matches: 1
Related Information
Range 1: 1 to 87 GenBankGraphics Next Match Previous Match First Match
Alignment statistics for match #1
Score Expect Identities Gaps Strand Frame
147 bits(79) 2e-32() 83/87(95%) 0/87(0%) Plus/Plus
Features:
Query 3
TCAAGGAACTCCACACATGAGATGTACTGKRTTAGKRGAGCGGCTGGAAACATCATAACAT
62
Sbjct 1
TCAAGGAACTCCACACATGAGATGTACTGGGTTAGTGGAGCGGCTGGAAACATCATAACAT
60
Query 63 GCCGTCAGTATGACTAGCCAAGTGCTC 89
Sbjct61 GCCGTCAGTATGACTAGCCAAGTGCTC 87

Figura 7 - Análise do Blast da paciente do Grupo 2, identificado com o vírus da encefalite de St. Louis.

Fonte: GenBank (*National Center for Biotechnology Information - NCBI*).

Na tabela 8 foram apresentados os dados da análise de celularidade, bioquímica e características físicas do LCR dos pacientes dos Grupos 1 e 2 com resultado positivo na identificação molecular para os agentes virais.

Tabela 8 - Dados do LCR dos pacientes dos Grupos 1 e 2 com resultado positivo na identificação molecular.

	Enterovírus		Herpesvírus		SLEV		DENV	
	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 1	Grupo 2
Celularidade								
Linfomononuclear								
> 10 %	7 (3,0%)	1 (0,4%)	9 (3,8%)	1 (0,4%)	1 (0,4)	–	2 (0,8%)	1 (0,4%)
< 10%	–	1 (0,4%)	–	2 (0,8%)	–	1 (0,4%)	–	1 (0,4%)
Eritrócitos								
1-99 células/mm ³	7 (3,0%)	1 (0,4%)	9 (3,8%)	2 (0,8%)	1 (0,4)	1 (0,4%)	2 (0,8%)	1 (0,4%)
> 100 células/mm ³	–	1 (0,4%)	–	1 (0,4%)	–	–	–	1 (0,4%)
Bioquímica								
Glicose								
> 50 mg/dL	7 (3,0%)	–	9 (3,8%)	2	1 (0,4)	1 (0,4%)	2 (0,8%)	–
< 50 mg/dL	–	2 (0,8%)	–	1 (0,4%)	–	–	–	2 (0,8%)
Proteínas								
> 10 mg/dL	7 (3,0%)	2 (0,8%)	9 (3,8%)	2	1 (0,4)	1 (0,4%)	2 (0,8%)	2 (0,8%)
< 10 mg/dL	–	–	–	1 (0,4%)	–	–	–	–
Características								
Físicas								
Claro e incolor	4 (1,7%)	1 (0,4%)	7 (3,0%)	3 (1,1%)	1 (0,4%)	1 (0,4%)	2 (0,8%)	2 (0,8%)
Claro e xantocrômico	1 (0,4%)	–	2 (0,8%)	–	–	–	–	–
Ligeiramente								
hemorrágico	–	–	–	–	–	–	–	–
Ligeiramente turvo	2 (0,8%)	1 (0,4%)	–	–	–	–	–	–
Turvo	–	–	–	–	–	–	–	–

DENV: Vírus da Dengue; SLEV: Vírus da encefalite de St. Louis.

5 DISCUSSÃO

As infecções do sistema nervoso central causam alta mortalidade e morbidade em crianças e adultos. A distinção entre meningite e encefalite nem sempre é fácil de ser diagnosticada clinicamente.

A técnica de PCR para diagnóstico etiológico é considerada a melhor ferramenta para o diagnóstico das encefalites, entretanto, a etiologia das encefalites pode ser definida em menos de 50% dos casos, mesmo após extensa investigação.

A prevalência de encefalites por arbovírus foi de 2,4% (4 casos de dengue e 2 SLEV) neste período, isto é, menor do que foi descrito por outros estudos. Nesse estudo foi observado que os casos de encefalite não apresentam uma distribuição sazonal, pois a maioria ocorreu no final do inverno e início da primavera. As doenças transmitidas por vetores são influenciadas principalmente pela geografia e clima, e com as alterações climáticas, a infectividade pelos Flavivírus e Alphavírus se encontra distribuída durante todas as estações do ano^{95,96,98}.

Por outro lado, a identificação de herpesvírus e enterovírus foram os mais frequentes isolados no LCR dos pacientes, sendo que os herpesvírus mais prevalentes foram o HHV-6 e o EBV. No entanto, as taxas de detecção dos herpesvírus específicos que estavam presentes diferiram entre o presente estudo e outras investigações^{39,99,100}. Sabe-se que esses vírus apresentam uma infecção primária na infância e podem permanecer em latência vitalícia em quase todo adulto, e por alguma condição imunológica, causar infecções secundárias, inclusive no sistema nervoso central^{101,102}.

No Brasil, há registro de três cepas isoladas de sangue de pacientes sem sintomas neurológicos com infecção por St. Louis: dois pacientes do Pará, que apresentaram febre e icterícia, e uma de São Paulo, com suspeita clínica de dengue^{86,87,103,104,105}.

Na Amazônia brasileira, já foram realizados diversos isolamentos do SLEV a partir de artrópodes hematófagos e aves. Porém, o isolamento do SLEV a partir de seres humanos tem sido raro, apesar de haver estudos sorológicos registrando uma prevalência de anticorpos inibidores de hemaglutinação variando entre 1% e 5%¹⁰⁴. Na década de 80, foram registradas quatro pequenas epizootias causadas pelo SLEV no estado do Pará, nas florestas adjacentes a Belém, envolvendo aves silvestres e animais sentinelas. Entretanto, não há informações a respeito de taxas de imunidade ao SLEV em equinos no país¹⁰⁴.

As infecções causadas pelo SLEV nem sempre causam manifestações clínicas de encefalite e muitas vezes passam despercebidas. Os quatro casos descritos acima não apresentavam encefalite^{86,87,103,104,105}.

Recentemente, o SLEV foi detectado por técnicas moleculares em quatro amostras de soro de pacientes com suspeita clínica de dengue e em dois pacientes com suspeita de meningoencefalite viral, todos do Município de São José do Rio Preto, estado de São Paulo¹⁰⁶.

No estudo de Heinen *et al.*¹⁰⁷, foram detectados o vírus de SLEV em três pacientes co-infectados com DENV-4 nas cidades de Cuiabá e Várzea Grande, sendo que um deles apresentava coinfecção tripla com DENV-1¹⁰⁷.

Nenhum caso de WNV foi detectado. A chegada do WNV tem sido esperada no Brasil desde a introdução deste agente nos Estados Unidos em

2000. A detecção deste agente tem impacto direto na Saúde Pública, pois pode causar casos graves de encefalite, e a necessidade de inclusão de testes para triagem desse agente nos bancos de sangue, pois causa maior morbidade entre os receptores de sangue^{107,108,109,110,111,113}. Os dados desse estudo sugerem que este vírus ainda não se encontra circulando na cidade de São Paulo, sendo que foi uma das maiores casuísticas de encefalite que buscou identificar sistematicamente o WNV.

Em 2015, Vieira *et al.*¹⁰⁸ relataram o primeiro caso de encefalite por WNV no Piauí, Brasil e defenderam a hipótese de uma endemia silenciosa (em níveis baixos) de WNV no Piauí¹⁰⁸. Até o momento, não houve outros casos em humanos com diagnóstico confirmado de WNV no país. A capacidade dos biomas brasileiros para proporcionar um nicho ecológico favorável à propagação de WNV permanece enigmático^{107,108,109,110}. Em 2018, Martins *et al.*, isolaram o WNV de um cavalo no Espírito Santo, sudeste do Brasil, mas não foi encontrado caso humano¹¹¹. As hipóteses de não haver casos humanos de WNV poderia estar relacionado com a circulação de outros flavivírus no país, como os vírus da dengue, febre amarela e zika, e outra possibilidade não confirmada pela análise filogenética, pode estar associada a mutações genômicas que permitiria menor virulência ao WNV¹¹¹.

Deve-se ressaltar que a interpretação dos resultados sorológicos para flavivírus exige atenção especial, devido à complexa combinação de reatividade cruzada, em que os anticorpos produzidos durante uma infecção normalmente reagem contra os antígenos de vários flavivírus. Esta reatividade cruzada é ainda maior durante infecções secundárias¹⁰⁴.

Atualmente, os vírus da dengue (DENV) e Zika vírus estão frequentemente envolvidos em grandes epidemias, sendo considerados os mais importantes flavivírus que circulam no Brasil. Por esse motivo, o diagnóstico laboratorial durante períodos epidêmicos é dirigido para estes vírus, que podem dificultar a detecção de outros flavivírus circulantes, incluindo o vírus da encefalite de Saint Louis (SLEV), que se encontra disperso silenciosamente nas Américas¹⁰⁵.

A encefalite viral causada por Alphavírus e Flavivírus podem ocasionar epilepsia, tremores, amnésia, demência, psicose maníaca, paralisia de Bell, paralisia de extremidades inferiores, de palato, de nervo ulnar, de nervo torácico longo, de nervo peroneal, síndrome de Reye, síndrome de Guillain-Barré, meningoencefalomielite e mononeuropatias, levando em consideração os fatores de risco como idade, doença primária associada e imunodeficiência^{33,112}.

A atividade do SLEV em equinos, e a possível co-circulação de outros flavivírus verificada no presente estudo confirmam as pesquisas que investigaram casos humanos de infecção pelo SLEV diagnosticadas no estado São Paulo, os quais apresentavam dengue como principal suspeita clínica⁸⁶.

O baixo número de casos humanos de infecção pelo SLEV se deve, provavelmente, à ocorrência de infecção inaparente, mas também pode ser resultado de uma subdetecção de casos clínicos devido à dificuldade em se realizar o diagnóstico diferencial das infecções SLEV em seres humanos, que pode ocorrer esporadicamente. A ausência de diagnóstico diferencial de rotina contribui para a falta de notificação. Portanto, estes resultados indicam a necessidade de amplo espectro de investigações clínico-epidemiológicos

durante os surtos de dengue, e deve ser realizada a vigilância ativa de circulação de arbovírus^{104,108}.

A prevalência de encefalites por herpesvírus foi de 5,0% em ambos os grupos, sendo que houve mais casos de EBV e HHV-6 (1,7% cada), CMV (0,8%), e HSV-1 e VZV (0,4% cada). Os pacientes que foram identificados com EBV foram observados em três crianças e um adulto; nos casos de HHV-6 estavam presente em três adultos e uma criança. Diferente ao reportado na literatura, em que a maior prevalência está primeiramente para o HSV-1, seguido pelo VZV^{37,55,56,57,58}. Bastos *et al.*³⁹, encontraram resultados semelhantes, em que a maior prevalência foi de EBV (22,4%), VZV (20,4%), CMV (18,4%) e HSV-1 e HSV-2 (4,1% cada), relatando que o grande número de infecções por EBV foi acima do esperado³⁹. Isso pode estar associado a reativação da infecção latente por EBV nos linfócitos B após a infecção primária, podendo causar doença do SNC³⁹.

A prevalência de enterovírus foi de 3,8%, em ambos os grupos, em que foram observados cinco casos em adultos (acima de 50 anos) e quatro casos em crianças (2 a 15 anos). Os enterovírus não pólio são mais frequentes em crianças, mas pode infectar os adultos, sendo que este fato está associado a baixa imunidade^{13,27,32,39}. Bastos *et al.*³⁹, encontraram resultados semelhantes, em que o EV foi identificado em 16 (32,6%) pacientes, sendo que a idade média era de 25,6 anos ($\geq 4-59$)³⁹.

Apesar da baixa prevalência observada nesse estudo, a detecção desse agente no estado de São Paulo é preocupante, tendo em vista a capacidade de causar grandes epidemias em centros urbanos.

A importância da identificação do agente etiológico para elucidação dos casos de encefalites virais permite, não apenas avaliar o prognóstico, mas principalmente qual a melhor terapia a ser administrada ao paciente, e com isso reduzir sequelas neurológicas graves.

6 CONCLUSÃO

Apesar de uma busca extensiva na elucidação das causas de encefalite viral, não foi possível encontrar nenhum agente etiológico na maioria dos casos com suspeita de encefalite na cidade de São Paulo. Isso pode estar associado ao volume reduzido de líquido que foi disponibilizado para o diagnóstico dos agentes virais e a baixa carga viral.

O monitoramento contínuo das encefalites causadas por arbovírus é essencial para o tratamento adequado, e para que as medidas sanitárias possam ser tomadas para impedir a mortalidade e morbidade causadas por esses agentes nas populações susceptíveis.

7 REFERÊNCIAS

1. Kim, K. Mechanisms of microbial traversal of the blood–brain barrier. *Nat Rev Microbiol.* 2008; 6: 625-634.
2. Gilden DH. Acute viral central nervous system diseases. *ACP Medicine.* 2008; 1-13.
3. Whitley R.J., Gnann J.W., Viral encephalitis: familiar infections and emerging pathogens. *The Lancet.* 2002; 359:507-514.
4. Kennedy PG. Viral encephalitis: causes, differential diagnosis and management. *J NeurolNeurosurg Psychiatry* 2004; Suppl 1: 110-115.
5. Wright WF, Pinto CN, Palisoc K, Baghli S. Viral (aseptic) meningitis: A review. *J NeurolSci.* 2019; 398: 176-183.
6. Machado, ABM, Haertel LM. *Neuroanatomia funcional.* 3ª ed. São Paulo: Atheneu; 2006. Tecido Nervoso; p. 19-83
7. Netter FH. *Atlas de anatomia humana.* 6ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2015. Meninges e Encéfalo; p. 101-116.
8. Junqueira LCU & Carneiro J. *Histologia Básica.* 12ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2008. Tecido Nervoso; p. 160-166.
9. Giovane RA, Lavender PD. Central Nervous System Infections. *Prim Care.* 2018; 45: 505-518.
10. Khasawneh AH, Garling RJ, Harris CA. Cerebrospinal fluid circulation: What do we know and how do we know it? *Brain Circ.* 2018; 4: 14-18.
11. Gnutzmann LV, Plewka J, Suldofski MT, Felisberto M, Nesi V. Análise dos valores de referência do líquido cefalorraquidiano. *RBAC.* 2016; 48: 189-97.
12. Brown PD, Davies SL, Speake T, Millar ID. Molecular mechanisms of cerebrospinal fluid production. *Neuroscience.* 2004; 129: 957-70.
13. Tuppeny M. Viral meningitis and encephalitis. *Crit Care NursClin North Am.* 2013; 25: 363-80.

