Universidade de São Paulo
Instituto de Medicina Tropical de São Paulo

CRISTINA FREITAS NUNES

ETIOLOGIA DAS ENCEFALITES E MENINGITES DE LÍQUOR CLARO

Tese apresentada ao Instituto de Medicina Tropical da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutora em Ciências
Área de concentração: Doenças Tropicais e Saúde Internacional
Orientadora: Profª Drª. Camila Malta Romano

São Paulo, 2018

CRISTINA FREITAS NUNES

ETIOLOGIA DAS ENCEFALITES E MENINGITES DE LÍQUOR CLARO

Tese apresentada ao Instituto de Medicina Tropical da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutora em Ciências
Área de concentração: Doenças Tropicais e Saúde Internacional
Orientadora: Prof^a Dr^a. Camila Malta Romano

São Paulo, 2018

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo
da Universidade de São Paulo – Bibliotecário Carlos José Quinteiro, CRB-8 5538

© Reprodução autorizada pelo autor

Nunes, Cristina Freitas

Etiologia das encefalites e meningites de líquido claro / Cristina Freitas Nunes. – São Paulo, 2018.

Tese (Doutorado) – Instituto de Medicina Tropical de São Paulo da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Doenças Tropicais e Saúde Internacional

Orientadora: Camila Malta Romano

Descritores: 1. ENCEFALITE VIRAL. 2. MENINGITE VIRAL. 3. LÍQUIDO CEFALORRAQUIDIANO. 4. REAÇÃO EM CADEIA POR POLIMERASE.

USP/IMTSP/BIB-07/2018.

AGRADECIMENTOS

Ao longo dos anos de trabalhos que resultaram nesta tese, pessoas e instituições me ajudaram, ensinando e apoiando. Agora que alcanço meus objetivos, não poderia deixar de reconhecê-las.

Início agradecendo a Deus e aos meus pais, sem eles eu não estaria e nem chegaria até aqui. Meus pais Vera Nívea e Otávio que sempre primaram pela minha educação, e quiseram o melhor para mim.

Agradeço ao meu irmão Marcos e minha cunhada Helena, por sempre que possível se fizeram presentes, principalmente nos meus momentos de dificuldade em SP, quando eu não conseguia ir para o RS, eles vinham me visitar, da mesma forma minha mãe e isso fez muita diferença na minha vida.

Ao meu vô Carolino, o qual é uma pessoa extremamente importante na minha vida, sempre foi meu estribo, aquele que me apoiou e incentivou em tudo. Sempre me dizia, “aguenta firme e segue em frente, porque não há mal que sempre dure nem bem que perdure”. Vô, eu venci esta etapa!

Ao meu marido, meu novo estribo, ele segurou a minha barra nos momentos em que pensei em desistir do meu sonho, ele me impulsionava e me fazia acordar e voltar a lutar. E, além disso, me deu a uma nova razão de viver, este serzinho que cresce a cada dia aqui dentro, minha Marina. Esta pequena ainda não veio ao mundo, mas já me deu uma grande lição de vida! E ainda me deu uma nova família, meus cunhados, cunhadas e sobrinhos, principalmente o Serginho, Gra, Fernandinho, Pedro, Paulo, Anita Maisa e Murilo, que fizeram diferença na minha vida.

Agradeço meu anjo da guarda de SP, o meu irmão de vida Zê! Em todas as vezes que passei dificuldade ele estava presente. Ele e a minha mãe de SP Osenira, me deram abrigo todas as vezes que precisei. Minha gratidão eterna a vocês!

Agradeço a Dra. Camila Malta Romano, que me deu a oportunidade de realizar meu sonho, fazer doutorado aqui em SP. Camis, tivemos altos e baixos, mas queria te agradecer profundamente por todas as nossas conversas, por tudo o que passamos, tudo isso me fez voltar a ser a mulher forte e determinada que eu era antes de chegar em SP. Muito obrigada por tudo!

Aos meus colegas de pós-graduação, ao Cami's Team ou grupo Camiletes: Paulo Urbano, Francielle Tramontini, Ana Carolina Soares, Cibele Leal (minha filhota), Felipe Scassi, Paulo Nasser (estes dois últimos são ex-integrantes do grupo, porém não menos importantes), Giovana Caleiro e Luiz Nali, muito obrigada pelas

conversas, risadas, conselhos, orientações, dicas, cervejinhas, viagens, congressos, etc. Vocês, cada um de sua maneira, me ajudaram muito e me fizeram crescer.

Aos meus amigos queridos Paulo Urbano, Cibeles e Anderson, nunca vou esquecer toda ajuda que vocês me deram neste trabalho, divido esta tese com vocês!!!

Ao meu amigo Rodrigo Pessoa (homizinho), com quem dividi momentos divertidíssimos no Capote's room, companheiro de caminhadas, muitas risadas, almoços, jantares, trabalho durante os finais de semana no lab e uma boa cervejinha, é claro! Rô, muito obrigada pela parceria!!!

Da mesma forma, quero agradecer a todos os meus amigos do laboratório de virologia, Marli, Silvia Helena, Funico (Cris Centrone), Will, Lucy, Cyri, Laurinha, Cris, Carol Mamana, Clara, Nathalia, Dona Sonia, Dona Maria, Luciano, Débora, Georgina e Tania. Cada um de vocês fez uma grande diferença na minha vida! Todas as abraços apertados, lágrimas secadas, bate papos, dicas de trabalho, enfim todos os auxílios prestados, nunca vou esquecer! Muito obrigada!!!

Não posso deixar de agradecer também a dois grandes incentivadores e grandes amigos, que são de outras instituições, mas os quais marcaram me incentivaram a chegar até aqui, meu querido amigo e ex-orientador Gilberto D'Ávila Vargas (Guilber), e a minha grande amiga Maria Cristina Marcucci, que me deu a oportunidade de vir para SP e fez com que eu sonhasse mais alto.

Aos amigos que fiz nesta cidade, que faziam meus finais de semana serem mais leves, Gilberto Frateschi, Maria Aparecida Frateschi, Thiago Frateschi, Sylvia Frateschi, Alexandre Esparta e Angela Minasian, com quem eu faço/fazia minhas aventuras (trekking). Aos meus amigos Valquiria Ferrazini, Zê, Will, Cida e Carolzinha amo vocês e mesmo cada um tomando novos rumos, seguimos amigos sempre. À minha amiga querida Xu (Daniele Ferreira) por entrar em minha vida em um momento bem conturbado, fazendo com que minha vida aqui ficasse mais leve, com muitas risadas e muitos chopps.

Aos meus amigos da vida toda Isabel Madrid, Laura Madrid, Camila Teixeira e Lorena, Roberta Nunes e Gabriel Nunes (primos ou melhor, irmãos), Camila Brasil, Fabi, Larissa e Cleidomar Antunes, todos mesmo distantes fisicamente, sempre se fizeram presentes, fazendo com que a distância física diminuísse.

Ao Instituto de Medicina Tropical, e todos os seus funcionários, principalmente Eliane Araújo, Adriane e Carlos, por me ajudarem sempre que precisei.

À Prof. Ester Sabino e a Dra Suzete Lombardi, pelas amostras de LCR cedidas para este trabalho.

Ao Dr. Michel Haziot e ao Dr. Augusto Cesar Penalva de Oliveira, por terem se empenhado em implementar este projeto na ISCMSP. Em especial ao Dr. Michel, que se responsabilizou por este projeto na ISCMSP, coletou as amostras e ainda me auxiliou em dúvidas sobre neurologia.

Aos colegas do grupo de neurociência do Emilio Ribas, pelas reuniões, discussões e elucidações sobre neurociência, principalmente a Rosa Marcusso, sempre muito solícita e ajudando a resolver as questões burocráticas do projeto.

Aos pacientes, por aceitarem participar deste trabalho, sem eles este trabalho não seria possível.

E, por fim a FAPESP, por me conceder a Bolsa de doutorado, a qual permitiu minha manutenção em São Paulo e para que eu pudesse levar meu trabalho a congressos no Brasil e no exterior.

Meu muito obrigada a todos que de alguma forma me auxiliaram à conclusão deste trabalho.

“E se...
...Se a lagrima escorrer?
E por medo de sofrer
Eu pensar em desistir?
E se quando eu cair
Ninguém me estender a mão?...
...E se eu parar de sonhar
Queda a queda, pouco a pouco?
E se quem eu mais confio
Me ferir, me magoar?
E se a ferida for grande,
Não cicatrizar?
Se na hora da batalha
Minha coragem for falha?...
...E se for tarde demais?
E se o tempo passar?...
...Se o “se” fosse diferente?
Se eu dissesse para mim mesmo:
Se renove, siga em frente,
Se arrisque, se prepare,
Se cair jamais pare,
Se levante, se refaça...
...Se olhe, se valorize,
E se permita errar, se dê de presente a chance
De pelo menos tentar
Se o “se” for bem usado
O impossível sonhado
Pode se realizar!”
Braulio Bessa

RESUMO

Nunes, CF. Etiologia das encefalites e meningites assépticas (Tese). São Paulo: Instituto de Medicina Tropical de São Paulo da Universidade de São Paulo; 2018.

Infecções no sistema nervoso central (SNC) causadas por microrganismos desencadeiam sintomas de moderados a severos, dependendo da região atingida, podendo ser designadas como encefalites ou meningites. Os vírus são os agentes mais comuns nestas infecções. Os agentes virais responsáveis por essas enfermidades que apresentam maior incidência na população mundial são certos herpesvírus, flavivírus, influenza A, enterovírus e vírus da caxumba. Entretanto, essa prevalência varia de acordo com a população, estado imunológico do indivíduo, idade e região estudada. Embora existam dados bem estabelecidos da etiologia dessas doenças em alguns países, ainda há uma carência de informação no que diz respeito à etiologia dessas moléstias no Brasil. Assim, informações mais precisas em relação à prevalência desses agentes em nosso meio são necessárias para o desenvolvimento e aplicação de métodos de diagnósticos mais rápidos e eficientes. Neste trabalho, foram analisadas 120 amostras de líquido cefalorraquidiano (LCR), procedentes de dois centros da cidade de São Paulo (Irmandade Santa Casa de Misericórdia e Hospital das Clínicas da Faculdade de medicina da Universidade de São Paulo), as quais foram submetidas à reação em cadeia de polimerase para o herpesvirus simples 1 e 2 (HSV 1 e 2), vírus da varicela zoster (VZV), herpesvirus humano 6 (HHV-6), influenza A (FLUA), enterovírus, vírus da caxumba, poliomavírus vírus BK (BKV) e vírus JC (JCV) para flavivírus. Do total, 44 amostras (36,7%) apresentaram resultado positivo para algum dos vírus analisados no âmbito desta pesquisa, sendo 15 (12,5%) para poliomavírus BKV, 2 (1,7%) para poliomavírus JCV, 21 (17,5%) para HSV1 e 2, 5 (4,2%) foram positivos para BKV e HSV1 e 2 (coinfecção) e 1 (0,8%) para vírus Epstein-Barr (EBV). Uma parte das amostras negativas foi submetida a sequenciamento direto de nova geração (n=8 amostras), resultando em amostras positivas para vírus (vírus simio 40), protozoários e bactérias. Este estudo mostrou que infelizmente, menos de 50% das encefalites e meningites assépticas puderam ser relacionadas a algum agente viral. Houve uma alta prevalência de HSV no material estudado, de acordo com o esperado, mas a presença de poliomavírus no LCR destes indivíduos foi acima da observada na literatura. Esses, bem como os resultados de sequenciamento direto e sua associação a etiologia das encefalites e meningites, devem ser interpretados com cautela.

Descritores: encefalite viral, meningite viral, líquido cefalorraquidiano, sistema nervoso central, reação em cadeia de polimerase.

ABSTRACT

Nunes, CF. Etiology of aseptic encephalitis and meningitis (Thesis). São Paulo: Instituto de Medicina Tropical de São Paulo da Universidade de São Paulo; 2018

Central nervous system (CNS) infections caused by microorganism trigger moderate to severe symptoms, depending on the region affected and may be referred as encephalitis or meningitis. Viruses are the most common agents in these infections. The viral agents responsible for these diseases with highest incidence worldwide are certain herpesviruses, flaviviruses, influenza A, enteroviruses, and mumps virus. However, their prevalence vary according to the population, immunological state of the individual, age and region studied. Although there are well-established data on the etiology of these diseases in some countries, there is little information regarding the etiology of these diseases in Brazil. Thus, data regarding the prevalence of these agents in our environment is necessary for the development and application of faster and more efficient diagnostic methods. In this study, 120 cerebrospinal fluid (CSF) samples from two centers of the city of São Paulo (Hospital Santa Casa de Misericórdia and Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo) were investigated by PCRs for herpes simplex virus (HSV 1 and 2), varicela zoster virus (VZV), human herpesvirus 6 (HHV6), influenza A, enterovirus, mumps virus, polyomavirus BK virus and JC virus and flaviviruses. From these, 44 samples (36.7%) presented positive result for one of the viruses analyzed, being 15 (12.5%) for polyomavirus BKV, 2 (1.7%) for polyomavirus JCV, 21 (17.5%) for HSV 1 and 2, 5 (4.2%) samples were positive for BKV and HSV1 and 2 (coinfection) and 1 (0.8%) for Epstein-Barr virus (EBV). A part of the negative samples (n=8) were submitted to next generation direct sequencing and revealed the presence of agents as viruses (simian virus 40), protozoa and bacteria. This study showed that unfortunately, less than 50% of the aseptic encephalitis and meningitis could be related to some viral agent. It was found high prevalence of HSV, as expected, but the presence of polyomavirus in the CSF of these individuals was higher than that observed in the literature. These results, as well as direct sequencing results and its relationship to the etiology of encephalitis and meningitis should be interpreted with caution.