14. Schmitt G, Parrott N, Prinssen E, Barrow P. The great barrier belief: The blood-brain barrier and considerations for juvenile toxicity studies. *Reprod Toxicol*. 2017; 72: 129-135.
15. Campos-Bedolla P, Walter FR, Veszeka S, Deli MA. Role of the blood-brain barrier in the nutrition of the central nervous system. *Arch Med Res*. 2014; 45: 610-38.
16. Palmer AM. The role of the blood-CNS barrier in CNS disorders and their treatment. *Neurobiol Dis*. 2010; 37: 3-12.
17. Abbott NJ, Patabendige AA, Dolman DE, Yusof SR, Begley DJ. Structure and function of the blood-brain barrier. *Neurobiol Dis*. 2010; 37: 13-25.
18. Daneman R, Prat A. The blood-brain barrier. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2015; 7:a020412.
19. Dong X. Current Strategies for Brain Drug Delivery. *Theranostics*. 2018; 8:1481-1493.
20. Choi YK & Kim KW. Blood-neural barrier: its diversity and coordinated cell-to-cell communication. *BMB Rep*. 2008; 41: 345-352.
21. Paolinelli R, Corada M, Orsenigo F, Dejana E. The molecular basis of the blood brain barrier differentiation and maintenance. Is it still a mystery? *Pharmacol Res*. 2011; 63: 165-71.
22. Christensen HL, Nguyen AT, Pedersen FD, Damkier HH. Na(+) dependent acid-base transporters in the choroid plexus; insights from slc4 and slc9 gene deletion studies. *Front Physiol*. 2013; 4: 304.
23. Rojas H, Ritter C, Pizzol FD. Mechanisms of dysfunction of the blood-brain barrier in critically ill patients: emphasis on the role of matrix metalloproteinases. *Rev Bras Ter Intensiva*. 2011; 23: 222-7.
24. Nassif X, Bourdoulous S, Eugène E, Couraud PO. How do extracellular pathogens cross the blood-brain barrier? *Trends Microbiol*. 2002; 10: 227-32.
25. Chang CY, Li JR, Ou YC, Lin SY, Wang YY, Chen WY, et al. Interplay of inflammatory gene expression in pericytes following Japanese encephalitis virus infection. *Brain Behav Immun*. 2017; 66: 230-243.
26. Kennedy PGE. Viral encephalitis. *J Neurol*. 2005; 252: 268–72.

27. Silva MT. Viral encephalitis. *Arq Neuro-Psiquiatr.* 2013; 71: 703–9.
28. Venkatesan A, Tunkel AR, Bloch KC, Laming AS, Sejvar J, Bitnun A, *et.al.* International Encephalitis Consortium. Case definitions, diagnostic algorithms, and priorities in encephalitis: consensus statement of the international encephalitis consortium. *Clin Infect Dis.* 2013; 57:1114-28.
29. Chen Z, Zhong D, Li G. The role of microglia in viral encephalitis: a review. *J Neuroinflammation.* 2019; 16: 76.
30. Téllez de Meneses M, Vila MT, Barbero Aguirre P, Montoya JF. Encefalitis virales en la infancia [Viral encephalitis in children]. *Medicina (B Aires).* 2013; 73 Suppl 1:83-92.
31. Costa BKI, Sato DK. Encefalite viral: uma revisão prática sobre abordagem diagnóstica e tratamento. *J. Pediatr.* 2020; 96 (Suppl1): 12-19.
32. Puccioni-Sohler M. Encefalite Viral. Capítulo 84. [citado 2020 Mar 24]. Disponível em: https://edisciplinas.usp.br/pluginfile.php/4178748/mod_resource/content/1/Encefalite%20Viral.pdf.
33. Tyler KL. Acute Viral Encephalitis. *N Engl J Med.* 2018; 379: 557-566.
34. Kennedy PGE, Quan PL, Lipkin WI. Viral Encephalitis of Unknown Cause: Current Perspective and Recent Advances. *Viruses.* 2017; 9: 138.
35. Solomon T, Hart IJ, Beeching NJ. Viral encephalitis: a clinician's guide. *Pract Neurol.* 2007; 7: 288-305.
36. Bale JF Jr. Virus and Immune-Mediated Encephalitides: Epidemiology, Diagnosis, Treatment, and Prevention. *Pediatr Neurol.* 2015; 53: 3-12.
37. Boucher A, Herrmann JL, Morand P, Buzelé R, Crabol Y, Stahl JP, *et.al.* Epidemiology of infectious encephalitis causes in 2016. *Med Mal Infect.* 2017; 47: 221-235.
38. Vasconcelos PFC, Travassos da Rosa APA, Pinheiro FP, Shope RE, Travassos da Rosa JFS, Rodrigues SG, *et al.* Arboviruses pathogenic for man in Brazil. In: Travassos da Rosa APA, Vasconcelos PFC, Travassos da Rosa JFS, editors. An overview of arbovirology in Brazil and neighbouring countries. CEJUP. 1998; 72.

39. Bastos MS, Lessa N, Naveca FG, Monte RL, Braga WS, Figueiredo LT, *et al.* Detection of Herpesvirus, Enterovirus, and Arbovirus infection in patients with suspected central nervous system viral infection in the Western Brazilian Amazon. *J Med Virol.* 2014; 86: 1522-7.
40. Figueiredo LTM. The Brazilian flaviviruses. *Microbes Infect.* 2000; 2:1643-9.
41. Figueiredo RMP, Naveca FG, Bastos MS, Melo MN, Viana SS, Mourão MPG, *et al.* Dengue Virus Type 4. *Emerg Infect Dis.* 2008; 14: 667-9.
42. Campos GS, Bandeira AC, Sardi SI. Zika virus outbreak, Bahia, Brazil. *Emerg Infect Dis.* 2015; 21:5.
43. Zanluca C, Melo VCA, Mosimann ALP, Santos GIV, Santos CND, Luz K. The first report of autochthonous transmission of Zika virus in Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2015; 110: 569-72.
44. Vasconcelos PFC. Doença pelo vírus zika: um novo problem emergente nas Américas. *Rev Pan Amaz Saude.* 2015; 6:9-10.
45. Linnen JM, Vinelli E, Sabino EC, Tobler LH, Hyland C, Lee TH, *et al.* Dengue viremia in blood donors from Honduras, Brazil, and Australia. *Transfusion.* 2008; 48: 1355-62.
46. Lima-Camara TN. Emerging arboviruses and public health challenges in Brazil. *Rev Saude Publica.* 2016; 50: 36.
47. Domingues RB, Teixeira AL. Management of acute viral encephalitis in Brazil. *Braz J Infect Dis.* 2009; 13: 433-439.
48. Kramer AH. Viral encephalitis in the ICU. *Crit Care Clin.* 2013; 29: 621-649.
49. Debiasi RL, Tyler KL. Molecular methods for diagnosis of viral encephalitis. *Clin Microbiol Rev.* 2004; 17: 903-25.
50. Lévêque N, Legoff J, Mengelle C, Mercier-Delarue S, N'guyen Y, Renois F, *et al.* Virological diagnosis of central nervous system infections by use of PCR coupled with mass spectrometry analysis of cerebrospinal fluid samples. *J Clin Microbiol.* 2014; 52: 212-7.
51. Liu Y, Duan C, Zhang C, Yang X, Zhao Y, Dong R, *et al.* Evaluation of a viral microarray based on simultaneous extraction and amplification of viral

- nucleotide acid for detecting human herpesviruses and enteroviruses. PLoSOne. 2015; 10: e0117626.
52. Korimbocus J, Scaramozzino N, Lacroix B, Crance JM, Garin D, Vernet G. DNA probe array for the simultaneous identification of herpesviruses, enteroviruses, and flaviviruses. J Clin Microbiol. 2005; 43: 3779-87.
  53. Chaudhuri A, Kennedy PG. Diagnosis and treatment of viral encephalitis. Postgrad Med J. 2002; 78: 575-583.
  54. Gendelman HE, Persidsky Y. Infections of the nervous system. Lancet Neurol. 2005; 4: 12–3.
  55. Gilden DH. Acute viral central nervous system diseases. ACP Medicine. 2008; 1–13.
  56. Lan K, Luo MH. Herpesviruses: epidemiology, pathogenesis, and interventions. Virol Sin. 2017; 32: 347-348.
  57. Grinde B. Herpesviruses: latency and reactivation - viral strategies and host response. J Oral Microbiol. 2013;5.
  58. Koyuncu OO, Hogue IB, Enquist LW. Virus infections in the nervous system. Cell Host Microbe. 2013; 13: 379-93.
  59. Majerciak V, Zheng ZM. (2018) Detection of Viral RNA Splicing in Diagnostic Virology. In: Tang YW., Stratton C. (eds) Advanced Techniques in Diagnostic Microbiology. Springer, Cham; 2018. [citado 2020 Mar 24]. Disponível em: https://doi.org/10.1007/978-3-319-95111-9_15.
  60. Venkatesan A, Murphy OC. Viral Encephalitis. Neurol Clin. 2018; 36:705-724.
  61. Grahn A, Studahl M. Varicella-zoster virus infections of the central nervous system – Prognosis, diagnostics and treatment. J Infect. 2015; 71: 281-93.
  62. Khalil MI, Sommer MH, Hay J, Ruyechan WT, Arvin AM. Varicella-zoster virus (VZV) origin of DNA replication oriS influences origin-dependent DNA replication and flanking gene transcription. Virology. 2015; 481: 179-86.
  63. Nagel MA, Jones D, Wyborny A. Varicella zoster virus vasculopathy: The expanding clinical spectrum and pathogenesis. J Neuroimmunol. 2017; 308: 112-117.

64. Shope TC. Chickenpox encephalitis and encephalopathy: evidence for differing pathogenesis. *Yale J Biol Med.* 1982; 55: 321-7.
65. Hoover K, Higginbotham K. Epstein Barr Virus (EBV). 2020 Jun 4. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2020 Jan–.
66. Martelius T, Lappalainen M, Palomäki M, Anttila VJ. Clinical characteristics of patients with Epstein Barr virus in cerebrospinal fluid. *BMC Infect Dis.* 2011; 11: 281.
67. Weinberg A, Li S, Palmer M, Tyler KL. Quantitative CSF PCR in Epstein-Barr virus infections of the central nervous system. *Ann Neurol.* 2002; 52: 543-8.
68. Doja A, Bitnun A, Ford Jones EL, Richardson S, Tellier R, Petric M, et al. Pediatric Epstein-Barr virus-associated encephalitis: 10-year review. *J Child Neurol.* 2006; 21: 384-91.
69. Gupta M, Shorman M. Cytomegalovirus. 2020 Jul 2. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2020 Jan–. PMID: 29083720.
70. de Matos, S. Citomegalovírus: uma revisão da patogenia, epidemiologia e diagnóstico da infecção. *Saúde.com.* 2011: 44-57.
71. Pantry SN, Medveczky PG. Latency, Integration, and Reactivation of Human Herpesvirus-6. *Viruses.* 2017; 9:194.
72. Ablashi D, Agut H, Alvarez-Lafuente R, Clark DA, Dewhurst S, DiLuca D, et al. Classification of HHV-6A and HHV-6B as distinct viruses. *Arch Virol.* 2014; 159: 863-70.
73. Thomasini RL, Martins JM, Parola DC, Bonon SHA, Boin IFSF, Leonardi LS et al. Detection of human herpesvirus-7 by qualitative nested-PCR: comparison between healthy individuals and liver transplant recipients. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 2008; 41: 556-559.
74. Pohl-Koppe A, Blay M, Jäger G, Weiss M. Human herpes virus type 7 DNA in the cerebrospinal fluid of children with central nervous system diseases. *Eur J Pediatr.* 2001; 160: 351-8.
75. Parra M, Alcala A, Amoros C, Baeza A, Galiana A, Tarragó D, et al. Encefalite associada à infecção por herpesvírus humano-7 em um adulto imunocompetente. *Virol J.* 2017; 14: 97.

76. de Souza Costa MC, Siqueira Maia LM, Costa de Souza V, Gonzaga AM, Correa de Azevedo V, Ramos Martins L, *et al.* Arbovirus investigation in patients from Mato Grosso during Zika and Chikungunya virus introduction in Brazil, 2015-2016. *Acta Trop.* 2019; 190: 395-402.
77. Beckham JD, Tyler KL. Infecções por Arbovírus. *Continuum* (Minneapolis). 2015; 21: 1599-611.
78. Salimi H, Cain MD, Klein RS. Arbovírus Encefalíticos: Emergência, Apresentação Clínica e Neuropatogênese. *Neurotherapeutics.* 2016; 13: 514-34.
79. Lopes N, Nozawa C, Linhares REC. Características gerais e epidemiologia dos arbovírus emergentes no Brasil. *Rev Pan-Amaz Saude.* 2014; 5: 55-64.
80. Rust RS. Human arboviral encephalitis. *Semin Pediatr Neurol.* 2012; 19:130-51.
81. Figueiredo LTM. Emergent arboviruses in Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2007; 40: 224-229.
82. Swanson PA 2nd, McGavern DB. Doenças virais do sistema nervoso central. *Curr Opin Virol.* 2015; 11: 44-54.
83. de Figueiredo GG, Amarilla AA, de Souza WM, Fumagalli MJ, de Figueiredo MLG, Szabó MPJ, *et al.* Genetic characterization of Cacipacoré virus from ticks collected in São Paulo State, Brazil. *Arch Virol.* 2017; 162: 1783-1786.
84. Soares CN, Cabral-Castro MJ, Peralta JM, de Freitas MR, Zalis M, Puccioni-Sohler M. Review of the etiologies of viral meningitis and encephalitis in a dengue endemic region. *J Neurol Sci.* 2011; 303: 75-9.
85. Diaz LA, Ré V, Almirón WR, Farías A, Vázquez A, Sanchez-Seco MP, *et al.* Genotype III Saint Louis encephalitis virus outbreak, Argentina, 2005. *Emerg Infect Dis.* 2006; 12: 1752-4.
86. Spisanti L, Farias A, Aguilar J, Díaz MP, Ghisiglieri S, Bustos MA, *et al.* Risk factors associated with St. Louis encephalitis seroprevalence in two populations from Córdoba, Argentina. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2007; 101:1248-1252.
87. Rocco IM, Santos CLS, Bisordi I, Petrella SMCN, Pereira LE, Souza RP, *et al.* St. Louis encephalitis virus: first isolation from a human in São Paulo state, Brazil. *Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo.* 2005; 47: 281-285.