Descriptors: Viral encephalitis, viral meningitis, cerebrospinal fluid, central nervous system, polymerase chain reaction.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Sistema Nervoso Central.....	21
Figura 2. Caixa craniana e envoltórios meníngeos.....	22
Figura 3. Fluxo de LCR.....	23
Figura 4. Cavidades ventriculares e produção LCR.....	23
Figura 5. Barreiras Hematoliquórica e Hematoencefálica.....	25
Figura 6. Distribuição mundial das EMs.....	28
Figura 7. Sistema de purificação utilizando o Agencourt AMPure® XP.....	79
Figura 8. Bandas de interesse monitoradas no E-Gel® SizeSelect™ Gel Agarose 2%.....	81
Figura 9. Distribuição mensal por ano das amostras coletadas.....	86
Figura 10. Reação de PCR em tempo real para determinação da curva padrão do HSV.....	89
Figura 11. Reação de PCR em tempo real para determinação da curva padrão do HHV6.....	90
Figura 12. Reação de PCR em tempo real para determinação da curva padrão do VZV.....	91
Figura 13. Reação de PCR em tempo real para determinação da curva padrão do vírus influenza.....	92
Figura 14. Reação de PCR em tempo real para determinação da curva padrão do enterovírus.....	93
Figura 15. Reação de PCR em tempo real para determinação da curva padrão do poliomavírus.....	94
Figura 16. Reação de PCR em tempo real para determinação da curva padrão do flavivírus.....	95
Figura 17. Reação de PCR em tempo real (TaqMan) para determinação da curva padrão do vírus da caxumba.....	96
Figura 18. Gráfico do resultado das PCRs realizadas.....	98
Figura 19. Resultado do alinhamento da sequência de BKV na ferramenta BLAST.....	99

Figura 20. Gel da eletroforese realizada para verificação da amplificação do material.....	100
Figura 21. Resultado do alinhamento do <i>contig</i> obtido do PEV 95 apresentando similaridade ao vírus SV40 na ferramenta BLAST.....	101
Figura 22. Resultado do alinhamento do <i>contig</i> obtido do PEV 1 apresentando similaridade a <i>Toxoplasma gondii</i> na ferramenta BLAST.....	101
Figura 23. Resultado do alinhamento do <i>contig</i> obtido do PEV 39 apresentando similaridade a <i>Cryptococcus neoformans</i> na ferramenta BLAST.....	102
Figura 24. Resultado do alinhamento do <i>contig</i> obtido do PEV 48 apresentando similaridade a <i>Cryptococcus neoformans</i> na ferramenta BLAST.....	102
Figura 25. Resultado do alinhamento do <i>contig</i> obtido do PEV 53 apresentando similaridade a <i>Treponema pallidum</i> na ferramenta BLAST.....	103
Figura 26. Resultado do alinhamento do <i>contig</i> obtido do PEV 80 apresentando similaridade a <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> na ferramenta BLAST.....	104

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Sequências dos <i>primers</i> utilizados para verificar o controle interno.....	62
Tabela 2. <i>Primers</i> específicos à região a ser amplificada de cada agente, alvo do presente estudo.....	63
Tabela 3. Plasmídeo contendo sequências dos vírus DNA.....	65
Tabela 4. Plasmídeo contendo sequências dos vírus RNA.....	65
Tabela 5. Protocolo submetido a 3 ciclagens com temperatura de anelamento distintos.....	68
Tabela 6. Protocolo de PCR em tempo real para HSV, VZV e HHV6.....	69
Tabela 7. Protocolo de PCR em tempo real para o vírus da caxumba.....	69
Tabela 8. Sequência dos primers da primeira etapa do PanHerpes (HSV1, HSV2, EBV, CMV e HHV8).....	70
Tabela 9. Protocolo e ciclagem utilizada para PanHerpes.....	71
Tabela 10. Sequência do <i>primer</i> randômico K-8N.....	74
Tabela 11. Sequência do <i>primer</i> K.....	76
Tabela 12. Dados demográficos e clínicos dos pacientes incluídos no estudo.....	82
Tabela 13. Concentração dos <i>primers</i> e temperatura de anelamento para os vírus HVS, VZV, HHV6.....	84
Tabela 14. Concentração dos <i>primers</i> e temperatura de anelamento para os vírus influenza e enterovírus.....	84
Tabela 15. Concentração dos <i>primers</i> e temperatura de anelamento para o vírus da caxumba.....	85

LISTA DE ABREVEATURAS E SIGLAS

3-OSHS - sulfato de heparana modificado

AgT – Antígeno T

BHE - Barreira hematoencefálica

BHL - Barreira hematoliquórica

BKV - Vírus BK

BSA - Barreira sangue-aracnóide

CD4+ - Grupamento de diferenciação 4

CD46 - Grupamento de diferenciação 46

cDNA – fita complementar de DNA

CDV - Vírus da cinomose canina

CMV – Citomegalovirus

CPV - Parvovirus canino

Ct - *Threshold cycle*

DENV – Virus da dengue

DNA – Ácido desoxirribonucleico

EBV – Vírus Epstein Barr

EMs – Encefalites e meningites

Etanol PA – etanol de pureza em nível analítico

EUA – Estados Unidos da América

EV – Enterovírus

FLUV – Influenzavírus

FLUVA – Influenzavírus A

FR - Forma replicativa

GAG - glicosaminoglicanos

gB – glicoproteína B

gD – glicoproteína D

gE - glicoproteína E

gH – glicoproteína H

gL – glicoproteína L

HA – Hemaglutinina

HCFMUSP - Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

HHV-3 - Herpesvírus humano 3

HHV-6 – Herpesvírus humano 6

HIV – Vírus da imunodeficiência humana

HSV – Herpesvírus simples

HSV-1 – Herpesvírus simples 1

HSV-2 – Herpesvírus simples 2

HVEM - Receptor mediador de entrada de herpesvírus

IgG – Imunoglobulina G

IgM – Imunoglobulina M

ISCMSP - Irmandade da Santa Casa de Misericórdia de São Paulo

ISP - *Ion Sphere Particle*

JCV - Vírus JC

JEV - Vírus da encefalite japonesa

LCR – Líquido cefalorraquidiano

LEMP - Leucoencefalopatia multifocal progressiva

MT – Estado do Mato Grosso

NA - Neuraminidase

PCR - Reação em cadeia de polimerase

RE - Reticulo endoplasmático

RM - Ressonância magnética

RM - Ressonância magnética

RNA – Ácido ribonucleico

RNA_m - Ácido ribonucleico mensageiro

ROCV - Vírus Rocio

RT - Transcrição reversa

SLEV - Vírus da encefalite de Saint Louis

SNC – Sistema nervoso central.

T1 - Tempo 1 de relaxamento

T2 - Tempo 2 de relaxamento

TA - Temperatura de anelamento

TC - Tomografia computadorizada

TCLE – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TM - Temperatura de *melting*

VP1 - Proteína viral 1

VP2 - Proteína viral 2

VP3 - Proteína viral 3

VP4 - Proteína viral 4

VZV – Vírus Varicela Zoster

WNV - Vírus do Nilo Ocidental

WNV - Vírus do oeste do Nilo

YFV - Vírus da febre amarela

LISTA DE SÍMBOLOS

% - porcentagem

' – minutos

" – segundos

< - menor

° - grau

°C – graus Celsius

μL – microlitro

μM – micromolar

∞ - infinito

dL – decilitro

dNTP – desoxirribonucleotídeos fosfatados

g – força gravitacional

H⁺ - íon hidrogênio

H₂O – fórmula da água

kb – kilo bases

kpb – kilo pares de bases

mg - miligrama

MgCl₂ – cloreto de magnésio

mL - mililitro

mM – milimolar

mm³ – milímetro cúbico

ng – nanograma

nm – nanômetro

pb – pares de bases

pH - potencial hidrogeniônico

pmol – picomol

R^2 - coeficiente de correlação

U – unidade

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	21
1.1. SISTEMA NERVOSO CENTRAL.....	21
1.2. LIQUIDO CEFALORRAQUIDIANO (LCR)	22
1.3. BARREIRAS HEMATOLIQUÓRICA E HEMATOENCEFÁLICA.....	24
1.4. ENCEFALITES E MENINGITES.....	25
1.5. AGENTES VIRAIS NEUROTROPICOS.....	28
1.6. DIAGNÓSTICO DE ENCEFALITE E MENINGITE VIRAIS	53
2. JUSTIFICATIVA.....	57
3. OBJETIVO	60
3.1. OBJETIVO CENTRAL	60
3.2. OBJETIVOS GERAIS.....	60
4. METODOLOGIA	62
4.1. DESENHO DO ESTUDO	62
4.2. CRITÉRIOS DE INCLUSÃO.....	62
4.3. CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO.....	62
4.4. ASPECTOS ÉTICOS	63
4.5. COLETA E ARMAZENAMENTO DAS AMOSTRAS	63
4.6. PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS PARA AS TÉCNICAS DE PCR	64
4.7. PADRONIZAÇÃO DAS PCRs	65
4.7.1. Preparação dos controles positivos para as reações de PCR	66
4.8. PCR CONVENCIONAL PANHERPES COM ENZIMA DE RESTRIÇÃO.	72

4.9. SEQUENCIAMENTO PELO MÉTODO DE SANGER.....	74
4.10. PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS DE LCR PARA O NGS (ION TORRENT)	75
4.11. SEQUENCIAMENTO DE NOVA GERAÇÃO (ÍON TORRENT)	78
5. RESULTADOS	85
5.1. PACIENTES E DADOS DEMOGRÁFICOS	85
5.2. CONTROLE INTERNO	86
5.3. PADRONIZAÇÃO DAS PCRS EM TEMPO REAL.....	87
5.4. PCR CONVENCIONAL E EM TEMPO REAL.....	96
5.5. SEQUENCIAMENTO PELO MÉTODO DE SANGER.....	98
5.6. PCR CONVENCIONAL PARA PANHERPES COM ENZIMA DE RESTRIÇÃO	99
5.7. SEQUENCIAMENTO DE NOVA GERAÇÃO (ION TORRENT)	99
6. DISCUSSÃO	106
7. CONCLUSÃO.....	118
8. REFERENCIAS	120

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1. SISTEMA NERVOSO CENTRAL (SNC)

O SNC é constituído pelo encéfalo (cérebro, cerebelo e tronco encefálico) e pela medula espinhal (figura 1), sendo responsável pela coordenação da função de vários órgãos, funções sensorial, motora e adaptativa (tais como sudorese, calafrio, salivação, entre outros)¹.

Figura 1. Sistema Nervoso Central. Fonte: Adaptado de NETTER².

Por ser um dos sistemas mais importantes do organismo, o SNC é extremamente protegido, contando principalmente com a proteção mecânica da caixa craniana, bem como dos envoltórios meníngeos (figura 2), sendo eles denominados de dura-máter (mais externa, formada de tecido conjuntivo denso), aracnoide (membrana serosa, de posição mediana, entre aracnoide e pia-mater) e pia-máter (membrana bem vascularizada, mais interna em contato direto com o SNC)¹.

Figura 2. Caixa craniana e envoltórios meníngeos. Fonte: Adaptado de Netter².

Entre as meninges aracnoide e a pia-máter, encontra-se um fluido corporal intimamente relacionado com o SNC e seus envoltórios, conhecido como líquido cefalorraquidiano (LCR) também chamado de líquido, que também confere proteção mecânica ao cérebro e a medula espinhal contra choques, pressões e alterações bruscas de pressão venosa³.

1.2. LÍQUIDO CEFALORRAQUIDIANO (LCR)

O LCR é um fluido corporal não-hemático, oligocelular (1 a 5 células/mm³) e oligoproteico, presente nas cavidades ventriculares e no espaço subaracnóideo envolvendo a medula espinhal e encéfalo (figura 3). Em condições normais, o LCR apresenta aspecto límpido, incolor e translúcido, contendo baixa concentração de glicose, potássio e magnésio^{3; 4; 5}.

Figura 3. Fluxo do líquido cefalorraquidiano. Fonte: Adaptado de Adaptado de Netter⁶

Grande parte da produção de LCR se dá no plexo coróide e a taxa média é de aproximadamente 22 mL/hora, ou cerca de 400 a 600 mL/dia (figura 4). Sua renovação ocorre de 4 a 5 vezes ao dia, sendo seu volume total de 100 a 150mL em adultos saudáveis. A maior concentração deste fluido se dá no espaço subaracnóideo, cisterna magna e cisterna mesencefálica^{3; 7; 8}.

Figura 4. Cavidades ventriculares e produção de LCR. Fonte: Adaptado de <http://static.hsw.com.br/gif/brain-ventricles.gif>.

O LCR também desempenha um papel fundamental na homeostase do líquido intersticial do parênquima cerebral e na regulação do funcionamento neuronal⁸.

Por ser uma zona privilegiada, o SNC tem um ambiente metabólico e imunológico local particular, graças a proteção de três elementos estruturais: i) barreira hematoencefálica (BHE) com a interface entre o encéfalo e os vasos sanguíneos; ii) barreira hematoliquórica (BHL), formada pelo plexo coróide e a membrana aracnóide com os vasos sanguíneos e o LCR; e iii) a barreira sangue-aracnóide (BSA), que é a interface dos vasos sanguíneos com a camada do epitélio da aracnóide subjacente a dura-máter das meninges. Sendo as duas primeiras descritas, as mais importantes. Estas barreiras são de fundamental importância para a manutenção do funcionamento neuronal^{9; 10;11}.

1.3. BARREIRAS HEMATOLÍQUÓRICA E HEMATOENCEFÁLICA

A BHL é composta pelas células endoteliais intimamente justapostas no plexo coróide (figura 5). Microvilos estão presentes na superfície da membrana apical da BHL, aumentando muito a área de superfície, podendo ajudar na secreção de fluidos. Portanto, no plexo coróide ocorre a difusão facilitada e o transporte ativo do LCR, bem como de metabólitos do LCR ao sangue e vice-versa⁷.

BHE é um termo usado para descrever as propriedades únicas da microvasculatura do SNC (figura 5). Estes vasos contêm uma série de propriedades adicionais que lhes permitem regular rigorosamente o movimento de moléculas, íons e células entre o sangue e o SNC, influenciando a composição do líquido extracelular dos tecidos nervosos, cuja transferência passiva dos solutos depende de sua solubilidade em lipídios^{12; 13}.

Figura 5. Barreiras Hematoliquórica e Hematoencefálica. Fonte: Adaptado de Harrison-Brown, Liu, Banati¹⁴.

Esta capacidade de barreira fortemente restritiva permite que as células endoteliais regulem rigorosamente a homeostase do SNC, o que é crítico para permitir a função neuronal adequada, assim como protegê-lo de toxinas, agentes patogênicos, inflamação, lesões e doenças¹⁵.

A natureza restritiva da BHE se torna um obstáculo para a entrega de medicamentos para o SNC, por isso houveram grandes esforços para gerar métodos de modular a BHE para entrega terapêutica¹⁵. A perda de algumas ou mais dessas propriedades de barreira durante doenças neurológicas acaba se tornando um componente importante na patologia e progressão dessas enfermidades^{12; 13}.

1.4. ENCEFALITES E MENINGITES

Infecções do SNC acometem milhões de indivíduos todos os anos, e são responsáveis por alta morbidade e mortalidade em todo o mundo¹⁶. Embora diversos tipos de agentes possam causar essas infecções, os vírus são as causas mais comuns¹⁷. As infecções fúngicas (como criptococose) e bacterianas (como

tuberculose, sífilis, etc.), entretanto, são geralmente mais problemáticas em pacientes imunodeprimidos¹⁷.

Infecções no SNC, dependendo do local acometido, são designadas como encefalites, meningites ou meningoencefalites^{18;19}. Encefalite é a inflamação do parênquima cerebral, que geralmente se manifesta como uma síndrome aguda do SNC (alteração comportamental, déficit neurológico focal, convulsão e coma). Esta pode ser causada por fungos, bactérias ou vírus (sendo estes últimos responsáveis por aproximadamente 90% dos casos)²⁰.

As meningites infecciosas, por sua vez, constituem um sério problema de saúde pública, fazendo parte do grupo de enfermidades de notificação compulsória no Brasil²¹. Na maioria dos países, esta notificação é mais direcionada para casos de meningite meningocócica^{22; 23}. A inflamação meníngea, associada ao aumento do número de células observadas no LCR, se refletem como cefaleia, febre, alteração do nível de consciência e sinais de irritação meníngea. Embora as meningites possam acometer o parênquima cerebral adjacente (meningoencefalite), o predomínio do quadro é secundário ao acometimento das meninges e do espaço subaracnoide^{19; 24; 25}.

O aspecto do LCR é geralmente límpido e translúcido nas meningites e encefalites virais (com menos de 500 células/mm³), mas no caso de agentes como os rubulavírus, mais especificamente no vírus da caxumba, pode haver um pouco de turbidez devido à quantidade de células (podendo chegar a 3.000 células/mm³). Na infecção pelo vírus da caxumba, o predomínio celular inicial é de neutrófilos, podendo alterar para linfomonocitário entre 6 a 48 horas. Devido a tais fatores, pode haver dúvida acerca do diagnóstico, uma vez que a interpretação do exame de LCR desta infecção pode ser facilmente confundida com meningites bacterianas, parcialmente tratadas pelo uso prévio de antibióticos^{26; 27; 28; 29}.

Dados clínicos da anamnese e exame físico, associados às técnicas de neuroimagem como tomografia computadorizada ou ressonância magnética são de grande auxílio para investigação neurológica nesses casos²⁰. Porém, a análise laboratorial a partir do LCR é fundamental para identificação precisa do agente causador, sendo esta a melhor opção para avaliação e confirmação etiológica dos casos de meningites e encefalites³.

As encefalites e meningites (EMs) tem distribuição global, variando em termos epidemiológicos de acordo com fatores ambientais e demográficos, como clima, densidade populacional, umidade, saneamento básico e infraestrutura adequada de saúde, além de fatores relacionados aos agentes microbianos, como prevalência e grau de virulência¹⁶. Apesar dos vírus serem a principal causa das EMs, não existem dados precisos quanto sua incidência. Embora alguns países (Estados Unidos, Finlândia, entre outros) tenham investigado a etiologia viral da população com acometimento do SNC (figura 6), existem poucos estudos relacionadas à prevalência e incidência dos mesmos no Brasil^{20; 30}. Dentre estes poucos estudos, destacam-se dois importantes estudos no Brasil, um deles mostrou que os herpesvírus (HSV, CMV, EBV, VZV e HHV-6) podem ser os principais agentes envolvidos, seguidos pelos enterovírus³¹. Por outro lado, Santos³² definiu os enterovírus como principais agentes causadores de meningites assépticas em um grupo de amostras provenientes do Hospital Universitário da Universidade de São Paulo (HU/USP). Ainda assim, nem sempre o agente etiológico é identificado, levando a uma grande porcentagem de subnotificações.

Figura 6. Distribuição mundial das encefalites e meningites em relação aos principais agentes etiológicos. Legenda: EV (Enterovírus), HSV (Herpesvírus Simplex), VZV (Vírus Varicela Zoster), WNV (vírus do oeste do Nilo), BKV (vírus BK). Fonte: Adaptado de Boucher et al.³⁰.

Há indícios de que o vírus dengue (flavivírus) possa estar se tornando um dos principais agentes etiológicos das encefalites virais agudas em regiões endêmicas e/ou durante epidemias³³, o que reflete exatamente a situação atual do Estado de São Paulo.

1.5. AGENTES VIRAIS NEUROTROPICOS

Os vírus podem invadir o organismo por diferentes vias, como por exemplo via respiratória, via oral, sexual, por inoculação através de picadas de insetos hematófagos e via transplacentária³⁴.

Em se tratando da maioria das infecções virais, sabe-se que, após a exposição do indivíduo ao microrganismo, ocorra a amplificação do mesmo levando a viremia. Ao se disseminar pelo restante do organismo, o que geralmente ocorre por

via hematológica, normalmente provoca doenças sistêmicas, não acometendo necessariamente o SNC^{34; 35}.

Os vírus têm acesso ao SNC por diferentes mecanismos. Em algumas situações as partículas virais atravessam a BHE, por meio de leucócitos infectados e então infectam as células do endotélio vascular e células da glia, ou ainda por via nervos espinhais e cranianos^{10; 35}.

Os danos neurológicos causados por estes agentes não ocorrem apenas pela indução de lise dos neurônios e células da glia, mas também por apoptose. Como consequência, pode haver danos na BHE, provocando uma série de eventos como por exemplo uma resposta autoimune às células específicas, induzindo a expressão de genes virais e reprimindo a expressão de genes celulares; dependendo do caso, pode causar fusão celular, alterando a migração neuronal, atenuando a replicação dos progenitores neurais, e bloqueando a produção e o fluxo do LCR^{10; 35}.

O grau da disfunção cerebral varia de acordo com o local da infecção, o agente infeccioso e a resposta imune do indivíduo¹⁸. No cérebro, a resposta inata é fundamental no estabelecimento da imunidade protetora, e as defesas montadas por essas células são as primeiras a tentar estabelecer algum controle sobre o agente infeccioso. No entanto, a imunidade inata e seu impacto subsequente nas respostas adaptativas também podem contribuir para a imunopatologia induzida por vírus que pode se manifestar como doença neurológica inflamatória³⁶.

Dentre os principais agentes infecciosos que acometem o SNC, destacam-se alguns vírus, os quais serão detalhados a seguir.

a) Herpesvírus simples (HSV) 1 e 2

Os primeiros herpesvírus humanos descritos foram os HSV³⁷. São vírus ubíquos, grandes, envelopados, pertencentes à ordem *Herpesvirales*, família

Herpesviridae, subfamília *Alfaherpesvirinae*, gênero *Simplexvirus*, espécie 1 e 2 (HSV1 e HSV2)^{38; 39; 40}. Estes possuem características semelhantes aos outros membros da família *Herpesviridae*, como morfologia, ciclo replicativo e capacidade de estabelecer infecções latentes por toda a vida do indivíduo. Estes vírus podem permanecer quiescentes, e estabelecem latência em neurônios. Tais vírus, ao serem reativados, causam lesões que podem se localizar no sítio da infecção primária inicial ou próxima a ele, produzindo infecções líticas, com ciclo replicativo curto^{37; 39; 41}.

As partículas dos HSV apresentam por volta de 186 nm de diâmetro, podendo chegar a cerca de 240 nm de diâmetro incluindo as espículas do envelope. São vírus de DNA (ácido desoxirribonucleico) fita dupla linear com aproximadamente 152 kpb³⁷. O DNA é envolvido por um capsídeo icosaédrico contendo 162 capsômeros, sendo 150 hexaméricos e 12 pentaméricos, e não está localizado simetricamente no centro do envelope viral⁴². A partícula viral apresenta uma camada amorfa denominada de tegumento, constituída de proteínas importantes para a regulação do ciclo replicativo viral, e um envelope lipoproteico com glicoproteínas e poliaminas inseridas em sua superfície⁴².

HSV-1 e HSV-2 apresentam um elevado grau de similaridade, tanto nas suas manifestações clínicas quanto em seu aspecto molecular⁴³. Estes dois vírus possuem identidade de aproximadamente 40% das regiões do DNA^{44; 45; 46}. O genoma codifica aproximadamente 80 proteínas e 11 glicoproteínas, no entanto nem todas são necessárias para a replicação viral. Algumas possuem função de facilitar a interação com diferentes células hospedeiras e, ainda, modular a resposta imune do hospedeiro⁴⁷.

A replicação inicia-se pela penetração dos HSV na célula do hospedeiro por meio da ligação do vírus aos receptores GAG (glicosaminoglicanos), principalmente sulfato de heparana, nectina 1, 3-OSHS (sulfato de heparana modificado) e HVEM

(receptor mediador de entrada de herpesvírus) na superfície da célula. Após a adsorção, o complexo fusogênico, formado pelas glicoproteínas gD, gB, gH e gL, é ativado. Então, ocorre a fusão direta do envelope viral com a membrana citoplasmática celular, liberando o nucleocapsídeo no citoplasma, junto com aproximadamente 20 proteínas do tegumento. O nucleocapsídeo é, então, transportado pelos microtúbulos até a membrana nuclear³⁷. Outro mecanismo de penetração viral ocorre por endocitose, após ligação aos receptores celulares. Com a ativação do complexo fusogênico, ocorre a fusão do envelope viral com a membrana endocítica, havendo a liberação do nucleocapsídeo no citoplasma e o transporte e até o núcleo³⁷.

Os HSV 1 e 2 são responsáveis por herpes labial e genital, respectivamente^{32;48}. Após a entrada do vírus por microfissuras na pele ou mucosa, ocorre a replicação em células epiteliais próximas à lesão. Estes, após a replicação se disseminam por via hematológica ou neural³², permanecendo em estado de latência nos gânglios de nervos cranianos ou na medula⁴⁸. O período de incubação do HSV varia entre 2 a 26 dias, mas na maioria dos casos as lesões surgem de 4 a 6 dias após a contaminação⁴⁹. A infecção primária dura de 2 a 3 semanas, porém a dor pode persistir por ainda 6 semanas. Já em caso de manifestações recorrentes, as lesões podem regredir em 12 dias³⁷.

Até recentemente, o HSV-2 era considerado o principal agente do herpes genital. Entretanto, a detecção do HSV-1 em lesões genitais vem aumentando expressivamente, provavelmente pela prática de sexo oral. Mesmo assim, continua sendo menos comum do que o HSV-2³⁷.

As infecções causadas pelo HSV são extremamente comuns, podendo variar desde infecções simples até extremamente graves. Neste último caso, o vírus pode acometer o SNC, comprometendo extensamente o encéfalo, ocorrendo sequelas em

80% dos pacientes acometidos²⁷. A evolução para o coma nesses casos se dá de forma muito rápida⁵⁰.

A encefalite por HSV-1 apresenta letalidade de 70% entre os pacientes não tratados³². A doença pode se desenvolver tão logo após a infecção primária ou a partir de infecções recorrentes, por reativação do vírus latente^{51;52}. O HSV-2 está mais associado a casos de meningite^{51;52}, com alto índice de complicações neurológicas, sendo que 35% dos pacientes acometidos desenvolvem tais complicações³². Somente nos Estados Unidos, estima-se que a incidência anual de encefalite pelo HSV seja de aproximadamente um caso para cada 247.000,00, enquanto na Suécia, estima-se um caso por 400.000,00 indivíduos e na Áustria, um caso para cada 500.000,00 indivíduos (revisado por Pessa⁵³).

b) Vírus Varicela Zoster (VZV)

São também conhecidos como Herpesvírus Humano 3 (HHV-3), pertencem à ordem *Herpesvirales*, família *Herpesviridae*, subfamília *Alfaherpesvirinae*, gênero *Varicellovirus*. Assim como os demais herpesvírus, estes são vírus ubíquos, grandes e envelopados. Também se caracterizam pelas infecções líticas, ciclo replicativo curto e por estabelecer infecção latente persistente em células neuronais³⁷.

A partícula do VZV mede de 180 a 200 nm de diâmetro, com genoma linear de DNA dupla fita, que codifica aproximadamente 69 proteínas. Possui um tegumento proteico, o qual separa o capsídeo do envelope lipídico, composto por espículas glicoproteicas⁵⁴.

O genoma do VZV foi o primeiro dentre os herpesvírus a ser totalmente sequenciado em 1986 no Reino Unido por Davison e Scott⁵¹. O DNA apresenta 125k pb^{54;55}.

A replicação do VZV ocorre de forma semelhante ao HSV, porém com algumas particularidades. Uma das diferenças é a ausência da gD no VZV. O vírus pode realizar a entrada por fusão direta na superfície da célula, com auxílio de apenas de 4 glicoproteínas, sendo elas a gB (ligação com heparan), gH e gL e gE. Após o processo de fusão, o nucleocapsídeo é transportado ao longo dos microtúbulos até a membrana nuclear, onde o DNA viral é liberado. Existe um mecanismo de entrada alternativo em alguns tipos de células, onde o vírus entra na célula por endocitose, ocorre a fusão do envelope viral com a membrana endocítica (exercida pela gH) e transcorre da mesma forma até chegar ao núcleo⁵⁶. Pode ainda haver fusão das células infectadas (formação de sincícios) mais eficientemente que o HSV, através das glicoproteínas gH e gE. Com isso, especula-se que a ausência da gD seja responsável por esta diferença no comportamento biológico do VZV⁵⁴.

A infecção primária pelo VZV é denominada varicela ou catapora e nos casos de recidiva cutânea, herpes-zoster. A primo-infecção geralmente ocorre na infância, causando febre e lesões cutâneas que rapidamente se transformam em vesículas³².

A doença tem início pela infecção das membranas mucosas do sistema respiratório superior do hospedeiro suscetível através de secreções respiratórias, ou ainda pelo contato direto com o líquido das vesículas de um indivíduo infectado, estabelecendo posteriormente uma infecção latente. Em diversas situações em que ocorre um declínio da imunidade celular específica contra o VZV pode ocorrer reativação da replicação viral, com possibilidade de manifestação clínica (herpes-zoster)⁵⁷.

As principais complicações da varicela incluem pneumonia, ataxia cerebelar e encefalite. O VZV faz latência nos nervos cranianos, gânglios do sistema nervoso autônomo e raízes dorsais, podendo se propagar para medula espinhal e cérebro, caso reativado⁵⁸. Geralmente, o herpes-zoster está associado a síndromes

neurológicas, como encefalite aguda ou crônica, mielite, neuropatias motoras, paralisia de nervos cranianos e periféricos, entre outras síndromes, onde apenas 1,1% apresentam erupções cutâneas⁵⁹.

Embora o VZV possa causar encefalite em imunocompetentes, infecções oportunistas são mais comuns em pacientes imunocomprometidos³¹. De acordo com um estudo de metanálise sobre encefalites, o VZV é a segunda causa de encefalite asséptica em países desenvolvidos, sendo precedido apenas pelo HSV³⁰.

c) *Herpesvírus humano 6 (HHV-6)*.