88. Santos CLS, Sallum MAM, Franco HM, Oshiro FM, Rocco IM. Genetic characterization of St Louis encephalitis virus isolated from human in São Paulo, Brasil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2006; 101: 57-63.
89. Medeiros DB, Nunes MR, Vasconcelos PF, Chang GJ, Kuno G. Complete genome characterization of Rocio virus (Flavivirus: Flaviviridae), a Brazilian flavivirus isolated from a fatal case of encephalitis during an epidemic in Sao Paulo state. *J Gen Virol*. 2007; 88: 2237-46.
90. Lopes OS, Coimbra TLM, Saccheta IA, Calisher CH. Emergence of a new arbovirus disease in Brazil. Isolation and characterization of the etiologic agent Rocio virus. *American Journal of Epidemiology* 1978; 107: 444-449.
91. Iverson LB, Tiriba AC. Encefalite por arbovírus Rocio. In: Veronesi R, Focaccia R (eds). *Tratado de Infectologia*, Atheneu, São Paulo; 1997. p: 233-239.
92. Enterovírus in *Dicionário infopédia de Termos Médicos [em linha]*. Porto: Porto Editora; 2003-2018. [citado 2020 Mar 24]. Disponível em: <https://www.infopedia.pt/dicionarios/termos-medicos/enterovirus>
93. Bronzoni RVM, Baleotti FG, Nogueira RMR, Nunes M, Figueiredo LTM. Duplex reverse transcription-PCR followed by nested PCR assays for detection of Brazilian Alphaviruses and Flaviviruses. *J Clin Microbiol*. 2005; 43: 696-702.
94. Callahan JD, Wu SJ, Dion-Schultz A, Mangold BE, Peruski LF, Watts DM, *et al*. Development and evaluation of serotype- and group-specific fluorogenic reverse transcriptase PCR (TaqMan) assays for dengue virus. *J Clin Microbiol*. 2001; 39: 4119-24.
95. Johnson BW, Chambers TV, Crabtree MB, Guirakhoo F, Monath TP, Miller BR. Analysis of the replication kinetics of the ChimeriVax-DEN 1, 2, 3, 4 tetravalent virus mixture in *Aedes aegypti* by real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *Am J Trop Med Hyg*. 2004; 70: 89-97.
96. Mantel N, Aguirre M, Gulia S, Girerd-Chambaz Y, Colombani S, Moste C, *et al*. Standardized quantitative RT-PCR assays for quantitation of yellow fever and chimeric yellow fever-dengue vaccines. *J Virol Methods*. 2008; 151: 40-6.
97. Briese T, Glass WG, Lipkin WI. Detection of West Nile virus sequences in cerebrospinal fluid. *Lancet*. 2000; 355: 1614-5.
98. Volle R, Nourrisson C, Mirand A, Regagnon C, Chambon M, Henquell C, *et al*. Quantitative real-time RT-PCR assay for research studies on enterovirus infections in the central nervous system. *J Virol Methods*. 2012; 185: 142-8.

99. Barcellos C, Monteiro AMV, Corvalán C, Gurgel HC, Carvalho MS, Artaxo P, *et al.* Mudanças climáticas e ambientais e as doenças infecciosas: cenários e incertezas para o Brasil. *Epidemiol Serv Saúde*. 2009; 18: 285-304.
100. Jaijakul S, Salazar L, Wootton SH, Aguilera E, Hasbun R. The clinical significance of neutrophilic pleocytosis in cerebrospinal fluid in patients with viral central nervous system infections. *Int J Infect Dis*. 2017; 59: 77- 81.
101. Kaewpoowat Q, Salazar L, Aguilera E, Wootton SH, Hasbun R. Herpes simplex and varicella zoster CNS infections: clinical presentations, treatments and outcomes. *Infection*. 2016; 44: 337-45.
102. Bolis V, Karadedos C, Chiotis I, Chaliasos N, Tsabouri S. Manifestações atípicas do vírus de Epstein-Barr em crianças: um desafio diagnóstico. *J. Pediatr*. 2016; 92: 113-121.
103. Souza MA, Passos AM, Treitinger A, Spada C. Seroprevalence of cytomegalovirus antibodies in blood donors in southern, Brazil. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop*. 2010; 43: 359-361.
104. De Souza Lopes O, de Abreu Sachetta L, Coimbra TL, Pereira LE. Isolation of St. Louis encephalitis virus in south Brazil. *Am J Trop Med Hyg*. 1979; 28: 583-5.
105. Rodrigues SG, Oliva OP, Araújo FAA, Martins LC, Chiang JO, Henriques DF *et al.* Epidemiologia do vírus da encefalite de Saint Louis na Amazônia brasileira e no Estado de Mato Grosso do Sul, Brasil: elevada prevalência de anticorpos em equinos. *Pan-Amaz Saude*. 2010; 1: 81-6.
106. Mondini A, Bronzoni R, Cardeal I, Santos T, Lázaro E, Nunes S, *et al.* Simultaneous infection by DENV-3 and SLEV in Brazil. *J Clin Virol*. 2007; 40: 84-6.
107. Heinen LB, Zuchi N, Serra OP, Cardoso BF, Gondim BH, Dos Santos MA, *et al.* Saint Louis encephalitis virus in Mato Grosso, central-western Brazil. *Inst Med Trop São Paulo*. 2015; 57: 215-20.
108. Vieira MACS, Romano APM, Borba AS, Silva EVP, Chiang JO, Eulálio KD *et al.* Case report: West Nile Virus Encephalitis: The first human case recorded in Brazil. *Am J Trop Med Hyg*. 2015; 93: 377-9.
109. Gubler DJ. The global emergence/resurgence of arboviral diseases as public health problems. *Arch Med Res*. 2002; 33: 330-42.

110. Vieira MACS, Aguiar AAX, Borba AS, Guimarães HCL, Eulálio KD, Albuquerque-Neto LL. West Nile Fever in Brazil: sporadic case, silent endemic disease or epidemic in its initial stages? *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*. 2015; 57: 276.
111. Fujita DM, Salvador FS, Nali LHDS. The silent spread of West Nile virus in Brazil: non-human positive case in a beach tourist destination-Espírito Santo. *J Travel Med*. 2018; 25.
112. Figueiredo LTM. West Nile virus infection in Brazil. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 2019; 52: e20190226.
113. Ferreira MLB, Cavalcanti CG, Coelho CA, Mesquita SD. Manifestações neurológicas de dengue: estudo de 41 casos. *Arq. Neuro-Psiquiatr.* 2005; 63: 488-93.

APÊNDICE A – QUADRO 1: DADOS DO GRUPO 1

Quadro 1: Dados do Grupo 1.

ID	Sexo	Idade	BAAR	Fungos	Cryptococcus	Isolamento Bacteriano	Cultura Aerobica Aerobic culture	Mycobacteria	Características Físicas	> 10 cells (%)	Proteína >10 mg/dL	Glicose>= 50 mg/dL	Eritrócitos 1-99 cells/mm3	D-RT-PCR (Flavivirus)	CLART-Enterpex	Real time PCR EV	D-RT-PCR (Alphavirus)	Real time DENV	Real time PCR YFV	Real time PCR WNV
4	F	64	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Claro e incolor	Sim	Sim	Sim	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
5	M	65	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Ligeiramente turvo ou turvo	Sim	Sim	Sim	Sim	ND	ND	EV-CT31	ND	ND	ND	ND
6	M	35	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Ligeiramente turvo ou turvo	Sim	Sim	Sim	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
10	M	65	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Claro e Xantocrômico	Sim	Sim	Sim	Sim	ND	ND	EV-CT27	ND	ND	ND	ND
12	F	40	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Claro e incolor	Sim	Sim	Sim	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
14	F	64	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Claro e incolor	Sim	Sim	Sim	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
19	M	60	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Claro e incolor	Sim	Sim	Sim	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
20	F	57	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Claro e incolor	Sim	Sim	Sim	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
22	F	66	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Claro e incolor	Sim	Sim	Sim	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
23	F	60	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Claro e incolor	Sim	Sim	Sim	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
25	M	34	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Claro e incolor	Sim	Sim	Sim	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
28	M	80	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Claro e incolor	Sim	Sim	Sim	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
29	M	39	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Claro e incolor	Sim	Sim	Sim	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
31	F	30	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Claro e incolor	Sim	Sim	Sim	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
32	F	39	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Claro e incolor	Sim	Sim	Sim	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
34	M	35	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Claro e incolor	Sim	Sim	Sim	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
35	M	54	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Claro e incolor	Sim	Sim	Sim	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
36	F	53	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Claro e incolor	Sim	Sim	Sim	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
37	M	52	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Claro e incolor	Sim	Sim	Sim	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
38	F	40	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Claro e incolor	Sim	Sim	Sim	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
39	M	75	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Claro e Xantocrômico	Sim	Sim	Sim	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
40	F	38	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Claro e incolor	Sim	Sim	Sim	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
41	M	96	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Claro e incolor	Sim	Sim	Sim	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
42	F	63	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Claro e Xantocrômico	Sim	Sim	Sim	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
44	M	56	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Claro e incolor	Sim	Sim	Sim	Sim	ND	CMV	ND	ND	ND	ND	ND
48	F	65	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Claro e incolor	Sim	Sim	Sim	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
49	F	9	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Claro e incolor	Sim	Sim	Sim	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
51	M	39	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Claro e incolor	Sim	Sim	Sim	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
52	F	11	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Claro e incolor	Sim	Sim	Sim	Sim	ND	ND	EV-CT30	ND	ND	ND	ND
53	M	43	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Claro e incolor	Sim	Sim	Sim	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
55	F	30	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Claro e incolor	Sim	Sim	Sim	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
56	M	75	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Claro e incolor	Sim	Sim	Sim	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
63	F	69	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Claro e incolor	Sim	Sim	Sim	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
64	F	41	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Claro e incolor	Sim	Sim	Sim	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
66	F	41	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Claro e incolor	Sim	Sim	Sim	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
67	M	74	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Claro e incolor	Sim	Sim	Sim	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
68	M	1	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Claro e incolor	Sim	Sim	Sim	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
70	F	54	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Claro e incolor	Sim	Sim	Sim	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
71	F	78	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Claro e incolor	Sim	Sim	Sim	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
74	F	31	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Claro e incolor	Sim	Sim	Sim	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
75	F	78	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Claro e incolor	Sim	Sim	Sim	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
76	F	30	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Claro e incolor	Sim	Sim	Sim	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
77	F	50	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Claro e incolor	Sim	Sim	Sim	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
78	M	32	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Claro e incolor	Sim	Sim	Sim	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
81	F	54	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Claro e incolor	Sim	Sim	Sim	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
82	M	41	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Claro e incolor	Sim	Sim	Sim	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
83	F	45	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Claro e incolor	Sim	Sim	Sim	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
84	M	35	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Claro e Xantocrômico	Sim	Sim	Sim	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
85	M	46	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Claro e incolor	Sim	Sim	Sim	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
87	M	2	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Ligeiramente turvo ou turvo	Sim	Sim	Sim	Sim	ND	EV	EV-CT25	ND	ND	ND	ND
91	M	41	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Claro e incolor	Sim	Sim	Sim	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
93	M	81	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Claro e incolor	Sim	Sim	Sim	Sim	DENV4	ND	ND	ND	DENV4 - CT29	ND	ND
94	M	21	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Claro e incolor	Sim	Sim	Sim	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
95	F	46	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Claro e incolor	Sim	Sim	Sim	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
96	F	68	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Claro e incolor	Sim	Sim	Sim	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
98	M	50	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Claro e incolor	Sim	Sim	Sim	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
99	F	45	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Claro e incolor	Sim	Sim	Sim	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
100	F	62	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Claro e incolor	Sim	Sim	Sim	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
101	F	59	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Claro e incolor	Sim	Sim	Sim	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
102	M	6	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Claro e incolor	Sim	Sim	Sim	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
103	F	58	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Claro e Xantocrômico	Sim	Sim	Sim	Sim	ND	HHV-6	ND	ND	ND	ND	ND
104	M	88	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Claro e incolor	Sim	Sim	Sim	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

ID	Sexo	Idade	BAAR	Fungos	Cryptococcus	Isolamento Bacteriano	Cultura Aerobica Aerobic culture	Mycobacteria	Características Físicas	> 10 cells (%)	Proteína >10 mg/dL	Glicose >=50 mg/dL	Eritrócitos 1-99 cells/mm3	D-RT-PCR (Flavivirus)	CLART-Enterpex	Real time PCR EV	D-RT-PCR (Alphavirus)	Real time DENV	Real time PCR YFV	Real time PCR WNV
108	F	11	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Claro e incolor	Sim	Sim	Sim	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
109	F	33	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Claro e incolor	Sim	Sim	Sim	Sim	SLEV	ND	ND	ND	ND	ND	ND
111	M	34	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Claro e incolor	Sim	Sim	Sim	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
112	F	43	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Claro e incolor	Sim	Sim	Sim	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
116	F	61	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Claro e incolor	Sim	Sim	Sim	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
118	F	61	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Claro e incolor	Sim	Sim	Sim	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
121	M	53	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Claro e incolor	Sim	Sim	Sim	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
122	M	27	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Claro e incolor	Sim	Sim	Sim	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
127	F	7	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Claro e incolor	Sim	Sim	Sim	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
128	M	87	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Claro e incolor	Sim	Sim	Sim	Sim	ND	ND	EV-CT29	ND	ND	ND	ND
131	M	31	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Claro e incolor	Sim	Sim	Sim	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
134	M	1	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Claro e incolor	Sim	Sim	Sim	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
138	F	8	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Claro e incolor	Sim	Sim	Sim	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
140	M	39	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Claro e incolor	Sim	Sim	Sim	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
143	M	30	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Claro e incolor	Sim	Sim	Sim	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
144	F	40	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Claro e incolor	Sim	Sim	Sim	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
145	M	81	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Claro e incolor	Sim	Sim	Sim	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
148	M	64	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Claro e incolor	Sim	Sim	Sim	Sim	ND	EV	ND	ND	ND	ND	ND
151	F	47	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Claro e incolor	Sim	Sim	Sim	Sim	DENV3	ND	ND	ND	DENV3 - CT3	ND	ND
152	F	61	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Claro e incolor	Sim	Sim	Sim	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
154	M	24	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Claro e incolor	Sim	Sim	Sim	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
156	F	31	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Claro e incolor	Sim	Sim	Sim	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
158	F	4	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Claro e incolor	Sim	Sim	Sim	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
162	M	50	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Claro e incolor	Sim	Sim	Sim	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
163	F	40	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Claro e incolor	Sim	Sim	Sim	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
167	M	49	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Claro e incolor	Sim	Sim	Sim	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
168	F	58	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Claro e incolor	Sim	Sim	Sim	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
169	M	42	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Claro e incolor	Sim	Sim	Sim	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
171	M	27	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Claro e incolor	Sim	Sim	Sim	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
172	M	14	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Claro e incolor	Sim	Sim	Sim	Sim	ND	EV / HHV-6	ND	ND	ND	ND	ND
173	M	9	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Claro e incolor	Sim	Sim	Sim	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
178	F	23	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Claro e incolor	Sim	Sim	Sim	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
180	M	43	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Claro e incolor	Sim	Sim	Sim	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
184	M	35	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Claro e incolor	Sim	Sim	Sim	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
185	M	41	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Claro e incolor	Sim	Sim	Sim	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
186	M	31	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Claro e incolor	Sim	Sim	Sim	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
188	F	61	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Claro e incolor	Sim	Sim	Sim	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
189	M	54	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Claro e incolor	Sim	Sim	Sim	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
191	M	78	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Claro e incolor	Sim	Sim	Sim	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
192	F	29	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Claro e incolor	Sim	Sim	Sim	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
193	M	62	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Claro e incolor	Sim	Sim	Sim	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
194	M	32	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Claro e incolor	Sim	Sim	Sim	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
195	F	61	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Claro e incolor	Sim	Sim	Sim	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
198	M	66	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Claro e incolor	Sim	Sim	Sim	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
202	M	32	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Claro e incolor	Sim	Sim	Sim	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
207	F	36	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Claro e incolor	Sim	Sim	Sim	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
209	M	18	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Claro e incolor	Sim	Sim	Sim	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
212	M	45	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Claro e incolor	Sim	Sim	Sim	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
213	F	30	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Claro e incolor	Sim	Sim	Sim	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
215	F	32	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Claro e incolor	Sim	Sim	Sim	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
217	F	60	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Claro e incolor	Sim	Sim	Sim	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