Os HHV-6 pertencem à ordem *Herpesvirales*, família *Herpesviridae*, subfamília *Betaherpesvirinae*, gênero *Roseolovírus*^{55; 60}. Este gênero possui duas variantes HHV-6A e HHV-6B⁵⁵. As variantes compartilham cerca de 95% de identidade no nível de nucleotídeo⁶⁰. O genoma do HHV-6 é linear e constituído de DNA de dupla fita com 159 a 170 kpb contendo aproximadamente 100 genes^{55; 61}.

Os vírions maduros possuem de 170 a 200 nm de diâmetro⁶⁰, contendo um capsídeo com simetria icosaédrica com 90 a 110 nm, um envelope lipídico, no qual as glicoproteínas virais são incorporadas, e o tegumento proteico que ocupa o espaço entre nucleocapsídeo e envelope^{55; 62}.

O ciclo de replicação do HHV-6 inicia quando o vírus adsorve à superfície celular através da interação da gH viral com o receptor CD46, presente na membrana de células nucleadas, e, então, ocorre a fusão do vírus à célula⁶³. Após a fusão do envelope viral à membrana celular, o nucleocapsídeo é transportado do citoplasma aos poros nucleares pelos microtúbulos, onde o DNA viral é finalmente liberado para o núcleo⁶².

A infecção primária com HHV-6B é comumente assintomática^{60; 64}, podendo causar exantema súbito também conhecido por roséola *infantum*, uma doença comum em crianças que provoca febre alta, diarreia e erupções cutâneas leve (exantema) no tronco, pescoço e face^{60; 65}. Praticamente todas as crianças são infectadas pelo HHV-6, com isso a maioria dos adultos são soropositivos⁶⁵.

O HHV-6 infecta preferencialmente linfócitos T CD4+, mas também pode infectar, com menor eficiência, macrófagos, células dendríticas, fibroblastos, células epiteliais e progenitoras da medula óssea, fígado, glândulas salivares e células endoteliais⁶⁰.

Em geral, a transmissão acontece de maneira horizontal através do contato íntimo com os pais, médicos e profissionais da saúde no momento do nascimento, pois é relativamente comum a presença de DNA viral na saliva, lavado de garganta de crianças e suas mães, assim como de outros adultos saudáveis, sugerindo a transmissão horizontal pela saliva. Outra forma de transmissão seria a transplacentária, uma vez que o DNA do vírus já foi encontrado em fetos e em sangue de neonatos⁶⁰. Também já foi detectado o DNA viral no trato genital feminino, incluindo a cérvix, sugerindo a transmissão vertical durante a passagem do bebê pelo canal vaginal⁶⁰.

Após a infecção primária, o HHV-6 persiste nas glândulas salivares, células do sistema imunológico (como monócitos e macrófagos) e tecido cerebral (microglia, astrócitos e oligodendrócitos)⁶⁶. Trata-se de um vírus com baixa patogenicidade, porém com potencial neurovirulento⁶⁸. Assim, o estado de imunossupressão em indivíduos, seja por infecção concomitante ou estado de estresse, pode levar à reativação do vírus e consequentemente à várias complicações, incluindo encefalite ou meningoencefalite^{65; 68; 69; 70}.

Em 2005, alguns autores já defendiam a necessidade de avaliar a presença de HHV-6 em pacientes imunocompetentes com sintomatologia compatível com EMs e identificar métodos de diagnóstico mais eficazes e desta forma selecionar modalidades de tratamento mais direcionadas ao problema^{71; 72; 73}.

Há poucos casos na literatura a respeito de reativação do HHV-6 em imunocompetentes⁷⁰. Em um estudo compreendido entre os anos de 2003 e 2007 em Nova York - EUA (Estados Unidos da América), Tavakoli et al.⁶⁵ encontrou 26 (1,75%) de 1482 amostras de LCR de pacientes imunocompetentes com sintomatologia compatível com encefalite, positivos para HHV-6. Posteriormente, Yao et al⁷⁰. demonstraram títulos altos de IgG e IgM para HHV-6 em pacientes com encefalite em comparação com outras doenças neurológicas. Além disso, detectaram DNA do HHV-6 no LCR de 40% (14/35) dos pacientes imunocompetentes diagnosticados com encefalites de etiologia desconhecida, enquanto nada foi encontrado nos pacientes controle ou com outras doenças neurológicas recidivantes.

Por outro lado, há um aumento crescente de estudos em relação a detecção do HHV-6 em adultos imunodeprimidos, como por exemplo portadores de HIV^{64; 74; 75}, transplantados^{76; 77; 78; 79} e pacientes em quimioterapia^{80; 81}, todos com sintomas compatíveis com encefalite.

d) *BK vírus (BKV) e JC vírus (JCV)*

Os BKV e JCV são vírus humanos amplamente distribuídos na população, pertencentes a família *Polyomaviridae*, gênero *Polyomavirus*⁸².

Em 1971, dois grupos distintos de pesquisadores isolaram estes vírus em cultura de células, sendo que um grupo isolou BKV através da urina de um paciente transplantado renal com diagnóstico de estenose uretral. O outro grupo isolou JCV de tecido cerebral de um paciente com linfoma de Hodgkin que desenvolveu

leucoencefalopatia multifocal progressiva (LEMP), uma doença desmielinizante e progressiva do SNC^{83; 84}. Os nomes dos vírus referem-se às iniciais dos pacientes dos quais os vírus foram isolados⁸⁴.

O JCV e o BKV são pequenos com 40 a 45 nm de diâmetro, não apresentam envelope, possuem um capsídeo icosaédrico com 72 capsômeros pentaméricos e genoma composto por DNA circular de fita dupla com cerca de 5 kb^{82; 85}. O genoma é dividido em três regiões: I) precoce: cujos genes codificam proteínas não-estruturais chamadas de antígeno T grande e antígeno t pequeno⁸⁶; II) tardia: a qual codifica as proteínas estruturais de capsídeo VP1, VP2 e VP3 e ainda agnoproteína⁸⁷; e III) região não-codificadora: que regula a replicação do DNA, transcrição do RNA (ácido ribonucleico)⁸⁸.

A organização e a estrutura destes vírus são muito semelhantes, apresentando cerca de 72% de similaridade no nível de DNA e 68% no nível proteico^{89; 90}. Apresentam baixa variabilidade genômica e alta resistência no meio ambiente^{89; 90}.

O ciclo replicativo dos poliomavírus inicia quando a proteína VP1 do capsídeo viral interage com receptores específicos presentes nas células suscetíveis, dando início a entrada da partícula viral por endocitose⁸⁵. Segundo alguns autores, as proteínas glicosílicas, abundantemente expressas na superfície celular, funcionam como receptores para VP1. A partir daí, o endossomo libera o víron no citoplasma. Esta por sua vez migra para o compartimento nuclear por meio de poros presentes na membrana do núcleo⁸⁶.

A infecção primária por ambos os vírus normalmente é assintomática e ocorre durante a infância (1 a 6 anos) ou adolescência, provavelmente por vias oral e respiratória^{89; 90}. Cerca de 70 e 80% da população adulta mundial é soropositiva para JCV e BKV respectivamente⁸⁹.

O BKV é responsável por uma infecção subclínica que persiste nos rins de indivíduos imunocompetentes, porém, quando se trata de imunocomprometidos, a reativação viral pode causar complicações como a nefropatia associada ao BKV^{91, 92}. Este vírus tem os rins como principal sítio de latência. Porém, outros órgãos como tonsilas, pulmões, e outros já foram descritos como possíveis sítios adicionais^{93; 94}.

O JCV é o agente causador da LEMP. Este vírus também faz latência nos rins e infecta predominantemente as células da glia, no SNC^{95; 96}.

O JCV era o único poliomavírus humano conhecido por ter a capacidade de infectar o SNC. No entanto, há um corpo crescente de evidências que favorecem o possível neurotropismo do BKV, uma vez que o DNA de BKV já foi detectado no tecido cerebral e LCR de indivíduos imunocompetentes e imunocomprometidos (principalmente adultos), com ou sem sintomas neurológicos^{90; 95; 97; 98}.

Além disso, há relatos sobre a presença de DNA de JCV e BKV em linfócitos B de indivíduos infectados e não infectados pelo HIV, o que sugere que os poliomavírus são linfotrópicos^{99; 100}. Esses dois vírus compartilham a capacidade de reativação da latência em seu hospedeiro sob imunossupressão e podem infectar tecidos adicionais quando reativados⁸⁹.

Um estudo avaliou 3 grupos diferentes de pacientes, um grupo de pacientes HIV positivos e negativos com suspeita de encefalite ou meningite, outro de pacientes apenas com sintomatologia compatível de encefalite e meningite, e o terceiro era o controle (coleta de LCR para mielografia). Interessantemente, os autores encontraram o BKV em 4,5% e JCV em 2,8% apenas nos pacientes HIV negativos com sintomas compatíveis com encefalite e meningite. Já no grupo controle, não foram detectados nenhum dos dois vírus⁹⁵.

Outro estudo realizado por Antonioli, Borges e Goldani¹⁰¹ reportou a presença de BKV em dois pacientes HIV positivos, e descreveu que os sintomas mais comuns

aos dois pacientes foram dor de cabeça, convulsões, deterioração mental progressiva, disartria, alucinações e distúrbios visuais.

Estes estudos sugerem que o BKV pode estar associado a doenças neurológicas em pacientes imunocompetentes e imunocomprometidos. E que a detecção do DNA do BKV e JCV no LCR de pacientes com suspeita de EMs indica que esses vírus possam ter um papel etiológico, podendo ser consequência de infecção primária, ou ainda a mais provável devido à reativação do vírus latente após infecção prévia do SNC. Ainda, os autores alertam que testes diagnósticos para o BKV e JCV devem ser incluídos no programa de investigação para pacientes com EMs^{95; 101}.

e) *Flavivírus*

O *Flavivírus* é o maior gênero de vírus pertencente à família *Flaviviridae*, o qual compreende mais de 70 vírus. Grande parte destes vírus são patógenos humanos e muitos, transmitidos por artrópodes¹⁰².

Vários membros do gênero *Flavivírus* são altamente patogênicos para humanos e constituem grandes problemas de saúde pública, como o vírus da dengue (DENV), vírus da febre amarela (YFV), vírus do Nilo Ocidental (WNV), vírus da encefalite japonesa (JEV), vírus da encefalite de Saint Louis (SLEV), vírus Rocio (ROCV) e o vírus do Vale do Murray^{35; 103; 104; 105}.

A partícula viral dos flavivírus mede entre 40 e 60 nm de diâmetro, possui capsídeo proteico, com simetria icosaédrica, envolvido por um envelope lipídico onde estão inseridas pequenas proteínas de membrana e espículas glicoproteicas¹⁰⁶. O genoma dos flavivírus é composto por uma fita simples de RNA linear de sentido positivo com 11 kb¹⁰². Todos esses vírus compartilham organização genômica e estratégia de replicação similares¹⁰⁷.

O ciclo replicativo inicia quando as partículas virais são internalizadas por endocitose mediada por receptor e carregadas para os endossomos iniciais, onde o ambiente ácido induz a fusão entre o vírion e a membrana do hospedeiro resultando na liberação do genoma. Vale ressaltar que os flavivírus podem utilizar múltiplos receptores de diferentes tipos celulares e hospedeiros¹⁰⁷.

Após a liberação do RNA genômico no citoplasma celular, este serve como RNA mensageiro (RNAm) e é traduzido em uma poliproteína que, posteriormente, é clivada gerando proteínas estruturais e não estruturais. Após a tradução, um complexo de replicação é montado e associado a membranas induzidas por vírus, onde ocorre a replicação viral¹⁰⁶.

Segundo Karabatsos¹⁰⁸ (apud Casseb et al.¹⁰⁹), em 1942 a expressão *arthropod-borne virus* foi introduzida para descrição do grupo de vírus de animais que se propagavam em artrópodes e eram transmitidos biologicamente a hospedeiros vertebrados. Vinte anos depois, foi adotado o termo arbovírus para designação dos vírus que são mantidos na natureza em ciclos envolvendo vetores artrópodes hematófagos e hospedeiros vertebrados. A maioria dos arbovírus atualmente registrados encontra-se distribuída dentro de cinco famílias: *Togaviridae*, *Bunyaviridae*, *Reoviridae*, *Rhabdoviridae* e *Flaviviridae*¹¹⁰.

A transmissão ocorre quando o vírus presente na saliva de um artrópode infectado é transmitido para a corrente sanguínea do hospedeiro vertebrado através da picada. Dependendo do vírus, os sítios iniciais de replicação podem variar. A encefalite causada por flavivírus ocorre através da migração do vírus através da via hematológica até o SNC¹⁰².

Dentre os flavivírus que causam encefalite e ou meningite, citados anteriormente, destacam-se o WNV, DENV, e SLEV e ROCV, os quais já foram relatados na América do Sul.

O WNV foi isolado em vários países sendo reconhecido como o flavivírus mais difundido, com ampla distribuição geográfica. Este vírus causa uma doença chamada de Febre do Nilo Ocidental, que é uma enfermidade reemergente, com um caráter zoonótico, e surgiu em regiões temperadas da Europa e da América do Norte¹¹¹.

Em 2010, um grupo de pesquisadores alertou que o WNV poderia ser uma causa potencial de infecção do SNC no Brasil, uma vez que este país, além de possuir muitos vetores para a disseminação da doença, é ainda vizinho da Argentina, onde naquele momento havia circulação do vírus¹¹². Em 2013, foi instaurado um programa de vigilância sentinela de encefalite viral onde se estabeleceu um protocolo para detectar molecular e sorologicamente os vírus herpesvírus, enterovírus e arbovírus¹¹³.

No início de 2014, outro alerta foi efetuado pelos pesquisadores Figueiredo e Figueiredo¹¹⁴, que sinalizaram que o governo brasileiro deveria melhorar a vigilância dos vírus SLEV, ROCV e WNV, incentivando os médicos a incluir os flavivírus e outros arbovírus em seu diagnóstico diferencial de doença febril aguda e meningoencefalite evitando que a ideia errônea de que essas doenças não existem no Brasil se perpetue. No mesmo ano, o primeiro caso de WNV no Brasil foi notificado, um trabalhador rural 52 anos do município de Aroeiras do Itaim, estado do Piauí, apresentou sintomas clínicos compatíveis com encefalite aguda, tendo sido confirmado o diagnóstico de WNV¹¹³.