ID	Sexo	Idade	BAAR	Fungos	Cryptococcus	Isolamento Bacteriano	Cultura Aerobica Aerobic culture	Mycobacteria	Características Físicas	> 10 cells (%)	Proteína >10 mg/dL	Glicose >=50 mg/dL	Eritrócitos 1-99 cells/mm3	D-RT-PCR (Flavivirus)	CLART-Enterpex	Real time PCR EV	D-RT-PCR (Alphavirus)	Real time DENV	Real time PCR YFV	Real time PCR WNV
219	M	63	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Ligeiramente Xantocrômico	Sim	Sim	Sim	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
220	F	53	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Claro e incolor	Sim	Sim	Sim	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
222	F	39	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Claro e incolor	Sim	Sim	Sim	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
226	M	32	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Claro e incolor	Sim	Sim	Sim	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
229	M	51	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Claro e incolor	Sim	Sim	Sim	Sim	ND	HHV-6	ND	ND	ND	ND	ND
233	F	26	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Claro e incolor	Sim	Sim	Sim	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
234	F	83	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Claro e incolor	Sim	Sim	Sim	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
235	F	58	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Claro e incolor	Sim	Sim	Sim	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
237	M	31	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Claro e incolor	Sim	Sim	Sim	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
240	M	63	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Ligeiramente turvo ou turvo	Sim	Sim	Sim	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
241	M	57	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Claro e incolor	Sim	Sim	Sim	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
244	M	31	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Claro e incolor	Sim	Sim	Sim	Sim	ND	EBV	ND	ND	ND	ND	ND
245	M	87	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Claro e incolor	Sim	Sim	Sim	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
246	F	41	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Claro e incolor	Sim	Sim	Sim	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
247	F	41	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Claro e incolor	Sim	Sim	Sim	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
248	F	45	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Claro e incolor	Sim	Sim	Sim	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
249	F	38	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Claro e incolor	Sim	Sim	Sim	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
250	M	27	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Claro e incolor	Sim	Sim	Sim	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
251	F	36	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Claro e incolor	Sim	Sim	Sim	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
253	F	28	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Claro e incolor	Sim	Sim	Sim	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
256	F	31	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Claro e incolor	Sim	Sim	Sim	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
257	F	14	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Claro e incolor	Sim	Sim	Sim	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
258	F	75	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Claro e incolor	Sim	Sim	Sim	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
259	M	20	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Claro e Xantocrômico	Sim	Sim	Sim	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
262	F	40	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Claro e incolor	Sim	Sim	Sim	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
284	F	82	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Claro e incolor	Sim	Sim	Sim	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
288	M	66	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Claro e incolor	Sim	Sim	Sim	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
289	M	82	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Claro e incolor	Sim	Sim	Sim	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
290	F	16	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Claro e incolor	Sim	Sim	Sim	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
291	F	20	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Claro e incolor	Sim	Sim	Sim	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
292	F	60	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Claro e incolor	Sim	Sim	Sim	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
294	F	9	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Claro e incolor	Sim	Sim	Sim	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
297	F	31	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Claro e incolor	Sim	Sim	Sim	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
298	F	43	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Claro e incolor	Sim	Sim	Sim	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
301	M	42	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Claro e incolor	Sim	Sim	Sim	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
303	F	28	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Claro e incolor	Sim	Sim	Sim	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
305	M	81	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Claro e incolor	Sim	Sim	Sim	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
306	F	38	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Claro e incolor	Sim	Sim	Sim	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
307	M	53	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Ligeiramente turvo ou turvo	Sim	Sim	Sim	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
309	M	69	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Claro e incolor	Sim	Sim	Sim	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
310	F	46	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Claro e incolor	Sim	Sim	Sim	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
312	F	19	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Claro e incolor	Sim	Sim	Sim	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
314	F	81	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Claro e incolor	Sim	Sim	Sim	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
316	M	34	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Claro e incolor	Sim	Sim	Sim	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
319	M	28	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Claro e incolor	Sim	Sim	Sim	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
321	M	57	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Claro e Xantocrômico	Sim	Sim	Sim	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
323	M	60	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Claro e incolor	Sim	Sim	Sim	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
325	M	85	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Ligeiramente turvo ou turvo	Sim	Sim	Sim	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
326	F	77	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Claro e incolor	Sim	Sim	Sim	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
327	F	90	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Claro e incolor	Sim	Sim	Sim	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
328	M	58	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Claro e incolor	Sim	Sim	Sim	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
330	M	37	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Claro e Xantocrômico	Sim	Sim	Sim	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
334	F	29	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Claro e incolor	Sim	Sim	Sim	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
335	M	2	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Turvo	Sim	Sim	Sim	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
336	F	53	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Claro e incolor	Sim	Sim	Sim	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
337	F	71	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Claro e incolor	Sim	Sim	Sim	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
339	F	21	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Claro e incolor	Sim	Sim	Sim	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

ID	Sexo	Idade	BAAR	Fungos	Cryptococcus	Isolamento Bacteriano	Cultura Aerobica Aerobic culture	Mycobacteria	Características Físicas	> 10 cells (%)	Proteína >10 mg/dL	Glicose >=50 mg/dL	Eritrócitos 1-99 cells/mm3	D-RT-PCR (Flavivirus)	CLART-Enterpex	Real time PCR EV	D-RT-PCR (Alphavirus)	Real time DENV	Real time PCR YFV	Real time PCR WNV
339	F	21	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Claro e incolor	Sim	Sim	Sim	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
342	F	63	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Ligeiramente turvo ou turvo	Sim	Sim	Sim	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
343	F	21	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Claro e incolor	Sim	Sim	Sim	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
344	M	24	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Claro e incolor	Sim	Sim	Sim	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
349	F	54	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Claro e incolor	Sim	Sim	Sim	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
353	F	11	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Claro e incolor	Sim	Sim	Sim	Sim	ND	EBV	ND	ND	ND	ND	ND
355	M	31	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Claro e incolor	Sim	Sim	Sim	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
359	F	28	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Claro e incolor	Sim	Sim	Sim	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
362	M	67	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Claro e incolor	Sim	Sim	Sim	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
363	M	36	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Ligeiramente hemorrágico	Sim	Sim	Sim	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
367	F	76	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Claro e incolor	Sim	Sim	Sim	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
368	F	85	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Claro e incolor	Sim	Sim	Sim	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
369	F	48	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Claro e incolor	Sim	Sim	Sim	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
371	F	71	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Claro e incolor	Sim	Sim	Sim	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
375	F	54	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Claro e incolor	Sim	Sim	Sim	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
378	F	49	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Claro e incolor	Sim	Sim	Sim	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
381	M	2	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Claro e Xantocrômico	Sim	Sim	Sim	Sim	ND	EBV	ND	ND	ND	ND	ND
382	M	31	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Claro e incolor	Sim	Sim	Sim	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
384	M	78	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Claro e incolor	Sim	Sim	Sim	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
386	F	60	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Claro e incolor	Sim	Sim	Sim	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
387	M	1	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Claro e incolor	Sim	Sim	Sim	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
393	F	33	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Claro e incolor	Sim	Sim	Sim	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
394	F	58	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Claro e incolor	Sim	Sim	Sim	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
397	M	36	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Claro e incolor	Sim	Sim	Sim	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
398	F	24	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Claro e incolor	Sim	Sim	Sim	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
404	F	49	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Claro e incolor	Sim	Sim	Sim	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
406	F	49	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Claro e incolor	Sim	Sim	Sim	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
408	M	91	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Claro e incolor	Sim	Sim	Sim	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
409	M	38	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Claro e incolor	Sim	Sim	Sim	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
413	M	23	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Claro e incolor	Sim	Sim	Sim	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
414	F	46	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Ligeiramente hemorrágico	Sim	Sim	Sim	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
416	M	51	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Claro e incolor	Sim	Sim	Sim	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
426	M	66	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Claro e incolor	Sim	Sim	Sim	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
428	F	54	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Turbid or cloudy	Sim	Sim	Sim	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
430	F	62	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Claro e incolor	Sim	Sim	Sim	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
432	F	54	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Ligeiramente turvo ou turvo	Sim	Sim	Sim	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
435	F	34	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Claro e incolor	Sim	Sim	Sim	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
438	M	22	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Ligeiramente hemorrágico	Sim	Sim	Sim	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
442	F	4	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Claro e incolor	Sim	Sim	Sim	Sim	ND	EBV	ND	ND	ND	ND	ND
447	F	56	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Claro e incolor	Sim	Sim	Sim	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
449	F	21	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Claro e incolor	Sim	Sim	Sim	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
451	M	6	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Ligeiramente turvo ou turvo	Sim	Sim	Sim	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
453	M	55	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Claro e incolor	Sim	Sim	Sim	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
454	M	21	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Claro e incolor	Sim	Sim	Sim	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
456	F	63	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Ligeiramente turvo ou turvo	Sim	Sim	Sim	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
457	F	80	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Claro e incolor	Sim	Sim	Sim	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
458	F	33	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Claro e incolor	Sim	Sim	Sim	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
461	F	69	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Claro e incolor	Sim	Sim	Sim	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
463	M	17	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Ligeiramente Xantocrômico	Sim	Sim	Sim	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
464	M	70	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Claro e incolor	Sim	Sim	Sim	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
468	F	63	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Ligeiramente turvo ou turvo	Sim	Sim	Sim	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

ID	Sexo	Idade	BAAR	Fungos	Cryptococcus	Isolamento Bacteriano	Cultura Aerobica Aerobic culture	Mycobacteria	Características Físicas	> 10 cells (%)	Proteína >10 mg/dL	Glicose >=50 mg/dL	Eritrócitos 1-99 cells/mm3	D-RT-PCR (Flavivirus)	CLART-Enterpex	Real time PCR EV	D-RT-PCR (Alphavirus)	Real time DENV	Real time PCR YFV	Real time PCR WNV
471	F	23	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Claro e incolor	Sim	Sim	Sim	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
472	F	19	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Claro e incolor	Sim	Sim	Sim	Sim	ND	HSV-1	ND	ND	ND	ND	ND
473	F	46	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Ligeiramente turvo ou turvo	Sim	Sim	Sim	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
474	F	26	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Claro e incolor	Sim	Sim	Sim	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
475	M	20	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Claro e incolor	Sim	Sim	Sim	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
478	F	23	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Claro e incolor	Sim	Sim	Sim	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
482	F	28	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Claro e incolor	Sim	Sim	Sim	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
484	F	51	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Claro e incolor	Sim	Sim	Sim	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
485	F	33	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Claro e incolor	Sim	Sim	Sim	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
488	F	31	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Ligeiramente turvo ou turvo	Sim	Sim	Sim	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
489	F	38	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Claro e incolor	Sim	Sim	Sim	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
491	F	64	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Claro e incolor	Sim	Sim	Sim	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
493	F	33	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Claro e incolor	Sim	Sim	Sim	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
495	F	18	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Claro e incolor	Sim	Sim	Sim	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

Legenda: NEG: Negativo

F: feminino

M: masculino

EV: enterovirus

DENV: vírus da dengue

D-RT-PCR: Transcrição reversa duplex-PCR

PCR em tempo real

SLEV: vírus Saint Louis encephalitis

HSV-1: Herpes Simplex virus tipo 1

EBV: vírus Epstein-Barr

CMV: Citomegalovírus

HHV-6: herpesvirus humano 6

VZV: vírus Varicela zoster

ND: não detectável

APÊNDICE B – QUADRO 2: DADOS DO GRUPO 2

Quadro 2: Dados do Grupo 2.

ID	Sexo	Idade	BAAR	Fungos	Cryptococcus	Isolamento Bacteriano	Cultura Aeróbica Aerobic culture	Mycobacteria	Características Físicas	> 10 cells (%)	Proteína >10 mg/dL	Glicose >=50 mg/dL	Eritrócitos 1-99 cells/mm3	D-RT-PCR (Flavivirus)	CLART-Enterpex	Real time PCR EV	D-RT-PCR (Alphavirus)	Real time DENV	Real time PCR YFV	Real time PCR WNV
1	M	33	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Claro e incolor	Não	Sim	Sim	Não	ND	VZV	ND	ND	ND	ND	ND
2	F	49	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Claro e Xantocrômico	Sim	Não	Não	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
3	M	33	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Turvo	Sim	Não	Sim	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
7	M	38	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Ligeiramente hemorrágico	Sim	Não	Sim	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
8	M	55	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Ligeiramente hemorrágico	Sim	Não	Sim	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
9	M	58	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Claro e Xantocrômico	Sim	Não	Sim	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
11	M	65	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Ligeiramente hemorrágico	Sim	Não	Sim	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
13	M	30	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Ligeiramente hemorrágico	Sim	Não	Sim	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
15	M	67	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Claro e incolor	Sim	Não	Não	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
16	M	23	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Claro e incolor	Não	Não	Sim	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
17	F	59	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Claro e incolor	Não	Não	Sim	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
18	F	57	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Claro e Xantocrômico	Sim	Não	Não	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
21	F	56	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Turvo	Sim	Não	Não	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
24	M	47	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Claro e incolor	Não	Não	Sim	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
26	M	32	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Hemorrágico	Sim	Não	Sim	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
27	M	32	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Hemorrágico	Sim	Não	Sim	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
30	F	60	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Claro e incolor	Não	Não	Sim	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
33	F	22	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Claro e incolor	Sim	Não	Não	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
43	M	38	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Claro e incolor	Não	Não	Sim	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
45	F	58	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Claro e incolor	Sim	Não	Não	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
46	M	60	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Claro e incolor	Não	Não	Sim	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
47	F	60	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Claro e incolor	Não	Não	Sim	Não	ND	HHV-6	ND	ND	ND	ND	ND
50	M	62	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Claro e incolor	Sim	Não	Sim	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
54	F	52	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Claro e incolor	Sim	Não	Sim	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
57	F	58	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Claro e Xantocrômico	Sim	Não	Não	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
58	F	38	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Claro e incolor	Sim	Não	Sim	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
59	M	44	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Claro e incolor	Não	Não	Sim	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
60	F	59	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Claro e incolor	Não	Não	Sim	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
61	M	37	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Hemorrágico	Sim	Não	Sim	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
62	M	24	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Claro e incolor	Não	Não	Sim	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
65	F	50	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Claro e incolor	Não	Não	Sim	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
69	M	65	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Claro e Xantocrômico	Sim	Não	Sim	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
72	F	15	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Claro e incolor	Sim	Não	Sim	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
73	M	78	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Claro e incolor	Sim	Não	Não	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
79	M	73	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Claro e incolor	Sim	Não	Não	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
80	F	41	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Claro e incolor	Não	Sim	Sim	Não	SLEV	ND	ND	ND	ND	ND	ND
86	F	42	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Hemorrágico	Não	Não	Sim	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
88	F	78	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Claro e incolor	Não	Não	Sim	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
89	M	38	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Claro e Xantocrômico	Sim	Não	Não	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
90	F	74	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Claro e Xantocrômico	Sim	Não	Sim	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
92	M	25	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Claro e Xantocrômico	Sim	Não	Sim	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
97	F	15	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Claro e incolor	Não	Sim	Não	Sim	ND	EV	ND	ND	ND	ND	ND
105	M	36	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Claro e incolor	Sim	Não	Sim	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
106	F	50	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Claro e incolor	Sim	Não	Sim	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
107	M	39	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Claro e incolor	Sim	Não	Sim	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
110	M	1	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Claro e Xantocrômico	Sim	Não	Não	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
113	M	51	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Ligeiramente turvo ou turvo	Sim	Sim	Não	Não	ND	EV	ND	ND	ND	ND	ND
114	M	51	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Claro e incolor	Sim	Não	Sim	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
115	M	3	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Claro e incolor	Sim	Sim	Não	Sim	ND	CMV	ND	ND	ND	ND	ND
117	F	17	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Claro e incolor	Sim	Não	Não	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
119	F	19	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Claro e Xantocrômico	Sim	Não	Sim	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
120	F	15	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Claro e incolor	Sim	Não	Sim	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
123	M	81	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Claro e Xantocrômico	Sim	Não	Não	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
124	F	74	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Claro e Xantocrômico	Sim	Não	Não	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
125	M	36	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Claro e incolor	Não	Não	Sim	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
126	F	59	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Claro e incolor	Não	Não	Sim	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
129	M	64	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Claro e Xantocrômico	Sim	Não	Sim	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
130	M	49	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Claro e incolor	Não	Não	Sim	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
132	M	36	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Claro e incolor	Sim	Não	Sim	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