Apesar da notificação obrigatória de casos suspeitos de doença WNV no Brasil, é possível que casos esporádicos ou pequenos surtos de WNV já tenham ocorrido em outras regiões do país e permaneçam sem diagnóstico pela falta de um sistema de vigilância sentinela sindrômico de encefalite viral em humanos em outras regiões, a sobreposição dos sintomas neurológicos atribuíveis a várias outras

infecções virais do sistema nervoso central, além das limitações na disponibilidade de recursos diagnósticos na maioria dos hospitais brasileiros¹¹³.

Quase 44.000 casos de febre do Nilo Ocidental foram relatados nos Estados Unidos desde 1999. Desses casos, mais de 20.000 pessoas tiveram infecções do cérebro ou da medula espinhal e mais de 1.900 pessoas morreram¹¹⁵.

Em 2017, o WNV voltou a circular no Estado do Piauí. De acordo com dados da Secretaria de Estado da Saúde do Piauí - SESAPI¹¹⁶, foram notificados 10 casos suspeitos e uma morte que pode ter sido causada pelo vírus. Em todos os exames, verificou-se reação cruzada com pelo menos um outro flavivírus, tais como DENV e SLEV. Dessas notificações, confirma-se um óbito de paciente residente em Teresina/PI.

Embora qualquer pessoa possa se infectar com o WNV, algumas pessoas correm um risco maior de complicações neurológicas. Por exemplo, pessoas com mais de 50 anos, ou com algum tipo de depressão imunológica¹¹⁵.

A maioria das pessoas (70-80%) que se infectaram com o vírus do Nilo Ocidental não apresentam nenhum sintoma. Aproximadamente 1 em cada 5 pessoas infectadas desenvolverá algum sintoma, como por exemplo dor de cabeça, dores no corpo e nas articulações, febre, vômitos, diarreia ou erupção cutânea. A maioria das pessoas se recupera completamente, mas a sensação de cansaço e fraqueza pode durar de semanas a meses. Menos de 1% dos infectados desenvolverão uma doença neurológica grave, como encefalite ou meningite, cujos sintomas podem incluir dores de cabeça, febre alta, rigidez do pescoço, desorientação, coma, tremores, convulsões ou paralisia¹¹⁵.

O vírus da dengue (DENV), por outro lado, é amplamente distribuído em países tropicais e subtropicais, infectando cerca de 390 milhões indivíduos anualmente, dos quais 96 milhões vão manifestar algum sintoma, independente da

gravidade da doença^{23; 29}. Estima-se que 3,9 bilhões de pessoas, em 128 países, estão sob risco de infecção por DENV²³.

Embora menos comum, há relatos crescentes de encefalites e mielites por DENV devido ao seu tropismo por células do SNC^{23; 29}. Um estudo descreveu que em 41 casos de dengue com manifestações neurológicas, 25 demonstraram acometimento encefálico¹¹⁷.

No Estado de São Paulo há a circulação dos 4 sorotipos de dengue simultaneamente aumentando a probabilidade de infecção secundária e, portanto, de quadros clínicos diferenciados¹¹⁸.

No Estado de Goiás um trabalho descreveu que de 498 casos confirmados de dengue durante o período epidêmico de janeiro de 2005 a julho de 2006, cerca de 5,6% apresentavam manifestações neurológicas. Estas manifestações incluíram parestesia (3,8%), encefalite (2%), encefalopatia (1%), convulsão (0,8%), meningoencefalite (0,4%) e paresia (0,4%)¹¹⁹.

O diagnóstico laboratorial de doenças febris agudas indiferenciadas durante períodos epidêmicos é frequentemente direcionado para dengue e febre amarela no país, dificultando a detecção de outros arbovírus possivelmente circulantes, incluindo o vírus da encefalite de Saint Louis (SLEV), que é amplamente disperso nas Américas¹²⁰.

O SLEV provoca uma doença neuroinvasiva grave, frequentemente envolvendo encefalite, ocorrendo mais comumente em adultos mais velhos. Os sintomas iniciais incluem febre, dor de cabeça, náusea, vômito e cansaço. As taxas de letalidade em casos graves podem chegar a 30% e estão associadas a danos diretos SNC¹²¹.

A infecção clínica do SLEV tornou-se mais frequente nos EUA e, em menor escala, na América Central e do Sul¹²¹.

Nos Estados Unidos, o número anual de casos relatados de doença neuroinvasiva pelo SLEV flutuou como resultado de epidemias periódicas, indo de 8 casos em 2007 para 19 casos em 2015, voltando a cair em 2017 para 7 casos¹²¹.

O SLEV reemergiu na Argentina em 2002 com 47 casos e, desde então, surtos foram relatados em 2005, 2006, 2010 e 2011¹²².

O primeiro relato de infecção humana no Brasil foi evidenciado no Pará, em 1970¹²³. Na década de 90, a detecção de anticorpos anti-SLEV, incluindo a soroconversão, foi relatada em residentes de uma reserva ecológica no Vale do Ribeira, região costeira do sul do Estado de São Paulo, Brasil¹²⁴. Em 2004, houve um caso na cidade de São Paulo - SP¹²⁴, dois anos depois houveram 20 casos em São José do Rio Preto - SP¹²⁵. E em 2014 um caso foi confirmado em um paciente suspeito de dengue de Ribeirão Preto - SP¹²⁶.

Em 2015, um grupo de pesquisadores do Mato Grosso (MT) realizou um trabalho de investigação molecular para verificar a presença de 11 flavivírus no soro de 604 pacientes durante grande epidemia de dengue naquele estado, entre 2011-2012. Concomitantemente, capturaram 3.433 fêmeas de *Culex spp.* na cidade de Cuiabá, MT e as dividiram em *pools* com 10 mosquitos cada. Neste estudo detectaram o SLEV em três pacientes co-infectados com o DENV-4, sendo que nenhum deles relatou histórico recente de viagem ou acesso a áreas rurais/silvestres, e um dos *pools* de *Culex spp.* foi positivo para o SLEV. A análise filogenética indicou que ambas as amostras formam um *cluster* com isolados do mesmo genótipo do SLEV obtidos de animais na região amazônica do estado do Pará. Este foi o primeiro relato de identificação molecular do SLEV no MT¹²⁰.

No mesmo ano, um estudo na cidade de São Paulo detectou a presença do SLEV em dois casos de encefalite atendidos no Hospital das Clínicas da Faculdade

de Medicina da universidade de São Paulo - HCFMUSP (Dra. Ester Sabino, comunicação pessoal).

Com isso, nota-se que o vírus está em circulação no Brasil e a infecção por ele pode não ser mais tão rara em humanos. Infelizmente, porém, ainda pode ser confundida com infecções causadas pelo DENV e por isso talvez seja sub-notificada¹²⁰.

Além destes flavivírus, o Rocio vírus (ROCV) também assume grande importância, uma vez que faz parte da lista dos responsáveis por 95% dos casos de EMs por arbovírus¹²⁷. O ROCV foi isolado pela primeira vez em 1975, de um caso humano fatal durante uma epidemia de encefalite na região do Vale do Ribeira - SP. A epidemia durou 7 anos (1973 a 1980), cerca de 1000 casos de encefalite foram relatados com uma taxa de mortalidade de 10%, e entre os sobreviventes, 200 obtiveram sequelas de motilidade ou equilíbrio¹²⁸.

Os sintomas iniciais da infecção pelo ROCV são febre, cefaleia, anorexia, náusea, vômito, mialgia e mal-estar, podendo progredir para sintomas tardios indicativos de encefalite, como confusão mental, distúrbios motores, irritação meníngea, síndromes cerebelares e convulsões. Outros sintomas incluem distensão abdominal e retenção urinária. As sequelas variam de distúrbios sensitivos e motores a distúrbios de equilíbrio, disfagia, incontinência urinária e problemas de memória¹²⁹.

Embora não tenha ocorrido outros surtos subsequentes, houveram evidências sorológicas da circulação do vírus em diferentes regiões do país. Em 2004, dois pássaros capturados na Região Sul do Brasil tinham anticorpos contra ROCV. Já em 2009 e 2010, de 760 amostras de sangue de equinos coletadas no Pantanal, 130 animais (17,1%) tinham anticorpos neutralizante contra ROCV¹³⁰.

Trinta e dois anos após o surto no Estado de São Paulo, dois pacientes portadores do HIV com meningoencefalite foram positivos para o ROCV por PCR

(reação em cadeia de polimerase), curiosamente os dois vivem no Estado de Amazonas, que fica a mais de 2000 km de onde o vírus foi isolado pela primeira vez¹¹⁴.

A epidemiologia da doença ainda permanece um mistério, assim como as causas de aparecimento e desaparecimento do ROCV, mas a possibilidade de uma nova epidemia tem motivado pesquisadores a buscar os mecanismos de infecção e invasão do SNC pelo ROCV. Até o momento, foi descoberto que o vírus infecta primariamente monócitos circulantes e macrófagos tissulares após sua inoculação pela picada do vetor¹³⁰.

Segundo Figueiredo¹²⁷, é provável que este vírus sempre tenha estado pelo Brasil produzindo casos esporádicos ou pequenos surtos que podem ter sido confundidos com dengue, pois além de sintomas semelhantes, outro fato a ser considerado é a existência de reação cruzada em testes sorológicos entre os flavivírus.

As doenças arbovirais são uma fonte contínua de doença grave e elevada morbidade e mortalidade a cada ano. Logo, fica evidente que existe a necessidade do aumento da vigilância e preocupação especial com arbovírus nos casos de encefalites agudas de etiologia desconhecida no nosso meio¹³¹.

f) *Virus da Influenza A (FLUVA)*

O FLUVA pertence ao gênero Influenzavirus A, família *Orthomyxoviridae*¹³². Esta família é composta por 7 gêneros: *Influenza A*, *Influenza B*, *Influenza C*, *Influenza D*, *Thogotovirus*, *Isavirus*, e *Quaranjavirus*, porém apenas os 3 primeiros infectam seres humanos¹³².

As partículas virais geralmente são esféricas e, algumas vezes, se apresentam de forma filamentosa. Medem aproximadamente de 80 a 120 nm de diâmetro, possuem capsídeo proteico com simetria helicoidal, envolvido por um envelope lipoproteico onde estão inseridas espículas glicoproteicas (hemaglutinina e neuraminidase - HA e NA, respectivamente, importantes na adsorção da partícula viral)^{133; 134}. Estas glicoproteínas estão sob constante pressão evolutiva e, por isso, possuem grande variabilidade genética. Já foram identificados 18 diferentes antígenos de H (H1-H18) e 11 diferentes N (N1-N11)¹³⁵. Dessa forma, a combinação entre diferentes fragmentos de HA e NA em um mesmo vírus resulta na formação de diferentes cepas do vírus¹³³.

O genoma do FLUV é de RNA de fita simples anti-senso, com cerca de 13.5kb e segmentado, apresentando oito segmentos que codificam 11 diferentes proteínas^{133; 136}.

O ciclo replicativo viral se dá quando a partícula viral se liga às células hospedeiras permissivas por meio da hemaglutinina, que se liga às glicoproteínas da membrana celular que contêm o ácido N-acetilneuramínico, receptor da adsorção do vírus. O vírus então entra por pinocitose em endossomos. O ambiente ácido do endossomo faz com que o envelope do vírus se funda com a membrana plasmática do endossomo, descolando o nucleocapsídeo e liberando-o no citoplasma^{131; 133; 134}.

Uma proteína transmembrana derivada do gene da matriz forma um canal iônico para que os prótons entrem no vírion e desestabilizem a ligação às proteínas, permitindo que o nucleocapsídeo seja transportado para o núcleo, onde o genoma é transcrito por enzimas virais para produzir RNAm viral^{133; 137}.

O vírus é transmitido através de aerossóis de secreções respiratórias ou pelo contato com fômites e superfícies contaminadas. Multiplica-se em células da mucosa respiratória, causando destruição celular e inflamação^{134; 137; 138}. A partir do sistema

respiratório superior, a infecção pode atingir o sistema respiratório inferior, por meio de viremia ou disseminação célula a célula, da mesma forma que pode atingir outros órgãos e tecidos, uma vez que o vírus já foi encontrado em fígado, baço, coração, glândulas adrenais, rins e meninges¹³⁴.

Além de sintomas respiratórios, o vírus Influenza pode estar associado a casos de encefalites. De fato, o FLUVA foi descrito como causa de 4% dos casos de encefalite na Finlândia e 7% dos casos na Suécia, não podendo ser descartada, portanto, sua importância nesse contexto⁵².

Em uma metanálise recente, foi levantado um total de 44 casos de encefalites associadas a influenza A em adultos ao redor do mundo, no período compreendido entre 1972 a 2015. Os sintomas mais prevalentes nessa casuística foram confusão mental e convulsões, presentes em 12 (27%) e 10 (23%) dos 44 casos, respectivamente. Ressonância magnética (RM) foi realizada em 21 pacientes e anomalias foram encontradas em 13 (62%), com lesões localizadas em todo o encéfalo. Neste estudo, os autores concluíram que muitos sintomas neurológicos diferentes podem estar presentes em pacientes com encefalite associada ao vírus Influenza. Portanto, o diagnóstico deve ser considerado em pacientes com febre, confusão e convulsões, principalmente durante as estações do ano em que há alta incidência de influenza¹³⁹.

g) *Enterovirus (EV)*

Os EV são classificados como membros da família *Picornaviridae*, ordem *Picornavirales*, que consiste em 15 espécies, dentre elas sete são capazes de infectar humanos, sendo eles os Enterovirus humanos A, B, C e D e Rhinovirus humanos A, B e C¹⁴⁰.

Estes vírus possuem forma esferoidal, com diâmetro de 25 a 30 nm, sem envelope glicoproteico e apresentam capsídeo de simetria icosaédrica, o qual é composto por 60 capsômeros. Cada capsômero é formado por 4 polipeptídeos estruturais, chamados de VP1, VP2, VP3 e VP4. Os três primeiros são externos, sendo o VP1 o mais superficial, onde se localiza o sítio antigênico mais importante, que é o sítio de reconhecimento do receptor celular^{141; 142}.

O genoma é constituído por RNA linear fita simples de polaridade positiva, variando de 7,2 a 8,4 kb de comprimento¹⁴².

A partícula viral permanece estável em pH baixo (3 a 9), permitindo sua passagem no trato gastrointestinal^{142; 143}.

A replicação do vírus ocorre inteiramente no citoplasma e se inicia quando o vírus é adsorvido aos receptores específicos distribuídos na superfície celular. Ao entrar na célula, ocorre o desnudamento e liberação do RNA viral no citoplasma por desestabilização do capsídeo. Uma vez no citoplasma, o RNA de polaridade positiva perde a proteína VPg, a qual é a iniciadora da síntese do RNA. Em seguida, ocorre a tradução do RNA viral, para a produção de proteínas essenciais para a replicação e a síntese de novas partículas virais^{141; 142}.

Após a síntese das proteínas, a replicação do RNA viral no retículo endoplasmático (RE) se inicia, com a síntese da fita complementar negativa pela RNA polimerase RNA dependente. As fitas de RNA de polaridade negativa vão servir de molde para as fitas positivas. Esse processo é complexo, e envolve a formação de intermediários como a forma replicativa (FR) e o intermediário de replicação, composto de uma fita negativa, parcialmente hibridizada com várias fitas positivas de RNA nascentes. Essas novas fitas podem servir como molde para a tradução de mais proteínas ou são encapsidadas para formação de novas partículas virais. As partículas virais são liberadas por lise celular^{141; 142}.

A transmissão desses vírus ocorre principalmente pela via fecal-oral. Portanto, essa transmissão se acentua em áreas com condições sanitárias precárias, enquanto a transmissão respiratória pode ser importante em áreas mais desenvolvidas. A importância relativa dos diferentes modos de transmissão, provavelmente, varia entre as espécies de enterovírus e as condições do ambiente¹⁴³;

¹⁴⁴.

Após a entrada do vírus no organismo, este infecta e se multiplica no epitélio faríngeo. Em seguida, passa para tecidos e órgãos linfóides regionais, sendo esta etapa crucial para o prognóstico da doença, que pode evoluir para uma infecção sistêmica ou pode ser contida pelo sistema imunológico. Neste último caso, onde ocorre o controle viral, a infecção evolui para um quadro assintomático. Caso contrário, a multiplicação no sistema linfático pode ser sucedida pela viremia primária, causando a disseminação viral pelo organismo^{143; 144}.

A partir daí diversos órgãos e tecidos podem ser infectados, estando este fato associado a um largo espectro de manifestações clínicas. No caso das infecções do sistema digestivo, os enterovírus podem resistir ao suco gástrico e bile, tendo acesso ao intestino, onde infectam e se multiplicam no epitélio intestinal e linfonodos mesentéricos e placas de Peyer¹⁴³.

As infecções por EV são uma importante causa de morbidade e mortalidade em todo o mundo¹⁴³. Embora a maioria das infecções causadas por EV sejam assintomáticas¹⁴⁵, estes são a causa mais comum de meningite viral nos Estados Unidos, com cerca de 75.000 casos anuais, especialmente do final da primavera ao outono, quando esses vírus se espalham com mais frequência¹⁴⁶.

Um estudo recente avaliou os dados clínicos de 46 pacientes com PCR positivos para enterovírus no LCR entre 2002 e 2017, e constatou que a meningite

foi a manifestação clínica mais comum (89%), seguida de encefalite (7%) e comprometimento isolado dos nervos cranianos (4%)¹⁴⁷.

h) *Vírus da Caxumba*

O vírus da caxumba pertence à família *Paramyxoviridae*, subfamília *Paramyxovirinae*, gênero *Rubulavirus*¹⁴⁰. A partícula viral é esférica, medindo de 100 a 300 nm de diâmetro, é constituída de capsídeo de simetria helicoidal, pleomórfico, envelope glicolipoproteico derivado da célula hospedeira, onde estão as glicoproteínas hemaglutinina e neuraminidase, a proteína de fusão e a de matriz¹⁴⁸.

O genoma é de RNA de fita simples, não segmentado de polaridade negativa, com aproximadamente 15,4 kb de comprimento¹⁴⁹.

A replicação do vírus ocorre no citoplasma da célula do hospedeiro e se inicia com a ligação da hemaglutinina e neuraminidase ao ácido siálico, na superfície da membrana celular¹⁴⁸.

Em seguida, a proteína de fusão faz com que o envelope viral se funda com as membranas plasmáticas em pH fisiológico. O nucleocapsídeo é, então, liberado no citoplasma. Por ter o genoma RNA de polaridade negativa, o primeiro evento após a penetração na célula é a transcrição de múltiplos RNAm. Este evento é mediado pela RNA polimerase RNA dependente^{148; 149}.

Os RNAm são traduzidos em proteínas, as quais são submetidas à modificações pós-traducionais. A seguir, o RNA viral de polaridade negativa é copiado em uma fita completa de RNA complementar de polaridade positiva, a qual serve como molde para síntese de novos RNA virais de polaridade negativa. Logo após, ocorre a montagem dos nucleocapsídeos e estes são transportados para a membrana citoplasmática, alinhados ao longo da superfície interna da célula, onde

estão posicionadas as glicoproteínas virais. As novas partículas virais são liberadas por brotamento, incorporando parte da membrana celular ao envelope viral^{148; 149}.

A transmissão deste vírus se dá por contato direto com secreções respiratórias proveniente de espirros e tosse, sendo a saliva uma das principais fontes de disseminação do vírus¹⁴⁹.

Após o período de incubação, que leva aproximadamente 18 dias, ocorre a replicação primária em células epiteliais do sistema respiratório superior, seguida da migração do vírus para os linfonodos regionais. Posteriormente, ocorre uma viremia transitória, com possível replicação em células T, resultando na disseminação do vírus para tecidos glandular e neural¹⁵⁰.

O vírus da caxumba é responsável por infecções sistêmicas agudas, que acometem principalmente crianças¹⁵¹. Apesar de raras, podem ocorrer complicações neurológicas mais graves como EM, ataxia cerebelar, paralisia facial, entre outros¹⁵². As encefalites nos casos de infecções por caxumba costumam ocorrer juntamente com a parotidite. Há casos em que a encefalite ocorre após uma ou duas semanas pós-parotidite, porém torna-se uma encefalite desmielinizante pós-infecciosa. Na Finlândia, cerca de 4% de adultos diagnosticados com encefalite tiveram o vírus da caxumba como possível agente etiológico¹⁵³. Apesar da recuperação da encefalite por caxumba ser geralmente completa, a mortalidade global é de 0,5 a 2,3%¹⁵¹.

Em populações não imunizadas, a caxumba é uma causa comum de meningite e encefalite asséptica. Cerca de 1% a 5% dos pacientes com parotidite desenvolverão EM¹⁵⁴.

1.6. DIAGNÓSTICO DE ENCEFALITE E MENINGITE VIRAIS

A avaliação dos sinais e sintomas presentes, testes de imagem e dados laboratoriais fazem parte do diagnóstico das EMs; entretanto, sem a detecção específica do agente infeccioso, o diagnóstico não pode ser concluído²⁶. A ressonância nuclear magnética, popularmente conhecida por RM crânio-encefálica, quando disponível para uso imediato, deve ser o primeiro exame realizado em pacientes com suspeita de encefalite viral, pois pode indicar a provável etiologia de acordo com o tipo de lesão^{155; 156}.

Geralmente, na RM evidenciam-se áreas confluentes de sinal hiperintenso nas imagens pesadas em T2 (tempo 2 de relaxamento), que são iso ou hipotensas em tempo 1 de relaxamento (T1), com efeito de massa variável. Focos hemorrágicos podem ser evidenciados, sendo facilmente identificados¹⁵⁵.

Infecções crônicas podem resultar em atrofia localizada ou generalizada. Estas alterações gerais são vistas nas encefalites virais, embora etiologias específicas possam demonstrar aspectos típicos, que ajudam na caracterização e no diagnóstico diferencial, como o exemplificado a seguir¹⁵⁵.

Na encefalite por HSV, é característico o envolvimento dos lobos temporal e frontal (temporal médio e orbitofrontal), o que traduz a via de transmissão do vírus ao longo do nervo olfativo e do nervo trigêmeo. A RM neste caso revela edema nas fases precoces, demonstrado por sinal hiperintenso nos lobos temporal e frontal inferior nas imagens pesadas em T2, associado a perda da diferenciação da interface entre as substâncias branca e cinzenta. Com a progressão da doença, captação de contraste e efeito de massa podem ser observados. Hemorragia também pode ser facilmente detectada à RM. Atrofia é uma sequela tardia comum¹⁵⁵. Já a tomografia computadorizada (TC) revela hipodensidade nos lobos temporais unilateral ou

bilateralmente, com ou sem envolvimento do lobo frontal. Hemorragia geralmente não é observada¹⁵⁷.

Existem relatos de pacientes com resultado normal de TC, mas que apresentavam resultados anormais na RM, indicando uma maior sensibilidade desta técnica. Quando os achados típicos de encefalite (por exemplo causada por HSV) são observados na tomografia computadorizada, eles geralmente estão associados a danos cerebrais graves e um prognóstico ruim¹⁵⁷.

O exame laboratorial do LCR também deve ser realizado para análise de parâmetros como dosagem de glicose, proteínas e contagem celular, tanto para as encefalites quanto para meningites. Nos casos de EMs virais, o LCR possui aspecto incolor e límpido e na contagem celular apresentam < 500 células/mm³, glicorraquia e lactato normais ou levemente diminuídos e hiperproteínorraquia (< 300 mg/dL), como reflexo da maior permeabilidade da barreira hematoencefálica^{18; 51; 105; 158}.

O exame do LCR é fundamental nas EMs assépticas, pois ele exclui quadros bacterianos e, conseqüentemente, o uso de antibioticoterapia²⁴. Porém, EMs por micobactérias e fungos podem apresentar LCR límpido e incolor, glicorraquia baixa, a celularidade e proteinorraquia elevadas, podendo haver confusão com EMs virais^{18; 51; 105}.

O diagnóstico diferencial ainda tem como padrão ouro o teste de coloração de Gram e isolamento do agente etiológico em meio de cultura e cultivo celular, apesar das limitações que essas técnicas impõem. Tais limitações incluem a sensibilidade, que depende do sorotipo, carga microbiana, cuidado com a manipulação e acondicionamento, bem como o tempo que pode levar para uma cultura se tornar positiva¹⁵⁹.

Outro método de diagnóstico utilizado é a pesquisa de anticorpos (IgM e IgG) para agentes suspeitos. A elevação de anticorpos, dependendo do agente, ocorre

após 1 a 3 semanas do início dos sintomas. A determinação da síntese intratecal de anticorpo específico contribui para o diagnóstico das infecções do SNC¹⁵⁸.

Os métodos moleculares, como a PCR convencional e a PCR em tempo real são os testes mais sensíveis e rápidos para identificação do agente causador, viral ou não^{18; 105}. A PCR em tempo real ainda possui vantagens sobre os métodos convencionais, como maior sensibilidade, quantifica o número de cópias do gene de interesse e dispensa a revelação da amplificação por eletroforese, o que diminui o tempo entre o preparo da reação e o resultado³².

A desvantagem da técnica de PCR é devido à especificidade intrínseca da reação, o que leva a não detecção de agentes cuja suspeita não é levantada, ou ainda, patógenos improváveis ou desconhecidos³².

A detecção de DNA viral no LCR pela PCR continua sendo a base para o diagnóstico de encefalite viral, embora os resultados destes testes laboratoriais possam ser falso-negativos ou possam chegar tardiamente. Por isso, não se pode deixar de lado a realização de uma boa anamnese verificando a época do ano em que aconteceu o início dos sintomas (período endêmico de certos vírus), se o paciente é ou não usuário de entorpecentes (cocaína), avaliação dos sinais e sintomas presentes, bem como os resultados dos exames de imagem, pois todos estes fatores são importantes para definir o diagnóstico e o tratamento destes pacientes com suspeita de EMs¹⁶⁰.

JUSTIFICATIVA

2. JUSTIFICATIVA

As encefalites e meningites (EMs) são responsáveis por morbidade e mortalidade consideráveis mundialmente, sendo os vírus os principais agentes causadores. Mais de 150 vírus diferentes foram relacionados a patogênese das EMs, porém, devido à ausência de testes laboratoriais que identifiquem de forma rápida e precisa o agente etiológico dentro do grande espectro de possibilidades, mais da metade dos casos permanecem desconhecidos.

De fato, no Brasil, o diagnóstico definitivo das EMs é realizado somente em alguns centros de vigilância, e ainda assim, para determinados testes são necessários vários dias ou semanas para a identificação e confirmação do patógeno. Além da evidente subnotificação da doença, essa deficiência se torna um grande obstáculo para a definição do tratamento adequado para o paciente. Assim, a identificação precisa do agente causador, em um curto espaço de tempo após o início dos sintomas, é de suma importância para uma intervenção mais rápida e precisa.

A identificação das EMs assépticas apresenta ainda uma dificuldade adicional. Para a identificação de agentes bacterianos, é comum a aplicação de testes rápidos e baratos, como coloração de Gram ou PCRs direcionados para o gene ribossomal 16S. Infelizmente, técnicas desse tipo não podem ser aplicadas a vírus, uma vez que os diferentes agentes virais não compartilham genes com similaridade suficiente para que um teste unificado seja aplicado. Avanços em neuroimagem, diagnóstico molecular, terapia antiviral e tratamentos imunomodulatórios foram alcançados nas últimas décadas, resultando em diagnósticos mais precisos e precoces para as EM assépticas. Entretanto, conhecendo-se as principais etiologias das encefalites e meningites virais (que

correspondem a maioria dos casos de EMs) em nosso meio, pode causar uma diminuição no intervalo entre a suspeita clínica e o diagnóstico.

Embora estudos dessa natureza sejam realizados em diversas partes do mundo, pouco se sabe sobre a incidência dos agentes virais envolvidos nessas enfermidades no Brasil. É sabido que condições climáticas, geográficas, econômicas e socioculturais impactam na presença e circulação de certos patógenos. Um exemplo é a maciça presença de artrópodes vetores de vírus e parasitas que faz com que nosso país seja endêmico para os quatro sorotipos de dengue, bem como nos últimos anos tenha sofrido com a emergência e reemergência de vírus com potencial neurotropismo.

Dessa forma, a busca por esse conhecimento em nosso meio é justificada. Esse estudo é importante não somente para o aumento do conhecimento dos possíveis agentes virais causadores de infecções do SNC até então negligenciados, mas também para o desenvolvimento de protocolos mais específicos e direcionados que respondam a necessidade do país.

OBJETIVO

3. OBJETIVO

3.1. OBJETIVO GERAL

Determinar a etiologia das encefalites e meningites assépticas em pacientes atendidos por dois diferentes centros de São Paulo, a Irmandade da Santa Casa de Misericórdia de São Paulo (ISCMSP) e o Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HCFMUSP).