ID	Sexo	Idade	BAAR	Fungos	Cryptococcus	Isolamento Bacteriano	Cultura Aerobica Aerobic culture	Mycobacteria	Características Físicas	> 10 cells (%)	Proteína >10 mg/dL	Glicose >=50 mg/dL	Eritrócitos 1-99 cells/mm3	D-RT-PCR (Flavivirus)	CLART-Enterpex	Real time PCR EV	D-RT-PCR (Alphavirus)	Real time DENV	Real time PCR YFV	Real time PCR WNV
133	M	10	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Claro e Xantocrômico	Sim	Não	Sim	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
135	M	46	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Claro e Xantocrômico	Sim	Não	Sim	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
136	M	1	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Claro e incolor	Sim	Não	Sim	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
137	F	10	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Claro e incolor	Sim	Não	Sim	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
139	F	76	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Claro e incolor	Não	Não	Sim	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
141	M	20	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Claro e incolor	Sim	Não	Não	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
142	M	20	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Claro e incolor	Sim	Não	Não	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
146	M	82	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Claro e incolor	Não	Não	Sim	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
147	F	19	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Claro e Xantocrômico	Sim	Não	Sim	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
149	F	77	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Claro e incolor	Sim	Não	Não	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
150	M	29	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Claro e incolor	Sim	Não	Não	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
153	M	65	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Claro e Xantocrômico	Sim	Não	Não	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
155	M	53	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Claro e Xantocrômico	Não	Não	Sim	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
157	M	65	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Claro e Xantocrômico	Não	Não	Não	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
159	F	30	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Claro e incolor	Sim	Não	Não	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
160	M	20	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Claro e incolor	Sim	Não	Não	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
161	F	28	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Claro e Xantocrômico	Sim	Não	Não	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
164	F	56	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Claro e incolor	Sim	Não	Não	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
165	M	84	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Claro e incolor	Não	Não	Sim	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
166	M	39	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Claro e Xantocrômico	Sim	Não	Não	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
170	M	66	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Claro e incolor	Não	Sim	Não	Sim	DENV3	ND	ND	ND	DENV3-CT28	ND	ND
174	F	1	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Claro e Xantocrômico	Sim	Não	Não	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
175	M	1	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Claro e Xantocrômico	Não	Não	Sim	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
176	M	52	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Claro e incolor	Não	Não	Sim	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
177	M	59	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Claro e Xantocrômico	Sim	Não	Sim	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
179	F	30	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Claro e incolor	Sim	Não	Não	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
181	M	20	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Claro e Xantocrômico	Sim	Não	Não	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
182	M	66	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Claro e Xantocrômico	Sim	Não	Sim	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
183	M	19	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Claro e Xantocrômico	Sim	Não	Não	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
187	M	70	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Claro e incolor	Sim	Não	Sim	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
190	F	38	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Claro e Xantocrômico	Sim	Não	Sim	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
196	F	78	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Claro e incolor	Não	Não	Sim	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
197	F	28	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Claro e incolor	Não	Não	Sim	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
199	F	35	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Claro e incolor	Sim	Não	Sim	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
200	F	60	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Claro e Xantocrômico	Sim	Não	Sim	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
201	F	20	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Claro e Xantocrômico	Sim	Não	Sim	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
203	M	55	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Claro e Xantocrômico	Sim	Não	Sim	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
204	M	20	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Claro e Xantocrômico	Sim	Não	Não	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
205	M	43	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Claro e incolor	Sim	Não	Sim	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
206	F	36	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Claro e Xantocrômico	Sim	Não	Não	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
208	F	1	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Claro e Xantocrômico	Sim	Não	Não	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
210	F	36	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Claro e incolor	Sim	Não	Sim	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
211	M	30	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Claro e incolor	Sim	Não	Sim	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
214	F	1	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Ligeiramente hemorrágico	Sim	Não	Não	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
216	F	22	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Ligeiramente hemorrágico	Sim	Não	Sim	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
218	F	59	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Hemorrágico	Sim	Não	Sim	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
221	F	36	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Claro e incolor	Sim	Não	Não	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
223	F	20	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Hemorrágico	Não	Não	Não	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
224	M	24	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Hemorrágico	Sim	Não	Sim	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
225	F	32	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Hemorrágico	Sim	Não	Sim	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
227	M	40	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Ligeiramente hemorrágico	Sim	Não	Sim	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

ID	Sexo	Idade	BAAR	Fungos	Cryptococcus	Isolamento Bacteriano	Cultura Aerobica Aerobic culture	Mycobacteria	Características Físicas	> 10 cells (%)	Proteína >10 mg/dL	Glicose >=50 mg/dL	Eritrócitos >=99 cells/mm3	D-RT-PCR (Flavivirus)	CLART-Enterpex	Real time PCR EV	D-RT-PCR (Alphavirus)	Real time DENV	Real time PCR YFV	Real time PCR WNV
228	F	18	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Ligeiramente hemorrágico	Sim	Não	Não	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
230	F	75	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Hemorrágico	Sim	Não	Sim	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
231	F	39	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Claro e incolor	Sim	Não	Sim	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
232	F	15	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Ligeiramente turvo ou turvo	Sim	Não	Não	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
236	M	20	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Claro e Xantocrômico	Sim	Não	Não	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
238	M	1	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Ligeiramente hemorrágico	Sim	Não	Não	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
239	F	2	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Ligeiramente hemorrágico	Sim	Não	Não	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
242	F	15	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Ligeiramente turvo ou turvo	Sim	Não	Não	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
243	F	16	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Ligeiramente turvo ou turvo	Sim	Não	Não	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
252	F	15	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Ligeiramente hemorrágico	Sim	Não	Não	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
254	M	37	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Hemorrágico	Sim	Não	Sim	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
255	F	61	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Claro e incolor	Não	Não	Sim	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
260	M	43	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Claro e incolor	Sim	Não	Não	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
261	F	28	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Claro e incolor	Sim	Não	Não	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
263	M	52	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Claro e incolor	Não	Não	Sim	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
264	F	43	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Claro e Xantocrômico	Não	Não	Sim	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
265	F	39	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Claro e incolor	Não	Não	Sim	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
266	F	11	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Ligeiramente hemorrágico	Não	Não	Sim	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
267	F	51	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Claro e incolor	Não	Não	Sim	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
268	F	75	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Hemorrágico	Não	Não	Sim	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
269	M	51	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Claro e incolor	Não	Não	Sim	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
270	F	36	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Claro e incolor	Não	Não	Sim	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
271	F	17	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Claro e incolor	Não	Não	Sim	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
272	F	36	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Claro e incolor	Não	Não	Sim	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
273	F	21	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Claro e incolor	Não	Não	Sim	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
274	M	20	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Claro e Xantocrômico	Não	Não	Não	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
275	M	40	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Claro e Xantocrômico	Não	Não	Sim	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
276	F	46	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Claro e incolor	Não	Não	Sim	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
277	F	52	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Claro e incolor	Não	Não	Sim	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
278	M	25	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Claro e incolor	Não	Não	Sim	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
279	M	60	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Claro e incolor	Não	Não	Sim	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
280	F	83	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Claro e incolor	Não	Não	Sim	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
281	M	63	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Hemorrágico	Sim	Não	Não	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
282	M	48	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Hemorrágico	Sim	Não	Não	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
283	M	21	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Ligeiramente hemorrágico	Sim	Não	Sim	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
285	M	27	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Claro e incolor	Sim	Não	Não	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
286	M	53	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Turvo	Sim	Não	Não	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
287	M	73	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Ligeiramente hemorrágico	Sim	Não	Sim	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
293	M	40	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Ligeiramente hemorrágico	Sim	Não	Sim	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
295	M	84	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Ligeiramente hemorrágico	Sim	Não	Sim	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
296	M	9	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Turvo	Não	Não	Não	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
299	F	60	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Ligeiramente turvo ou turvo	Sim	Não	Não	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
300	F	61	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Claro e incolor	Não	Não	Não	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
302	M	16	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Claro e incolor	Sim	Sim	Não	Não	DENV2	ND	ND	ND	DENV2-CT3+	ND	ND
304	M	48	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Claro e Xantocrômico	Sim	Não	Não	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
308	F	60	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Ligeiramente turvo ou turvo	Sim	Não	Não	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
311	M	63	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Ligeiramente turvo ou turvo	Sim	Não	Não	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
313	M	45	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Claro e Xantocrômico	Sim	Não	Não	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
315	M	19	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Turvo	Sim	Não	Não	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
317	M	43	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Claro e incolor	Sim	Não	Sim	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
318	M	36	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Ligeiramente hemorrágico	Sim	Não	Sim	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

ID	Sexo	Idade	BAAR	Fungos	Cryptococcus	Isolamento Bacteriano	Cultura Aerobica Aerobic culture	Mycobacteria	Características Físicas	> 10 cells (%)	Proteína >10 mg/dL	Glicose >=50 mg/dL	Eritrócitos 1-99 cells/mm3	D-RT-PCR (Flavivirus)	CLART-Enterpex	Real time PCR EV	D-RT-PCR (Alphavirus)	Real time DENV	Real time PCR YFV	Real time PCR WNV
320	F	62	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Claro e incolor	Não	Não	Sim	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
322	F	20	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Turvo	Sim	Não	Não	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
324	F	1	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Claro e Xantocrômico	Sim	Não	Sim	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
329	M	21	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Claro e Xantocrômico	Sim	Não	Sim	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
331	M	63	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Claro e incolor	Sim	Não	Sim	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
332	F	61	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Claro e incolor	Sim	Não	Não	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
333	F	46	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Claro e incolor	Sim	Não	Não	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
338	M	58	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Hemorrágico	Sim	Não	Não	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
340	M	38	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Hemorrágico	Sim	Não	Sim	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
341	M	43	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Ligeiramente hemorrágico	Sim	Não	Sim	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
345	F	54	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Claro e incolor	Não	Não	Sim	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
346	F	74	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Ligeiramente hemorrágico	Sim	Não	Sim	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
347	F	60	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Ligeiramente hemorrágico	Sim	Não	Sim	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
348	M	53	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Hemorrágico	Sim	Não	Não	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
350	F	32	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Ligeiramente hemorrágico	Sim	Não	Sim	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
351	M	58	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Hemorrágico	Sim	Não	Não	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
352	M	2	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Ligeiramente hemorrágico	Sim	Não	Sim	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
354	M	24	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Claro e incolor	Sim	Não	Não	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
356	M	48	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Hemorrágico	Sim	Não	Sim	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
357	F	43	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Turvo	Sim	Não	Não	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
358	M	38	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Claro e incolor	Sim	Não	Não	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
360	F	61	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Hemorrágico	Sim	Não	Não	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
361	M	58	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Hemorrágico	Sim	Não	Sim	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
364	M	53	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Ligeiramente turvo ou turvo	Sim	Não	Não	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
365	F	43	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Claro e incolor	Sim	Não	Não	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
366	F	36	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Ligeiramente turvo ou turvo	Sim	Não	Não	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
370	F	71	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Ligeiramente hemorrágico	Sim	Não	Sim	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
372	M	29	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Ligeiramente hemorrágico	Sim	Não	Sim	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
373	F	53	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Turvo	Não	Não	Não	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
374	F	63	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Ligeiramente hemorrágico	Sim	Não	Não	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
376	F	20	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Ligeiramente hemorrágico	Sim	Não	Sim	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
377	F	57	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Ligeiramente hemorrágico	Sim	Não	Sim	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
379	F	38	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Hemorrágico	Sim	Não	Sim	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
380	M	53	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Hemorrágico	Sim	Não	Não	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
383	F	2	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Ligeiramente hemorrágico	Sim	Não	Não	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
385	F	26	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Turvo	Sim	Não	Não	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
388	M	67	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Ligeiramente hemorrágico	Sim	Não	Sim	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
389	F	47	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Hemorrágico	Sim	Não	Sim	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
390	M	17	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Claro e incolor	Sim	Não	Não	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
391	F	46	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Turvo	Sim	Não	Não	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
392	M	26	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Hemorrágico	Sim	Não	Sim	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
395	M	53	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Ligeiramente turvo ou turvo	Não	Não	Não	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
396	M	67	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Ligeiramente hemorrágico	Sim	Não	Sim	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
399	F	80	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Ligeiramente hemorrágico	Sim	Não	Sim	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
400	F	43	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Hemorrágico	Sim	Não	Sim	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
401	M	40	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Ligeiramente hemorrágico	Sim	Não	Sim	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
402	F	79	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Claro e incolor	Sim	Não	Sim	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
403	M	39	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Claro e incolor	Não	Não	Sim	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
405	M	67	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Ligeiramente hemorrágico	Sim	Não	Sim	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
406	F	49	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Claro e incolor	Sim	Não	Sim	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
407	M	67	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Hemorrágico	Não	Não	Não	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

ID	Sexo	Idade	BAAR	Fungos	Cryptococcus	Isolamento Bacteriano	Cultura Aerobica Aerobic culture	Mycobacteria	Características Físicas	> 10 cells (%)	Proteína >10 mg/dL	Glicose >=50 mg/dL	Eritrócitos 1-99 cells/mm3	D-RT-PCR (Flavivirus)	CLART-Enterpex	Real time PCR EV	D-RT-PCR (Alphavirus)	Real time DENV	Real time PCR YFV	Real time PCR WNV
407	M	67	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Hemorrágico	Não	Não	Não	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
410	F	47	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Ligeiramente hemorrágico	Sim	Não	Sim	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
411	M	26	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Ligeiramente hemorrágico	Sim	Não	Sim	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
412	M	53	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Ligeiramente hemorrágico	Sim	Não	Sim	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
415	M	36	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Claro e incolor	Não	Não	Não	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
417	M	28	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Ligeiramente turvo ou turvo	Sim	Não	Não	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
418	M	57	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Claro e incolor	Não	Não	Sim	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
419	F	60	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Ligeiramente hemorrágico	Sim	Não	Sim	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
420	F	49	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Claro e incolor	Sim	Não	Não	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
421	M	61	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Claro e incolor	Não	Não	Sim	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
422	M	26	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Ligeiramente hemorrágico	Sim	Não	Não	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
423	M	67	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Ligeiramente hemorrágico	Sim	Não	Sim	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
424	F	43	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Hemorrágico	Sim	Não	Sim	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
425	F	27	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Ligeiramente hemorrágico	Sim	Não	Sim	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
427	M	42	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Ligeiramente turvo ou turvo	Sim	Não	Não	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
429	F	13	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Ligeiramente turvo ou turvo	Sim	Não	Não	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
431	F	54	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Claro e incolor	Não	Não	Não	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
433	M	30	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Claro e incolor	Não	Não	Sim	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
434	M	53	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Ligeiramente hemorrágico	Não	Não	Sim	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
436	F	65	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Claro e incolor	Sim	Não	Não	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
437	F	43	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Ligeiramente hemorrágico	Sim	Não	Sim	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
439	M	24	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Turvo	Sim	Não	Não	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
440	M	54	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Ligeiramente hemorrágico	Sim	Não	Sim	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
441	F	32	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Ligeiramente turvo ou turvo	Sim	Não	Não	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
443	F	35	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Claro e incolor	Não	Não	Sim	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
444	F	63	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Ligeiramente turvo ou turvo	Sim	Não	Sim	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
445	M	30	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Claro e incolor	Sim	Não	Não	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
446	M	28	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Ligeiramente hemorrágico	Sim	Não	Sim	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
448	F	61	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Hemorrágico	Sim	Não	Sim	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
450	F	29	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Claro e incolor	Não	Não	Sim	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
452	M	52	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Ligeiramente hemorrágico	Sim	Não	Sim	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
455	F	1	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Claro e incolor	Sim	Não	Não	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
459	M	44	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Ligeiramente hemorrágico	Sim	Não	Sim	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
460	M	37	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Ligeiramente hemorrágico	Sim	Não	Sim	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
462	F	18	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Turvo	Sim	Não	Sim	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
465	M	42	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Ligeiramente turvo ou turvo	Sim	Não	Não	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
466	M	23	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Turvo	Sim	Não	Não	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
467	M	82	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Turvo	Não	Não	Não	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
469	M	62	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Claro e incolor	Sim	Não	Não	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
476	F	41	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Ligeiramente hemorrágico	Sim	Não	Sim	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
477	F	39	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Hemorrágico	Sim	Não	Sim	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
479	F	46	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Ligeiramente hemorrágico	Sim	Não	Não	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
480	M	54	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Hemorrágico	Sim	Não	Sim	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

481	F	37	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Claro e incolor	Sim	Não	Não	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND
483	F	2	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Ligeiramente turvo ou turvo	Sim	Não	Sim	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND
486	F	2	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Claro e incolor	Sim	Não	Não	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND
487	M	71	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Hemorrágico	Sim	Não	Sim	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND
490	F	37	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Claro e incolor	Sim	Não	Não	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND
492	M	76	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Hemorrágico	Sim	Não	Sim	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND
494	F	46	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Ligeiramente turvo ou turvo	Sim	Não	Não	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND
496	F	63	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Ligeiramente hemorrágico	Sim	Não	Não	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND
497	M	52	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Ligeiramente turvo ou turvo	Sim	Não	Sim	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND
498	F	63	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Claro e Xantocrômico	Sim	Não	Não	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND
499	F	73	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Hemorrágico	Sim	Não	Sim	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND
500	F	73	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Ligeiramente hemorrágico	Sim	Não	Sim	Sim	ND	ND	ND	ND	ND	ND

Legenda: NEG: Negativo

F: feminino

M: masculino

EV: enterovirus

DENV: vírus da dengue

D-RT-PCR: Transcrição reversa duplex-PCR

PCR em tempo real

SLEV: vírus Saint Louis encephalitis

HSV-1: Herpes Simplex vírus tipo 1

EBV: vírus Epstein-Barr

CMV: Citomegalovírus

HHV-6: herpesvírus humano 6

VZV: vírus Varicela zoster

ND: não detectável

APÊNDICE C - ARTIGO CIENTÍFICO

RESEARCH ARTICLE

Molecular characterization of viruses associated with encephalitis in São Paulo, Brazil

Jerenice E. Ferreira^{1,2,e,*}, Suzete C. Ferreira^{3,e}, Cesar Almeida-Neto^{3,4,†}, Anna S. Nishiya³, Cecilia S. Alencar^{5,6}, Gisele R. Gouveia⁷, Helio Caiaffa-Filho^{2,5}, Helio Gomes^{5,6}, Raimunda Telma de Macedo Santos^{6,2}, Steven S. Witkin^{8,†}, Alfredo Mendrone-Junior³, Ester C. Sabino¹

1 LIM / 46—Laboratory of Medical Parasitology, Institute of Tropical Medicine—IMT, University of São Paulo Medical School USP, São Paulo, Brazil, **2** Pathology Center, Adolf Lutz Institute—IAL, São Paulo, Brazil, **3** Fundação Pró-Sangue Hemocentro de São Paulo—FPS/HSP, São Paulo, Brazil, **4** Disciplina de Ciências Médicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil, **5** Central Laboratory Division—Hospital das Clínicas São Paulo—DLC-HCSP, **6** Clinical Laboratory and LIM03—Department of Pathology, Clinical Hospital, University of São Paulo Medical School, São Paulo, Brazil, **7** Faculty of Medicine, University of São Paulo—FMUSP, São Paulo, Brazil, **8** Department of Obstetrics and Gynecology, Weill Cornell Medicine, New York, NY, United States of America

^e These authors contributed equally to this work.

[†] These authors also contributed equally to this work.

* jerenic.ferreira@gmail.com

OPEN ACCESS

Citation: Ferreira JE, Ferreira SC, Almeida-Neto C, Nishiya AS, Alencar CS, Gouveia GR, et al. (2019) Molecular characterization of viruses associated with encephalitis in São Paulo, Brazil. PLoS ONE 14 (1): e0209993. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0209993>

Editor: Baochuan Lin, Defense Threat Reduction Agency, UNITED STATES

Received: June 7, 2018

Accepted: December 14, 2018

Published: January 14, 2019

Copyright: © 2019 Ferreira et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are available from https://figshare.com/articles/Tables_1_and_2_CSF_Groups_1_and_2_data_/135886.

Funding: This work was supported by Foundation for Research Support of the State of São Paulo for the Financial Assistance (FAPESP) (Process Number: 2011 / 52094-3). Principal Investigator: Ester C. Sabino.

Competing interests: The authors have declared that no competing interests exist.

Abstract

The objective of this study was to characterize the prevalence of viral encephalitis due to arbovirus infection of the Togaviridae and Flaviviridae families in São Paulo, Brazil. A total of 500 cerebrospinal fluid (CSF) samples collected between August 2012 and January 2013, from patients with symptoms of acute encephalitis were analyzed. Findings suggestive of viral encephalitis—elevations in cell concentration, glucose and total protein—were observed in 234 (46.8%) samples, designated as Group 1. The remaining 266 samples comprised Group 2. All samples were tested for Flaviviruses (dengue virus 1, 2, 3 and 4, yellow fever virus and West Nile virus), Alphavirus (NS5 region) and enterovirus by RT-PCR and for herpesviruses and enteroviruses using CLART-Enterpex. A presumptive viral etiological agent was detected in 26 samples (5.2%), 18 (8.0%) in Group 1 and 8 (3.0%) in Group 2. In Group 1 human herpesviruses were detected in 9 cases, enteroviruses in 7 cases, dengue viruses (DENV) in 2 CSFs and St. Louis encephalitis virus (SLEV) in one case. In Group 2 there were 3 CSFs positive for human herpesviruses, 2 for enteroviruses, 2 for DENV and 1 for SLEV. Detection of arboviruses, even though present in a minority of infected patients, identifies these viruses as a probable etiological agent of encephalitis. This is of special concern in regions where this class of viruses is endemic and has been linked to other recent epidemics.

Introduction

Encephalitis is associated with high morbidity and mortality, as well as with cognitive, behavioral and even symptomatic epilepsies [1]. Approximately 60% of patients suffer from severe memory disorder, which presents as clinical dementia [1]. In addition to the personal, family and social cost, if these patients survive, they rarely become productive again [1,2]. The incidence of encephalitis ranges from 1.5 to 8/100,000 inhabitants, being higher in children under one year of age [3,4].

Viruses known to cause encephalitis worldwide are herpesviruses, arboviruses and enteroviruses [1]. Arboviruses are the leading cause of encephalitis worldwide [2]. In developed countries, herpes simplex virus type 1 (HSV-1) is the leading cause of sporadic encephalitis in adults, while Varicella zoster virus (VZV) is responsible for up to 22% of pediatric cases [1].

Overall, Japanese encephalitis virus (JEV) is the most prevalent arbovirus associated with neurological disease based on total number of annual cases [1].

In the West, the West Nile virus (WNV) is the most frequent agent of arbovirus encephalitis and can be found in parts of Europe, Russia, Africa, the Middle East, India, Indonesia and North America [1]. There are few studies evaluating the prevalence of encephalitis-related viruses in Brazil [4]. Similar to other countries, the most frequent cause of viral encephalitis in Brazil appears to be HSV-1, followed by arboviruses [4]. Bastos et al., identified the presence of herpesviruses, enteroviruses and arboviruses in CSF samples from 165 patients suspected of central nervous system viral infection by gene amplification [5].

Among arboviruses circulating in Brazil, members of the Togaviridae, Flaviviridae, Peribunyaviridae, Reoviridae and Rhabdoviridae families cause the highest number of infections and diseases in humans [4]. Bussuquara virus (AROAV), Cacipaporé virus (CPCV), dengue virus (DENV) serotypes 1–4, Rocio virus (ROCV), Iguape virus (IGUV), Ilhéus virus (ILHV), yellow fever virus (YFV) and Saint Louis encephalitis virus (SLEV) have also been reported at low frequency in Brazil [6,7]. Chikungunya virus (CHIKV) was first reported in Central America in late 2013, and by the end of 2014 was present in most countries in South America [8–13]. Zika virus (ZIKV) was first reported in Brazil in 2014, but clinical cases were only recognized in mid-2015 in the states of Bahia and Rio Grande do Norte, located in the Northeast of Brazil [8–13].

In Brazil there exists an elevated risk for the emergence and/or spread of new arboviruses to humans [14]. This country has large urban centers with a high population density that are infested by mosquitoes of the genus *Culex* and *Aedes* that transmit arboviruses to man [14]. The prevalence and dispersion of arboviruses has rapidly increased globally in recent years coinciding with improvements in global transportation, adaptation of its arthropod vectors to urbanization, failure to contain increases in the mosquito population and deforestation [14]. These arthropods apparently rapidly adapt to enhanced exposure to humans and domestic animals [14].

The primary objective of this study was to assess the prevalence of sporadic, non-seasonal viral encephalitis associated with arbovirus infection of the Togaviridae and Flaviviridae families in patients in São Paulo, Brazil. A second objective was to ascertain the prevalence of herpesviruses and enteroviruses in these patients and to identify the distribution of cases by gender, age, locality and characteristics of the cerebrospinal fluid (CSF).

Materials and methods

Clinical study design and sample collection

A cross-sectional study was performed from August 2012 to January 2013. A total of 500 cerebrospinal fluid samples were collected at the Hospital das Clínicas of the University of São

Paulo Medical School (HCFMUSP) from individuals (both genders and any age group) with clinical suspicion of acute encephalitis (at least two of the following symptoms: fever, altered level of consciousness, headache, focal neurological deficits and seizure). HCFMUSP is the largest public hospital complex in Latin America, and is a center of tertiary care. It comprises eight institutes and two auxiliary hospitals with more than two thousand and one hundred beds [15, 16]. The distribution of encephalitis cases were from the metropolitan region, coastal and inland regions of São Paulo state as well as from other states in Brazil (Acre, Amazonas, Bahia, Ceará, Maranhão, Pará and Paraná). Suspicious patients were referred to the Special Analysis / Liquor Department of the Central Laboratory of HCFMUSP, where the aspiration of CSF was performed from the lumbar region of the spinal cord. Collected material was sent for biochemical, microbiological and cytological analysis. From each sample collected, 1 mL was set aside for molecular investigation of viral agents. Research on human subjects was conducted after Hospital das Clínicas—University of São Paulo's Institutional Review Board (CAPPesq) approval, online registration #8874/12. All patients provided written informed consent prior to CSF collection. In the case of patients under 18 years old, written consent was obtained of their parents or legal representatives.

Patients were classified into two groups according to CSF cellularity, glucose and total protein concentration. Group 1 included patients with pleocytosis (cellularity >4 cells/mm³) comprised predominantly of lymphocytes, glucose >50 mg/dL and protein >10 mg/dL. When one or more of these parameters were absent, patients were designated as Group 2 [17].

Physical characteristics of CSF were performed by visual observation of color and appearance before and after centrifugation. CSF biochemistry was performed by an automated method using the Modular Analytics System (Roche—Switzerland). The cytological analysis of CSF was performed by manually using a Fuchs-Rosenthal camera for global counts of red blood cells, leukocytes and tissue cells. A differential leukocyte count was performed by Cytospin™ (Cytospin TM 4 Cyto centrifuge—Thermo Fisher Scientific—Massachusetts, USA). The pellet fraction was affixed to slides and staining was performed using the Hemogram Slide Ink equipment (Vytra Diagnósticos—São Paulo—Brazil) and a Colorgram kit (Wright-Giemsa-Leishman).

Molecular detection

Extraction of nucleic acids. Viral RNA in CSF was extracted with the Qiagen UltraSens kit (QIAmpUltraSens—Qiagen GmbH, Hilden, Germany) using an initial volume of 250 μ L according to the manufacturer's protocol. Two μ L of canine adenovirus (DNA- CAV Vanguard HTLP 5 / CV-L 86-4230-65) at a 1/100 dilution was added as an exogenous internal control.

D-RT-PCR. Amplification of viral RNA was performed using the Duplex Reverse Transcription-PCR (D-RT-PCR) for detection and Identification of Alphaviruses and Flaviviruses, as described previously [18].

Real Time PCR. The quantitative real-time PCR reactions were performed according to the protocols Callahan et al., for DENV serotypes 1, 3 and 4 [19]; Johnson et al., for DENV serotype 2 [20]; Mantel et al., for yellow fever virus- YFV [21]; and Briese et al., for WNV in the NS5 region [22].

Real-time PCR for enteroviruses was performed according to a methodology described by Volle et al. [23]. The CLART Enterpex (BioMérieux—Ivry-sur-Seine, France) kit was used to identify eight human herpesviruses: HSV-1, herpes simplex virus type 2 (HSV-2), VZV, cytomegalovirus (CMV), Epstein-Barr virus (EBV), human herpesvirus 6 (HHV-6), human herpesvirus 7 (HHV-7) and human herpesvirus 8 (HHV-8) and the three major enteroviruses, poliovirus (PV), echovirus (E) and coxsackievirus (CV). The methodology is based on the

detection of the amplification by RT-PCR of a fragment located between 106–328 pb, which is detected by a low density micro-matrix platform (Microarray).

Sequencing. Samples of CSF in which virus was detected by D-RT-PCR were submitted to sequencing analysis according to the method of Sanger. The sequencing reaction was performed using the kit ABI PRISM BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction (Applied Biosystems, Life Technologies, Carlsbad, California, United States) according to the manufacturer's instructions. Sequencing was completed using the Genetic Analyzer ABI 3100 (Applied Biosystems, Life Technologies, Carlsbad, California, U.S.).