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Investigar por técnicas de PCR a presença de material genético no LCR de indivíduos diagnosticados com encefalite e/ou meningite os seguintes agentes: vírus de DNA - Poliomavírus BKV e JCV, Herpesvírus simplex 1 e 2, Herpesvírus humano 6 e vírus Varicela Zoster; vírus RNA – Influenzavírus A, Enterovírus, vírus da Caxumba e Flavivírus;
- b) Desenvolver e padronizar técnicas moleculares de PCR em tempo real (qPCR) para identificação dos agentes infecciosos propostos;
- c) Identificar, através de sequenciamento em larga escala, a presença de agentes infecciosos no LCR de indivíduos com amostras consideradas negativas ou inconclusivas para os agentes investigados pelas PCRs convencional (PanHerpes) e tempo real.

METODOLOGIA

4. METODOLOGIA

4.1. DESENHO DO ESTUDO

Trata-se de um estudo de coorte, com 120 casos avaliados no período de agosto de 2012 a dezembro de 2015. Uma amostra de LCR de cada paciente com suspeita de meningite ou encefalite por avaliação clínica foi coletada e os dados relacionados à glicose, proteína e contagem celular foram obtidos em conjunto. As amostras de LCR foram coletadas, mediante indicação clínica, pelos médicos responsáveis. Os indivíduos selecionados foram adultos imunocompetentes ou imunodeprimidos, de ambos os sexos, provenientes do ISCMSP (45 pacientes) e do HCFMUSP (75 pacientes), que apresentaram quadro clínico de encefalite, meningite e/ou meningoencefalite.

4.2. CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

Foram incluídos no estudo apenas pacientes com suspeita de encefalite e meningite de LCR claro (LCR límpido e incolor), apresentando celularidade abaixo de 500 células/mm³.

4.3. CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO

- Pacientes com exames laboratoriais incompletos e/ou com testes positivos para agentes não virais (como bactérias e fungos);
- Amostras hemorrágicas e levemente turvas.

4.4. ASPECTOS ÉTICOS

O projeto foi aprovado pelo comitê de ética das instituições envolvidas, sob os números, 676.101 (Fundação Faculdade de Medicina - USP), 141.863 (HCFMUSP), 848.992 (ISCMSP). Todos os pacientes que aceitaram participar do projeto assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE). As amostras foram identificadas por números, preservando a identidade dos pacientes, inclusive em publicações (artigos, apresentações em seminários, e relatórios científicos).

4.5. COLETA E ARMAZENAMENTO DAS AMOSTRAS

As punções liquóricas foram realizadas pelos médicos neurologistas do ISCMSP, Dr. Michel Haziot e Dr. Augusto Cesar Penalva de Oliveira participantes do estudo, de acordo com todas as práticas internacionalmente aceitas. Já as amostras provenientes do HCFMUSP, foram cedidas pelas pesquisadoras Dras. Ester Sabino e Suzete Lombardi. Estas amostras foram coletadas para um projeto semelhante, porém não foram utilizadas, por excesso de amostras.

Cerca de 3 mL de LCR (amostra bruta) foi coletado de 120 pacientes com suspeita clínica de encefalite e meningite assépticas e armazenadas em tubo de polipropileno. As amostras foram processadas e aliquotadas em até 2 horas após a coleta, seguidas de armazenamento em freezer -80°C.

4.6. PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS PARA AS TÉCNICAS DE qPCR

a) *Controle interno*

As amostras foram “batizadas” com 10^4 partículas de cada um dos vírus: DNA Parvovirus canino (CPV) e do vírus RNA vírus da cinomose canina (CDV), os quais causam enfermidades apenas em cães. Ambos os vírus utilizados neste estudo foram obtidos do banco de células ATCC (American Type Culture Collection) cepa Cornell-780916-80 (CPV, ATCC VR-2017) e cepa Lederle (CDV, ATCC VR-128).

Esta etapa foi importante para detectar falhas nas etapas de extração de DNA e RNA virais através da realização de qPCR específico para cada um dos vírus batizados. Os *primers* utilizados na qPCR constam na tabela 1.

Tabela 1. Sequências dos *primers* utilizados para verificar o controle interno.

Agente	<i>primer</i>	Sequência 5'-3'	referência
CPV	Forward	AAACAGGAATTAAGTATACTAATATATTTA	161
	Reverse	AAATTTGACCATTTGGATAAACT	
CDV	CDV1	ACAGGATTGCTGAGGACCTAT	162
	CDV2	CAAGATAACCATGTACGGTGC	

b) *Extração dos ácidos nucléicos*

Os ácidos nucleicos presentes (tanto DNA, quanto RNA) nas amostras de LCR foram extraídos com a utilização do kit comercial NucleoSpin RNA Virus (MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG, Alemanha), conforme instruções do fabricante.

c) Quantificação e avaliação de purificação dos ácidos nucleicos

A quantificação e avaliação da qualidade dos ácidos nucléicos extraídos foram realizadas por espectrofotometria, através do Espectrofotômetro, NanoDrop™ 2000, UV/VIS, Thermo Scientific, EUA).

d) Síntese da fita complementar de DNA (cDNA)

A síntese de cDNA ocorre através da transcrição reversa (RT), que foi realizada utilizando o kit comercial *High-Capacity cDNA Reverse Transcription* (Thermo Fisher Científica, EUA). O RT *master mix* foi preparado no gelo (volume de 20µL por reação). Em um microtubo de 1,5mL, foi adicionado 5 µL de 10X RT Buffer; 2 µL de 25X dNTP Mix (100mM); 5 µL de 10X RT *Random Primers*; 2 µL de MultiScribe™ *Reverse Transcriptase* (50U/µL); 1 µL de RNA inibitor e 5 µL de água livre de nucleases. Foi acrescentado 20 µL do material extraído ao RT *master mix* e a reação se deu em termobloco com a ciclagem de 25°C por 10 minutos; 37°C por 120 minutos.; 85°C por 5 minutos.; 4°C ∞.

4.7. PADRONIZAÇÃO DAS qPCRs

A padronização dos testes para a investigação da presença do material genético dos agentes infecciosos foi realizada a partir de técnicas de PCR convencional e em tempo real, com *primers* específicos à região a ser amplificada de cada agente alvo do presente estudo (tabela 2).

Tabela 2. *Primers* específicos à região a ser amplificada de cada agente, alvo do presente estudo.

Agente	Região	Primer	Sequência (5'-3')	Referência
BKV / JCV	AgT	PEP1	AGTCTTTAGGGTCTTCTAC	163
		PEP2	GGTGCCAACCTATGGAACAG	
Flavivírus	NS5	Forward	GCMATHTGGTWCATGTGG	164
		Reverse	GTRTCCCAKCCDGCNGTRTC	
HSV-1 e 2	gB	HSV-FP	TTTCGGTACGAAGACCAG	165
		HSV-RP	AGCAGGCCGCTGTCCTTG	
HHV-6	MCP	HHV3	TTGTGCGGGTCCGTTCCCATCATA	166
		HHV4	TCGGGATAGAAAAACCTAATCCCT	
EV	UTR	Forward	CCCTGAATGCGGCTAATCC	167
		Reverse	ATTGTCACCATAAGCAGCCA	
FLUV A	Matrix (M)	M30F2/08	ATGAGYCTTYTAACCGAGGTCGAAACG	168
		M264R3/08	TGGACAAANCGTCTACGCTGCAG	
VZV	ORF 29	Forward	TGTCCTAGAGGAGGTTTTATCTG	169
		Reverse	CATCGTCTGTAAGACTTAACCAG	
Vírus da Caxumba	SH	SH 1	AGTAGTGTGCGATGATCTCAT	170
		SH 2R	GCTCAAGCCTTGATCATTGA	

4.7.1. Preparação dos controles positivos para as reações de qPCR

a) Desenho dos plasmídeos para controle das qPCRs

Foi realizado o desenho de dois plasmídeos contendo as sequências de 6 dos 8 agentes propostos para padronização das PCRs em tempo real. O desenho dos plasmídeos foi desenvolvido da seguinte forma: primeiro utilizou-se o banco de dados de sequência GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) onde foi feita a busca do genoma completo de cada um dos vírus. Com a sequência dos vírus em mãos, cada um dos *primers* foi contrastado com o genoma viral através da ferramenta Blast2seq, disponível online (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Por meio de análise de similaridade, a ferramenta fornece as coordenadas de onde este

fragmento se encontra no genoma do agente. Dessa forma, selecionou-se a região da sequência compreendida pelos *primers* e para a síntese do plasmídeo, adicionamos 10 nucleotídeos a cada extremidade. Após esta etapa, enviamos um arquivo contendo todas as sequências a serem produzidas para a GenScript (<http://www.genscript.com/>), empresa que presta este serviço.

As sequências foram separadas de acordo com o tipo de ácido nucleico viral. Conforme abaixo, os vírus de DNA compuseram, portanto, a sequência de um plasmídeo (tabela 3) e os vírus de RNA compuseram as sequências de outro plasmídeo (tabela 4). A utilização de plasmídeos contendo mais de um vírus clonado como controle não só facilitou o trabalho, mas também viabilizou a verificação rápida de contaminação de amostra em caso de suspeita do ocorrido.

Tabela 3. Plasmídeo contendo sequências dos vírus DNA.

Agente	Sequência (5' – 3')
HHV-6	TCTTCGTTGTGCGGGTCCGTTCCCATCATACACGATTCCCTGCCTCTTG
	GGTTGTGGGGCGATTTGAAAAAGTTAATGTTTGTCTGTACCGGGGTCAG
	TATAACTTCGCAGATAGCTTGTTGACCATGCAGTAGTATGGAGGGTGGG
	TTTTTGTTAATTCCGCCGAATGTTATGATGTTTAGTGCTTCGTTCTCGGA
HSV	GGGATTAGGTTTTTCTATCCCGACGTGATGTCTG
	GTGTAGTCCAGCAGGCCGCTGTCCTTGATCTCGTGGCGGGGTGTACACC
	TCCAGGGGGACAACTCGTGATCCTCCAGCATGGTGATGTTGAGGTCTG
	ATGAAGGTGCTGACGGTGGTGATGTCTGGCGCGGCTCAGCTGGTGGGA
Varicela Zoster	GTACGCGTACTCCTCGAAGTACACGTAGCCCCACCAAAGGTGAAGTA
	GCGCCGGTGTCCACGGTGACGGCTCGATCGCATCGCGCGTCAGCC
	GCAGCTCGTTGTTCTCCCCAGCTGCCCCTCGACCAACGGGCCCTGGT
	CTTCGTACCGAAAG
Varicela Zoster	AGCATGTCCTAGAGGAGGTTTTATCTGCCCCGTAACAGGTCCCTCGTCG
	GGAAATCGAGAAACCACCCTATCCGACCAAGTTCGCGGTATAATTGTCA
	GTGGCGGGGCCATGGTTCAATTAGCCATATACGCCACGGTTGTGCGTG
	CAGTGGGCGCTCGAGCACAAACATATGGCATTGACGACTGGTTAAGTCT
Varicela Zoster	TACAGACGATGAGTT

Tabela 4. Plasmídeo contendo sequências dos vírus RNA.

Agente	Sequência (5' – 3')
Influenzavirus	ATGAGTCTTCTAACCGAGGTCGAAACGTACGTTCTTTCTATCATACC GTCAGGCCCCCTCAAAGCCGAGATTGCGCAGAGACTGGAAAGTGT CTTTGCAGGGAAGAATACAGACCTTGAGGCTCTCATGGAATGGCTA AAGACAAGACCAATCTTGTACCTTTGACTAAGGGAATTTTAGGATT TGTGTTACGCTCACCGTGCCAGTGAGCGAGGACTGCAGCGTAG ACGCTTTGTCCA
Vírus da Caxumba	AACGTCTCGTGACCCTGCCGTTGCACTATGCCGGCGATCCAACCTC CCTTATACCCAACATTTCTATTGCTAATTCTTCTCTCTGATCATAA CTTTGT
Enterovírus	CCCCTGAATGCGGCTAATCCTAACTGCGGAGCACATGCCCTCAATC CAGAGGGTAGTGTGTGCGTAATGGGCAACTCTGCAGCGGAACCGAC TACTTTGGGTGTCCGTGTTTCCTTTTATTCTCACATTGGCTGCTTAT GGTGACAATCACTGAATTGTTACCATATAGCT

b) Preparação das curvas padrão a partir dos plasmídeos.

Antes da diluição dos plasmídeos, foi feito um cálculo para converter a quantidade de DNA em nanogramas para número de cópias. Este cálculo baseia-se no pressuposto de que o peso médio de um par de bases (pb) é de 650 Daltons, isso significa que um mol de pb pesa 650 g e que o peso molecular de qualquer DNA de cadeia dupla pode ser estimado multiplicando esse valor pelo o tamanho do fragmento (em pb). O inverso do peso molecular é o número de moles do material presente em um grama de material. Usando o número de Avogadro, $6,022 \times 10^{23}$ moléculas/mole, o número de moléculas do modelo por grama pode ser calculado:

$$\text{mol/g} \times \text{moléculas/mol} = \text{moléculas/g}$$

Finalmente, o número de moléculas ou o número de cópias da molécula pode ser estimado pela multiplicação em 1×10^9 para converter para nanograma e depois multiplicar pela quantidade de DNA (em ng)¹⁷¹.

A fórmula utilizada foi:

$$\text{Nº de cópias} = \frac{(\text{concentração de DNA em ng} \times 6,022 \times 10^{23})}{(\text{tamanho fragmento em pb} \times 1 \times 10^9 \times 650)}$$

Neste caso a concentração de DNA do plasmídeo é de 4000 ng e a soma do tamanho do plasmídeo: 2710 pb, juntamente com o inserto de vírus de RNA (740 pb) ou do DNA – (512 pb). Após a inserção destes dados na fórmula, foi obtido o número de cópias contidas no frasco inicial, no caso do plasmídeo com a sequência de RNA, possuía $1,07 \times 10^{12}$ cópias e o de DNA $1,15 \times 10^{12}$.

Depois de realizar estes cálculos, foi adicionado 20 µL de tampão de eluição para a diluição dos plasmídeos de vírus de RNA e DNA para $5,4 \times 10^{10}$ e $5,7 \times 10^{10}$, respectivamente. Em seguida foi realizada uma diluição seriada (1:10) partindo da concentração 10^{10} até 10^1 para ambos os plasmídeos.

c) Preparação da curva a partir de amostra positiva

Para a PCR em tempo real para poliomavírus (AgT) foi utilizada uma amostra sabidamente positiva para BKV e JCV, cedida pelo laboratório de Virologia – IMT/USP contendo alta carga viral. Esta amostra foi amplificada através de PCR convencional (já padronizada pelo laboratório de virologia IMT/USP), e o amplicon foi quantificado no Qubit® Fluorometer (Invitrogen, EUA) utilizando o Qubit dsDNA Assay Kit (Invitrogen, EUA), conforme manual do fabricante. Em seguida foi realizada a conversão de ng/µL para cópias/µL, utilizando o mesmo calculo descrito no item anterior e subsequente diluição para a curva padrão.