The sequences were analyzed using the program Sequencher 3.0 Sequencing Software (Ann Arbor, Michigan, United States) and compared with the genomic database GenBank (National Center for Biotechnology Information—NCBI—Bethesda, Maryland, U.S.).

Statistical analysis

The statistical analyses, chi-square test, were performed using Epi Info version 7.2 (Centers for Disease Control and Prevention (CDC), Atlanta, Georgia, United States) and Excel from Office 2010 (Redmond, Washington, United States).

Results and discussion

Among 500 patients with a clinical suspicion of encephalitis, 234 (46.8%) of their CSF samples were positive for an increased concentrations of cells, protein and glucose. These patients, whose CSF findings were suggestive of viral encephalitis, were designated as Group 1. The remaining 266 subjects comprised Group 2. Identification of a possible viral etiologic agent of encephalitis was accomplished in only 18 (8.0%) CSF samples from patients in Group 1 and 8 (3.0%) from those in Group 2. Table 1 summarizes the demographic characteristics of patients according to rates of virus detection. Gender was equally divided between male and female and the largest groups of patients were those over 50 years old. There were no differences in either category between those positive or negative for viruses or between Groups 1 and 2.

Table 2 summarizes the viruses detected in both groups. In Group 1 members of the herpesvirus family predominated (9 cases) followed by enteroviruses (7 cases). Three arbovirus infections, two of DENV and one case of SLEV were also identified. In Group 2 an equal number of herpesvirus and arbovirus (2 DENV, 1 SLEV) infections were detected (3 cases each), followed by enteroviruses (2 cases).

Table 1. Gender and age of patients with suspected viral encephalitis.

Data (Variables)	Group 1			p value	Group 2			p value
	Positive cases N = 18 (8.0%)	Negative cases N = 216 (92.0%)	Total N = 234 (100%)		Positive cases N = 8 (3.0%)	Negative cases N = 258 (97.0%)	Total N = 266 (100%)	
Gender								
Male	11 (5.0%)*	92 (39.0%)	103 (44.0%)	0.128	04 (1.5%)	133 (50.0%)	137 (51.5%)	0.931
Female	07 (3.0%)	124 (53.0%)	131 (56.0%)		04 (1.5%)	125 (47.0%)	129 (48.5%)	
Age								
0–14	06 (2.7%)	14 (5.9%)	20 (8.6%)	0.000704	01 (0.4%)	19 (7.1%)	20 (7.5%)	0.926
15–29	01 (0.5%)	33 (14.0%)	34 (14.5%)		02 (0.75%)	53 (19.9%)	55 (20.7%)	
30–49	03 (1.3%)	79 (33.7%)	82 (35.0%)		02 (0.75%)	81 (30.5%)	83 (31.2%)	
> 50	08 (3.5%)	90 (38.4%)	98 (41.9%)		03 (1.1%)	105 (39.5%)	108 (40.6%)	

*One patient had concomitant positive results for EV (enterovirus) and HHV-6. Chi-square test.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0209993.t001>

Table 2. Molecular etiology of positive cases of viral encephalitis.

Data (Variables)	Arboviruses N (%)		Herpesvirus N (%)					Enterovirus	Unknown
	DENV	SLEV	HSV-1	EBV	CMV	HHV-6	VZV	N (%)	etiology
Group 1 (N = 234)	2 (0.8%)	1 (0.4%)	1 (0.4%)	4 (1.7%)	1 (0.4%)	3 (1.3%)*	0 (0.0%)	7 (3.0%)*	216 (92.0%)
Group 2 (N = 266)	2 (0.8%)	1 (0.4%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	1 (0.4%)	1 (0.4%)	1 (0.4%)	2 (0.8%)	258 (97.0%)

*One patient had concomitant infection with EV (enterovirus) and HHV-6 (Real Time PCR and CLART Enterpex). DENV: dengue virus (D-RT-PCR and Real Time PCR); SLEV: Saint Louis encephalitis virus (D-RT-PCR); HSV-1: Herpes Simplex virus type 1 (CLART Enterpex); EBV: Epstein-Barr virus (CLART Enterpex); CMV: Cytomegalovirus (CLART Enterpex); HHV-6: Human herpesvirus 6 (CLART Enterpex); VZV: Varicella zoster virus (CLART Enterpex) [20–25].

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0209993.t002>

The two positive SLEV CSFs were both from women, 32- and 40- years-old, living in metropolitan São Paulo. One presented with facial palsy while the other had an uneventful clinical course without any adverse sequelae. Both SLEV samples underwent nucleotide sequencing to confirm their identity. The fragment obtained for the initial analysis was 232 bp. The sample from the Group 1 patient was 98% similar, and for the Group 2 patient 95% identical to SLEV isolated from the BsAsARG-10 NS5 gene (Sequence ID: gb JQ003910.1).

Table 3 shows the cellularity, biochemistry and physical characters of CSF among patients in Groups 1 and 2 who tested positive for virus. These variables could not distinguish between the different viruses identified in either group.

The prevalence of arbovirus-related encephalitis in subjects in our study was 2.4%, including 4 cases of DENV and 2 of SLEV. This occurrence is lower than what has been reported in other investigations [5]. Conversely, the identification of herpesviruses and enteroviruses as the most frequent CSF isolates from our patients is consistent with prior studies [5,24,25]. However, rates of detection and the specific herpesviruses that were present differed between our study and other investigations. Recent studies in New Orleans reported a 20.4% prevalence of HSV and a 5.1% prevalence of VZV in encephalitis patients [25]. In the present study HHV-6 and EBV were the most prevalent herpesviruses viruses detected. Divergent population characteristics between São Paulo and New Orleans as well as differences in socio-economic levels, seasonal weather variations and alterations in mosquito-related variables could account for these variations [25,26].

In Brazil, three strains of SLEV have been isolated from the blood of patients who did not display neurological symptoms. Two patients from Pará, in the North of the country, presented with fever and jaundice, and one from São Paulo had clinical symptoms consistent with dengue fever [27–29]. Non-human SLEV infections have also been found in southeastern Brazil, where the virus was isolated from wild birds, rodents and sentinel mice during a surveillance program of arbovirus activity carried out in the state of São Paulo from 1967 to 1969 [27–29]. In a study performed in cities in the Brazilian Amazon (Bragança and Salvaterra / Pará, Macapá / Amapá and Rio Branco / Acre) and in Maracaju, Mato Grosso do Sul in the midwest of the country, immunity to SLEV was identified in horses. No SLEV-associated disease was apparent in these animals [29,30]. However, in a study carried out in Minas Gerais, Brazil, SLEV was found in the brain of a horse with neurological symptoms and its identity was confirmed by molecular and serological analysis [31]. SLEV is also considered as a possible etiological agent in human cases of dengue-like illness in São Paulo [27,32]. Recently, SLEV was detected by molecular techniques in four serum samples from patients with clinical suspicion of dengue and in two patients with suspected viral meningoencephalitis, all from the Municipality of São José do Rio Preto, State of São Paulo [33]. In the study by Heinen et al.,

Table 3. CSF data from patients in Groups 1 and 2 who tested positive for virus.

	Enterovirus		Herpesvirus		SLEV		DENV	
	Group 1	Group 2	Group 1	Group 2	Group 1	Group 2	Group 1	Group 2
Cellularity								
Lymphomononuclear								
> 10%	7 (3.0%)	1 (0.4%)	9 (3.8%)	1 (0.4%)	1 (0.4)	–	2 (0.8%)	1 (0.4%)
<10%	–	1 (0.4%)	–	2 (0.8%)	–	1 (0.4%)	–	1 (0.4%)
Erythrocytes								
1–99 cells/mm ³	7 (3.0%)	1 (0.4%)	9 (3.8%)	2 (0.8%)	1 (0.4)	1 (0.4%)	2 (0.8%)	1 (0.4%)
> 100 cells/mm ³	–	1 (0.4%)	–	1 (0.4%)	–	–	–	1 (0.4%)
Biochemistry								
Glucose								
> 50 mg/dL	7 (3.0%)	–	9 (3.8%)	2	1 (0.4)	1 (0.4%)	2 (0.8%)	–
< 50 mg/dL	–	2 (0.8%)	–	1 (0.4%)	–	–	–	2 (0.8%)
Protein								
> 10 mg/dL	7 (3.0%)	2 (0.8%)	9 (3.8%)	2	1 (0.4)	1 (0.4%)	2 (0.8%)	2 (0.8%)
< 10 mg/dL	–	–	–	1 (0.4%)	–	–	–	–
Physical Characters								
Clear and Colorless	4 (1.7%)	1 (0.4%)	7 (3.0%)	3 (1.1%)	1 (0.4%)	1 (0.4%)	2 (0.8%)	2 (0.8%)
Clear and Xanthochromic	1 (0.4%)	–	2 (0.8%)	–	–	–	–	–
Slightly Hemorrhagic	–	–	–	–	–	–	–	–
Slightly turbid or cloudy	2 (0.8%)	1 (0.4%)	–	–	–	–	–	–
Turbid or cloudy	–	–	–	–	–	–	–	–

SLEV: Saint Louis encephalitis virus.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0209993.t003>

SLEV was detected in three patients co-infected with DENV serotype 4 in the cities of Cuiabá and Várzea Grande, one of whom had triple co-infection with DENV subtype1 [4,34–37]. The small number of identified SLEV infections in people in Brazil is likely due to the occurrence of asymptomatic infections as well as difficulty in the differential diagnosis of individual flaviviruses [5,27,32]. However, these studies are suggestive of a wide distribution of SLEV in Brazil [29].

The arrival of the WNV has been expected in Brazil since its appearance in the United States in 2000 [38–43]. Acknowledging the limits of detection, our data suggest that this virus is not yet a cause of encephalitis in São Paulo.

Epidemics of DENV and ZIKV have been recent occurrences in Brazil and they are considered to be the most important flaviviruses circulating in this country [4,34]. Consequently, laboratory diagnosis during epidemic periods is directed at detection of these viruses. This hinders the detection of other circulating flaviviruses, including SLEV, which may silently become widely dispersed in the Americas [4,33–36]. Therefore, our results indicate the need for a wider spectrum of active surveillance of arboviruses during outbreaks of dengue [4,34].

In the present study no presumptive viral agent was identified in 90% of suspected cases of encephalitis. Worldwide, >70% of cases of presumptive encephalitis cases are not associated with any known infectious agent. Limitations and sensitivity of diagnostic methods, timing of sample collection and storage conditions, viral load and evolution of the disease in infected individuals are factors that may decrease ability to detect etiologic agents [2,5, 44–46]. In addition, a non-infectious etiology, due to sterile inflammation, autoimmunity or environmental exposures, remains an additional possibility.

This outbreak of 500 presumed encephalitis cases within a six month period was not registered at the São Paulo State Health Department most likely due to underreporting. This absence of official notification increases the likelihood that public health officials will be under-prepared to initiate measures to reduce exposure to causative agents, including arboviruses [27].

Conclusions

Although we found only a low prevalence of arboviruses in this encephalitis population, there remains a need to employ molecular tests to identify this class of viruses in patients with encephalitis. This is critical in our opinion due to epidemics caused by related flaviviruses in Brazil. Continuous monitoring of arbovirus as a cause of encephalitis is essential for the adequate treatment of these patients as well as for emphasizing a need for the implementation of sanitary measures to reduce the population of their mosquito vectors. The detection of different viruses in the central nervous system of patients with meningitis or encephalitis highlights the importance of maintaining a diagnostic laboratory capable of identifying a variety of viruses with high sensitivity [5]. Detection of the specific causative virus will improve clinical decision making and the choice of the most appropriate antiviral therapy [5].

Acknowledgments

We thank the Foundation for Research Support of the State of São Paulo for financial assistance (Process 2011 / 52094–3). The funders had no role in the study design, data collection, and analyses, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Author Contributions

Conceptualization: Jerenice E. Ferreira, Suzete C. Ferreira.

Data curation: Jerenice E. Ferreira, Suzete C. Ferreira.

Formal analysis: Jerenice E. Ferreira, Suzete C. Ferreira, Helio Gomes, Ester C. Sabino.

Funding acquisition: Jerenice E. Ferreira, Suzete C. Ferreira, Ester C. Sabino.

Investigation: Jerenice E. Ferreira, Suzete C. Ferreira, Ester C. Sabino.

Methodology: Jerenice E. Ferreira, Suzete C. Ferreira, Gisele R. Gouveia, Ester C. Sabino.

Project administration: Jerenice E. Ferreira, Suzete C. Ferreira, Ester C. Sabino.

Resources: Jerenice E. Ferreira, Suzete C. Ferreira, Anna S. Nishiya, Cecilia S. Alencar, Helio Caiiffa-Filho, Helio Gomes, Raimunda Telma de Macedo Santos, Alfredo Mendrone-Junior, Ester C. Sabino.

Software: Jerenice E. Ferreira, Suzete C. Ferreira, Ester C. Sabino.

Supervision: Jerenice E. Ferreira, Suzete C. Ferreira, Ester C. Sabino.

Validation: Jerenice E. Ferreira, Suzete C. Ferreira, Helio Gomes, Ester C. Sabino.

Visualization: Jerenice E. Ferreira, Suzete C. Ferreira.

Writing – original draft: Jerenice E. Ferreira, Suzete C. Ferreira, Ester C. Sabino.

Writing – review & editing: Jerenice E. Ferreira, Suzete C. Ferreira, Cesar Almeida-Neto, Anna S. Nishiya, Gisele R. Gouveia, Steven S. Witkin, Alfredo Mendrone-Junior, Ester C. Sabino.

References

- Kennedy PGE. Viral encephalitis. *J Neurol*. 2005; 252: 268–72. <https://doi.org/10.1007/s00415-005-0770-7> PMID: 15761675
- Silva MT. Viral encephalitis. *Arq Neuro-Psiquiatr*. 2013; 71: 703–9.
- Gendelman HE, Persidsky Y. Infections of the nervous system. *Lancet Neurol*. 2005; 4: 12–3. Gilden DH. Acute viral central nervous system diseases. *ACP Medicine*. 2008; 1–13. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(04\)00951-2](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(04)00951-2) PMID: 15620853
- Vasconcelos PFC, Travassos da Rosa APA, Pinheiro FP, Shope RE, Travassos da Rosa JFS, Rodrigues SG, et al. Arboviruses pathogenic for man in Brazil. In: Travassos da Rosa APA, Vasconcelos PFC, Travassos da Rosa JFS, editors. An overview of arbovirology in Brazil and neighbouring countries. CEJUP. 1998; 72–99.
- Bastos MS, Lessa N, Naveca FG, Monte RL, Braga WS, Figueiredo LT, et al. Detection of Herpesvirus, Enterovirus, and Arbovirus infection in patients with suspected central nervous system viral infection in the Western Brazilian Amazon. *J Med Virol*. 2014; 86: 1522–7. <https://doi.org/10.1002/jmv.23953> PMID: 24760682
- Figueiredo LTM. The Brazilian flaviviruses. *Microbes Infect*. 2000; 2: 1643–9. PMID: 11113383
- Figueiredo RMP, Naveca FG, Bastos MS, Melo MN, Viana SS, Mourão MPG, et al. Dengue Virus Type 4. *Emerg Infect Dis*. 2008; 14: 667–9. <https://doi.org/10.3201/eid1404.071185> PMID: 18394292
- Campos GS, Bandeira AC, Sardi SI. Zika virus outbreak, Bahia, Brazil. *Emerg Infect Dis*. 2015; 21: 5.
- Zanluca C, Melo VCA, Mosimann ALP, Santos GIV, Santos CND, Luz K. The first report of autochthonous transmission of Zika virus in Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2015; 110: 569–72. <https://doi.org/10.1590/0074-02760150192> PMID: 26061233
- Vasconcelos PFC. Doença pelo vírus zika: um novo problema emergente nas Américas. *Rev Pan Am Saude*. 2015; 6: 9–10.
- Faria NR, da Costa AC, Lourenço J, Loureiro P, Lopes ME, Ribeiro R, et al. NHLBI Recipient Epidemiology and Donor Evaluation Study-III (REDS-III). Genomic and epidemiological characterization of a dengue virus outbreak among blood donors in Brazil. *Sci Rep*. 2017; 7: 15216. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-15152-8> PMID: 29123142
- Linnen JM, Vinelli E, Sabino EC, Tobler LH, Hyland C, Lee TH, et al. Dengue viremia in blood donors from Honduras, Brazil, and Australia. *Transfusion*. 2008; 48: 1355–62. <https://doi.org/10.1111/j.1537-2995.2008.01772.x> PMID: 18503610
- Lima-Camara TN. Emerging arboviruses and public health challenges in Brazil. *Rev Saude Publica*. 2016; 50: 36.
- Gould E, Pettersson J, Higgs S, Charrel R, Lamballerie X. Emerging arboviruses: Why today? *One Health*. 2017; 4: 1–13. <https://doi.org/10.1016/j.onehlt.2017.06.001> PMID: 28785601
- Cerri GG. Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. "Gestão 2010–2014". 2014 May 15 [cited 01 Sep 2016]. In: Hospital das Clínicas web site [Internet]. Available from: <http://www.hc.fm.usp.br/site/Hospital-das-Clinicas-da-FMUSP/>.
- Collucci C. HC faz aniversário em meio a reformas que somam R\$ 350 milhões. 2014 Apr 13 [cited 01 Sep 2016]. In: Folha de S. Paulo web site [Internet]. Available from: <http://www1.folha.uol.com.br/cotidiano/2014/04/1440047-hc-faz-aniversario-em-meio-a-reformas-que-somam-r-350-milhoes.shtml/>.
- Diretrizes Assistenciais. Protocolo de Encefalite. Hospital Israelita Albert Einstein. 21 Jun 2012. Available from: [http://www.saudeidireta.com.br/docsupload/1340280617Protocolo_%20E%20encefalite%20\(1\).pdf](http://www.saudeidireta.com.br/docsupload/1340280617Protocolo_%20E%20encefalite%20(1).pdf) Cited 01 Sep 2016.
- Bronzoni RVM, Baleotti FG, Nogueira RMR, Nunes M, Figueiredo LTM. Duplex reverse transcription-PCR followed by nested PCR assays for detection of Brazilian Alphaviruses and Flaviviruses. *J Clin Microbiol*. 2005; 43: 696–702. <https://doi.org/10.1128/JCM.43.2.696-702.2005> PMID: 15695666
- Callahan JD, Wu SJ, Dion-Schultz A, Mangold BE, Peruski LF, Watts DM, et al. Development and evaluation of serotype- and group-specific fluorogenic reverse transcriptase PCR (TaqMan) assays for dengue virus. *J Clin Microbiol*. 2001; 39: 4119–24. <https://doi.org/10.1128/JCM.39.11.4119-4124.2001> PMID: 11682539
- Johnson BW, Chambers TV, Crabtree MB, Guirakhoo F, Monath TP, Miller BR. Analysis of the replication kinetics of the ChimeriVax-DEN 1, 2, 3, 4 tetravalent virus mixture in *Aedes aegypti* by real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *Am J Trop Med Hyg*. 2004; 70: 89–97. PMID: 14971704
- Mantel N, Aguirre M, Gulia S, Girerd-Chambaz Y, Colombani S, Moste C, et al. Standardized quantitative RT-PCR assays for quantitation of yellow fever and chimeric yellow fever-dengue vaccines. *J Virol Methods*. 2008; 151: 40–6. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2008.03.026> PMID: 18501437

22. Briese T, Glass WG, Lipkin WI. Detection of West Nile virus sequences in cerebrospinal fluid. *Lancet*. 2000; 355: 1614–5. PMID: [10821368](#)
23. Volle R, Nourrisson C, Mirand A, Regagnon C, Chambon M, Henquell C, et al. Quantitative real-time RT-PCR assay for research studies on enterovirus infections in the central nervous system. *J Virol Methods*. 2012; 185: 142–8. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2012.06.019> PMID: [22766179](#)
24. Jaijakul S, Salazar L, Wootton SH, Aguilera E, Hasbun R. The clinical significance of neutrophilic pleocytosis in cerebrospinal fluid in patients with viral central nervous system infections. *Int J Infect Dis*. 2017; 59: 77–81. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2017.04.010> PMID: [28435023](#)
25. Kaewpoowat Q, Salazar L, Aguilera E, Wootton SH, Hasbun R. Herpes simplex and varicella zoster CNS infections: clinical presentations, treatments and outcomes. *Infection*. 2016; 44: 337–45. <https://doi.org/10.1007/s15010-015-0867-6> PMID: [26680781](#)
26. Barcellos C, Monteiro AMV, Corvalán C, Gurgel HC, Carvalho MS, Artaxo P, et al. Mudanças climáticas e ambientais e as doenças infecciosas: cenários e incertezas para o Brasil. *Epidemiol Serv Saúde*. 2009; 18: 285–304.
27. Santos CLS, Sallum MAM, Franco HM, Oshiro FM, Rocco IM. Genetic characterization of St Louis encephalitis virus isolated from human in São Paulo, Brasil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2006; 101: 57–63.
28. De Souza Lopes O, de Abreu Sachetta L, Coimbra TL, Pereira LE. Isolation of St. Louis encephalitis virus in south Brazil. *Am J Trop Med Hyg*. 1979; 28: 583–5. PMID: [453451](#)
29. Rodrigues SG, Oliva OP, Araújo FAA, Martins LC, Chiang JO, Henriques DF et al. Epidemiologia do vírus da encefalite de Saint Louis na Amazônia brasileira e no Estado de Mato Grosso do Sul, Brasil: elevada prevalência de anticorpos em equinos. *Pan-Amaz Saude*. 2010; 1: 81–6.
30. Travassos da Rosa APA, Travassos da Rosa JFS, Pinheiro FP, Vasconcelos PFC. Arboviroses. In: Leão RNO, coordenador. *Doenças infecciosas e parasitárias: enfoque amazônico*. CEJUP. 1997; 208–25.
31. Rosa R, Costa EA, Marques RE, Oliveira TS, Furtini R, Bomfim MR, et al. Isolation of saint louis encephalitis virus from a horse with neurological disease in Brazil. *PLoS Negl Trop Dis*. 2013; 7: e2537. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002537> PMID: [24278489](#)
32. Teixeira MG, Barreto ML, Guerra Z. Epidemiologia e medidas de prevenção do Dengue. *Inf Epidemiol Sus*. 1999; 8: 5–33.
33. Mondini A, Cardeal ILS, Lázaro E, Nunes SH, Moreira CC, Rahal P, et al. Saint Louis encephalitisvirus, Brazil. *Emerg Infect Dis*. 2007; 13: 176–8. <https://doi.org/10.3201/eid1301.060905> PMID: [17370543](#)
34. Vasconcelos PFC, Travassos da Rosa JFS, Travassos da Rosa APA, Dégallier N, Pinheiro FP, Sá Filho GC. Epidemiologia das encefalites por arbovírus na Amazônia brasileira. *Inst Med Trop São Paulo*. 1991; 33: 465–76.
35. Heinen LB, Zuchi N, Serra OP, Cardoso BF, Gondim BH, Dos Santos MA, et al. Saint Louis encephalitis virus in Mato Grosso, central-western Brazil. *Inst Med Trop São Paulo*. 2015; 57: 215–20.
36. Mondini A, Bronzoni R, Cardeal I, Santos T, Lázaro E, Nunes S, et al. Simultaneous infection by DENV-3 and SLEV in Brazil. *J Clin Virol*. 2007; 40: 84–6. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2007.06.007> PMID: [17658293](#)
37. Rocco IM, Santos CLS, Bisordi I, Petrella SMCN, Pereira LE, Souza RP, et al. St. Louis encephalitis virus: first isolation from a human in São Paulo State, Brazil. *Rev Inst Med Trop São Paulo*. 2005; 47: 281–5. doi: [/S0036-46652005000500008](#) PMID: [16302112](#)
38. Vieira MACS, Aguiar AAX, Borba AS, Guimarães HCL, Eulálio KD, Albuquerque-Neto LL. West Nile Fever in Brazil: sporadic case, silent endemic disease or epidemic in its initial stages? *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*. 2015; 57: 276. <https://doi.org/10.1590/S0036-46652015000300017> PMID: [26200972](#)
39. Vieira MACS, Romano APM, Borba AS, Silva EVP, Chiang JO, Eulálio KD et al. Case report: West Nile Virus Encephalitis: The first human case recorded in Brazil. *Am J Trop Med Hyg*. 2015; 93: 377–9.
40. Fujita DM, Salvador FS, Nali LHDS. The silent spread of West Nile virus in Brazil: non-human positive case in a beach tourist destination-Espírito Santo. *J Travel Med*. 2018; 25.
41. Whitley RJ, Gnann JW. Viral encephalitis: familiar infections and emerging pathogens. *The Lancet*. 2002; 359: 507–14.
42. Ferreira MLB, Cavalcanti CG, Coelho CA, Mesquita SD. Manifestações neurológicas de dengue: estudo de 41 casos. *Arq. Neuro-Psiquiatr*. 2005; 63: 488–93.
43. Gubler DJ. The global emergence/resurgence of arboviral diseases as public health problems. *Arch Med Res*. 2002; 33: 330–42. PMID: [12234522](#)
44. Bale JF Jr. Virus and Immune-Mediated Encephalitides: Epidemiology, Diagnosis, Treatment, and Prevention. *Pediatric Neurology*. 2015; 53: 3–12. <https://doi.org/10.1016/j.pediatrneurol.2015.03.013> PMID: [25957806](#)

45. Huppatz C, Durrheim DN, Levi C, Dalton C, Williams D, Clements MS, et al. Etiology of Encephalitis in Australia, 1990–2007. *Emerging Infectious Diseases*. 2009; 15: 1359–1365. <https://doi.org/10.3201/eid1509.081540> PMID: [19788802](#)
46. Le VT, Phan TQ, Do QH, Nguyen BH, Lam QB, Bach V, et al. Viral etiology of encephalitis in children in southern Vietnam: results of a one- year prospective descriptive study. *PLoS Negl Trop Dis*. 2010 26; 4: e854. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000854> PMID: [21049060](#)

APÊNDICE D - COMITÉ DE ÉTICA

Hospital das Clínicas da FMUSP
Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq

Cópia

PROJETO DE PESQUISA

Título: AVALIAR A PREVALÊNCIA DAS ENCEFALITES NÃO SAZONAIS POR ARBOVÍRUS NA CIDADE DE SÃO PAULO

Pesquisador Responsável: Ester Cerdeira Sabino

Versão: 3

Pesquisador Executante: Suzete Cleusa Ferreira

CAAE: 00696312.9.0000.0068

Co-autores: Alfredo Mendrone Júnior, Anna Nishiya, Claudio Sergio Pannutti, Helio Hehl Caiaffa Filho, Hélio Rodrigues Gomes, Cecília Saete Alencar, Jerenice Esdras Ferreira, Jose Eduardo Levi

Finalidade Acadêmica: Doutorado

Instituição: HCFMUSP

Departamento: MOLÉSTIAS INFECCIOSAS E PARASITÁRIAS

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP PARA EMENDA

Registro on-line: 8874

Número do Parecer: 141.863

Data da Relatoria: 07/11/2012

Apresentação do Projeto: O presente projeto de pesquisa pretende determinar se os arbovírus podem ser causadores de encefalites não epidêmicas e não sazonais. Além dos agentes etiológicos que são sabidamente causadores de encefalites tais como os herpes vírus, pretende-se, por meio de metodologia molecular, promover a detecção de mais de uma dezena de agentes virais, incluindo os arbovírus. Estes, já foram encontrados em surtos epidêmicos de meningites em determinadas regiões, porém não se sabe se podem ocorrer em uma população geral, fora de epidemias. A casuística que se pretende analisar será composta por 100 pacientes com Quadro clínico e líquórico compatível com encefalite viral. Pretende-se usar uma alíquota do líquor que será colhido de qualquer forma para a realização do quimiocitológico e cultura. Portanto, não haverá coleta específica para a pesquisa ou aumento do volume de líquor a ser coletado. Os testes moleculares já são aceitos na literatura como testes de referência em uma série de encefalites, tais como as herpéticas.

Objetivo da Pesquisa: Avaliar a prevalência de encefalites não sazonais causadas por arbovírus na cidade de São Paulo.

Avaliação dos Riscos e Benefícios: Não existem riscos adicionais aos pacientes na realização desta pesquisa uma vez que ela pretende usar material (líquor) remanescente da coleta que seria feita de qualquer maneira. Eventualmente, a DLC (Divisão de laboratório Central) poderia solicitar ser notificada de algum resultado molecular positivo que possa beneficiar os pacientes, uma vez que a maior parte dos agentes etiológicos que serão testados nesta pesquisa não serão investigados na DLC.

A inclusão de mais pacientes será benéfica à pesquisa, e a coleta de volume de sangue de 5 ml de sangue periférico a mais também não é motivo para acharmos que os riscos serão aumentados.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa: A solicitação de emenda ao projeto original aprovado há alguns meses foi motivada pela necessidade de aumentar a casuística de 100 para 200 sujeitos de pesquisa, e ainda houve inclusão do volume de sangue periférico de 5 mililitros, além do volume remanescente de líquido cefalorraqueano. O aumento da casuística será favorável, uma vez que se pretende estimar a prevalência de arbovírus em encefalites não sazonais de São Paulo.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória: Foi apresentado novo TCLE que incluiu as modificações (volume de sangue de 5 ml). A linguagem do TCLE é adequada e preserva todos os direitos dos sujeitos de pesquisa, assim como a confidencialidade dos dados.

Recomendações: Não existem outras recomendações.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações: Não há pendências.

Rua Dr. Ovídio Pires de Campos, 225 - Prédio da Administração - 5ª andar
CEP 05403-010 - São Paulo - SP.tnb
55 11 2661-7585 - 55 11 2661-6442 ramais: 16, 17, 18 | marcia.carvalho@hc.fm.usp.br

Deleone
29/11/12

Hospital das Clínicas da FMUSP
Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq

Situação do Parecer: Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP: Não

Considerações Finais a critério do CEP: Aprovado

São Paulo, 09 de Novembro de 2012

Prof. Dr. Luiz Eugênio Garcez Leme
Coordenador
Comissão de Ética para Análise de
Projetos de Pesquisa-CAPPesq