4.7.2. ESTUDO DAS VARIÁVEIS

Foi realizado um estudo das variáveis para definir a melhor concentração, melhor temperatura de anelamento (TA) dos *primers* e limite de detecção para cada um dos agentes propostos.

a) Determinação da temperatura de anelamento (TA).

Inicialmente foram realizados três protocolos com concentração final de 0,4 μ M de cada par de *primer* para determinar a TA pela PCR convencional. Cada protocolo foi submetido a diferentes ciclagens contendo TA distintas, estimada a partir da temperatura de melting (TM) de cada um dos pares de *primers*. Como exemplo, os protocolos realizados para os vírus HSV, VZV e HHV6 descritos na tabela 5. Ressaltando que os demais 5 pares de *primers* foram submetidos a este mesmo esquema de três protocolos, respeitando a TM de cada um. As diluições do plasmídeo nas concentrações 10^5 e 10^3 foram usadas como *template*.

Tabela 5. Protocolo submetido a 3 ciclagens com temperatura de anelamento distintos.

Reagentes	Volume e Conc. Final	Ciclagem 1	Ciclagem 2	Ciclagem 3
Buffer 10x	2,5 μ L 1X			
dNTP	1 μ L 0,4 mM	94° C-5'.	94° C-5'.	94° C-5'.
<i>Primer Forward</i>	1 μ L 0,4 μ M	94°C– 50"	94°C– 50"	94°C– 50"
<i>Primer Reverse</i>	1 μ L 0,4 μ M	53°C– 45"	58°C– 45"	60°C– 45"
		40 ciclos	40 ciclos	40 ciclos
MgCl ₂	1,5 μ L 3 mM	72°C– 60"	72°C– 60"	72°C– 60"
Água ultrapura	12,7 μ L	72°C-5'.	72°C-5'.	72°C-5'.
Platinum Taq tm DNA Pol	0,2 μ L 1U	4°C - ∞	4°C - ∞	4°C - ∞
Amostra	5 μ L			
Volume Final	25 μ L			

Para a revelação dos produtos amplificados, os mesmos juntamente com 1 μ L do corante de azul de bromofenol 6x, foram submetidos a eletroforese em gel de agarose 1,5% (Ludwig Biotec, BR), preparado em Tris-acetato-EDTA (TAE, LGC biotecnologia, Brasil), contendo 0,8mg/mL de brometo de etídeo (Invitrogen, EUA). Para estimar o tamanho dos fragmentos gerados, foi adicionado em um dos poços do gel 2 μ L de marcador de peso molecular de 100 pb (DNA ladder, Invitrogen, EUA) e submetidos a uma corrente de 100V. Posteriormente, os produtos amplificados foram visualizados através da exposição à UV, no transiluminador de luz ultravioleta e foto documentados.

b) Determinação da concentração de primers

Após estabelecida a melhor TA, foi necessário verificar a concentração mais adequada dos *primers* a serem utilizados. Para isto, foi empregada a técnica de PCR em tempo real.

No presente trabalho foram empregados os dois métodos, TaqMan e SYBR Green. TaqMan foi usado para detecção do vírus da caxumba, e para as PCRs específicas para detecção dos poliomavírus JCV e BKV. Já o SYBR Green foi utilizado para a detecção dos demais vírus.

Na tabela 6 estão descritos os protocolos utilizados para os agentes HSV, VZV e HHV6 como exemplo de SYBR Green e tabela 7 para o vírus da caxumba como exemplo de TaqMan.

Tabela 6. Protocolo de PCR em tempo real para HSV, VZV e HHV6.

REAGENTES	PROTOCOLO 1	PROTOCOLO 2	PROTOCOLO 3
SYBR master mix	12,5 µL	12,5 µL	12,5 µL
<i>Primer Forward</i>	0,6 µL - 0,24 µM	0,8 µL – 0,32 µM	1 µL - 0,4 µM
<i>Primer Reverse</i>	0,6 µL - 0,24 µM	0,8 µL – 0,32 µM	1 µL - 0,4 µM
Água livre de nucleasse	5,5 µL	5,5 µL	5,5 µL
<i>Template</i>	5 µL	5 µL	5 µL
<i>Volume total</i>	25 µL	25 µL	25 µL

Tabela 7. Protocolo de PCR em tempo real para o vírus da caxumba.

REAGENTES	PROTOCOLO 1	PROTOCOLO 2	PROTOCOLO 3
TaqMan master mix	12,5 µL	12,5 µL	12,5 µL
<i>Primer Forward</i>	0,6 µL – 0,24 µM	0,8 µL – 0,32 µM	1 µL - 0,4 µM
<i>Primer Reverse</i>	0,6 µL – 0,24 µM	0,8 µL – 0,32 µM	1 µL - 0,4 µM
Sonda	0,6 µL – 0,24 µM	0,8 µL – 0,32 µM	1 µL - 0,4 µM
Água livre de nucleasse	5,1 µL	5,1 µL	5,1 µL
<i>Template</i>	5 µL	5 µL	5 µL
Volume total	25 µL	25 µL	25 µL

c) Determinação do limite de detecção

Após estabelecidos todos os parâmetros, foi realizada uma PCR em tempo real com 5 pontos da curva padrão (10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 , 10^1) em decaplicata para cada um dos vírus, para verificar a replicabilidade do teste e determinar o limite de detecção.

4.8. PCR CONVENCIONAL PANHERPES COM ENZIMA DE RESTRIÇÃO

Na rotina do laboratório de virologia do IMT (LIM 52) é empregada uma técnica chamada PanHerpes, de acordo com protocolo de Johnson et al.¹⁶⁸. Esta técnica detecta todos os 8 tipos de herpesvírus humanos, em duas etapas de

amplificação. Na primeira etapa com o par de *primer* HSVP1 e P2 (tabela 8) detecta HSV1, HSV2, vírus Epstein-Barr (EBV), Citomegalovirus (CMV) e HHV8 e na segunda etapa com o par de *primer* VZVP1 e P2 detecta VZV, HHV6 (A e B) e HHV7. Porém, só foi realizado neste trabalho o primeiro par de *primer* HSVP1 e HSVP2, pois o interesse era de amplificar HSV1 e HSV2. Na tabela 9 encontra-se o protocolo utilizado, bem como a ciclagem. Porém, só foi utilizada a primeira etapa desta técnica, pois foi aplicada apenas nas amostras que apresentaram positividade para HSV1/2, conforme descrito nos resultados.

Tabela 8. Sequência dos *primers* da primeira etapa do PanHerpes (HSV1, HSV2, EBV, CMV e HHV8).

<i>Primers</i>	Sequência (5' – 3')
HSVP1	GTGGTGGACTTTGCCAGCCTGTACCC
HSVP2	TAAACATGGAGTCCGTGTCGCCGTAGATGA

Tabela 9. Protocolo e ciclagem utilizada para PanHerpes.

Reagentes	Volume	Concentração Final	Ciclagem
Buffer 10x	5 µL	1X	
dNTP	2 µL	0,4 mM	95° C – 5'
<i>Primer Forward</i>	1 µL	0,4 µM	94°C - 50"
<i>Primer Reverse</i>	1 µL	0,4 µM	62°C – 50"
MgCl ₂	3 µL	3 mM	72°C – 60"
Água livre de nucleases	27,6 µL		72°C – 5'
Platinum Taq tm DNA Polymerase	0,4 µL	2 U	4°C - ∞
<i>Template</i>	10 µL		
Volume Final	50 µL		

As amostras que apresentaram alguma amplificação foram submetidas à digestão com as enzimas de restrição BamHI e BstUI para diferenciação dos vírus de acordo com o padrão de bandejamento (New England Biolab, Canadá)¹⁷².

4.9. SEQUENCIAMENTO PELO MÉTODO DE SANGER

Após a realização das qPCRs para poliomavírus (AgT), enterovírus (UTR), vírus da influenza (Matrix) e flavivírus (NS5), nas quais foram utilizados *primers* genéricos, as amostras que apresentaram positividade foram sequenciadas pelo método de SANGER.

Para tal, foi realizado um PCR convencional das amostras positivas. Vinte microlitros do produto amplificado juntamente com 2 µL do corante de azul de bromofenol, além de 2 µL do marcador de peso molecular 1 kb DNA Ladder (Invitrogen, EUA) foram submetidos à eletroforese (100mA) e o gel foi visualizado em um transiluminador de luz ultravioleta. Após esta etapa, as bandas de interesse foram cortadas do gel e purificadas com utilização do Illustra GFX PCR DNA and gel band purification kit (GE Healthcare, UK), seguindo o protocolo do fabricante. As amostras purificadas foram analisadas em gel de agarose 1,5% para confirmar se não houve perda de material e, em seguida, o DNA foi estocado em freezer -20°C.

A reação de sequenciamento foi realizada em placa de 96 poços, utilizando 10 ng de DNA purificado. Cada amostra foi adicionada em dois poços. Foram preparados dois *mix* de reagentes, um com o *primer forward* e outro contendo o *reverse*. Cada *mix* recebeu 3pmol do *primer* respectivo, 1,3 µL de BigDye Terminator Cycle Sequencing (Life Technologies, EUA), 4,4 µL de Tampão de sequenciamento 5X e água livre de nucleases para completar um volume final de 20 µL por reação, quando necessário. A reação foi levada ao termociclador GeneAmp PCR System 9700 96 Well GOLD Block (Applied Biosystems, EUA) e submetida a 40 ciclagens com desnaturação a 96°C por 10 segundos, anelamento a 50°C por 10 segundos e extensão a 60°C por 4 minutos. Em seguida, foi realizado o protocolo de lavagem dos terminadores. Para tanto foi acrescentado 80 µL de isopropanol 75% na placa, a mesma foi selada e, em seguida, incubada a temperatura ambiente por 15 minutos

no escuro (dentro da centrífuga) para decantação. A seguir, a placa foi centrifugada por 45 minutos a 3200 x g e para que não ficasse nenhum resquício de isopropanol foi realizado um *spin* com a placa invertida, por 5 segundos na aceleração e desaceleração 10. A seguir, foi adicionado a placa 160 µL de etanol 70% e esta foi centrifugada por 15 minutos a 3200 x g. O sobrenadante foi descartado por inversão seguido por um *spin* também invertido. Em seguida a placa foi levada ao termociclador novamente e aquecida a 37°C por 30 minutos para a evaporação do etanol remanescente. Ao final, a placa foi armazenada à -20°C até o momento do sequenciamento. As amostras contidas na placa foram ressuspensas com 10 µL de formamida e levadas ao sequenciador automático ABI PRISM® 3500 *Genetic Analyser* (Applied Biosystems™, EUA).

As sequências foram submetidas a análise comparativa contra o banco de dados público utilizando o *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Esta ferramenta busca regiões de identidade entre sequências biológicas. O programa compara sequências de nucleotídeos ou proteínas contra a bases de dados de sequências e calcula a significância estatística.

4.10. PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS DE LCR PARA O NGS (ION TORRENT)

A partir de 1 mL de LCR (amostra bruta), foi realizada uma centrifugação a 600 x g por 10 minutos a 4°C, com o intuito de concentrar as células que estiverem presentes sem que ocorra a lise das mesmas. O sobrenadante então passou por uma segunda etapa de eliminação de fragmentos celulares, tendo sido filtrado com a utilização de um filtro estéril de 0,45 µm (Milipore). Posteriormente, uma nova centrifugação do filtrado foi realizada, agora a 28000 x g por 3 horas a 4°C, na

tentativa de concentrar as partículas virais. Após esta centrifugação, foi desprezado parte do sobrenadante, deixando no tubo somente cerca de 200 µL. Objetivando a remoção de DNA livre no líquido, a este volume foi adicionado 10 µL de 1X Turbo DNase buffer e 20U de Turbo DNase (Ambion) e então, incubado a 37°C por 90 minutos. Uma vez que não foi adicionada nenhuma solução de lise até este momento (como proteinases, por exemplo), o DNA que porventura se encontre livre no plasma é remanescente do hospedeiro em sua maioria (proporcionalmente em relação ao de vírus).

a) Extração dos ácidos nucleicos

Os ácidos nucleicos presentes nas amostras foram extraídos da mesma forma da descrita no item 4.6.b.

b) Síntese de cDNA

Como não se tem conhecimento de que material será investigado (DNA ou RNA), as amostras extraídas passaram pela etapa de síntese da fita complementar de DNA (cDNA). O protocolo utilizado foi: em um microtubo de 1,5 mL contendo o material extraído foi adicionado 0,5 mM de cada dNTP e 100 pmol do *primer* randômico K-8N, o qual contém 20 nucleotídeos constantes na extremidade 5' e uma sequência de 8 nucleotídeos degenerados na posição 3' (tabela 10). Em seguida foi incubado a 75°C por 5 minutos. Após o processo de incubação, foi adicionado ao microtubo 5U de RNA Inhibitor; 10 mM de DTT (dithiothreitol), 5 µL de tampão (1x) e 1 µL de SuperScript II (200U), e o *mix* foi incubado no termobloco a 25°C por 5 minutos e depois, 37°C por 60 minutos.

Tabela 10. Sequência do *primer* randômico K-8N.

<i>Primer</i>	Sequência (5' – 3')	Referência
<i>Primer</i> randômico K-8N	GACCATCTAGCGACCTCCACNNNNNNNN	173

c) Síntese da segunda fita

Para a ligação dos adaptadores às amostras é necessário que o cDNA esteja em fita dupla. Sendo assim, a segunda fita foi sintetizada com a utilização da enzima Exo Klenow DNA polymerase (NEB).

Após incubar o cDNA recém-sintetizado a 95°C por 2 minutos, o material foi posto imediatamente em gelo, adicionando a ele 20 pmol do *primer* randômico K-8N; 100 mM de 25X dNTP Mix; 4,5 µL de água livre de nucleases; 6 µL de NEBuffer 2; 5U de 3'- 5' Exo Klenow DNA polymerase (NEB) e incubado a 37°C por 1 hora.

d) Precipitação de DNA com acetato de sódio 3M

Após etapa de síntese de dupla fita de cDNA, foi adicionado ao volume total da amostra 1:10 da solução de acetato de sódio 3M (pH 7.0) autoclavado. O tubo foi vortexado de forma suave e então foi adicionado 2,5 vezes o volume da amostra de etanol de pureza em nível analítico (PA). O material foi cuidadosamente agitado em um aparelho do tipo vortex e levado ao freezer onde ficou por 1 hora a -20°C para a precipitação do DNA. Em seguida, foi centrifugado a 21000 x g, descartado o sobrenadante, lavado com 250 µL de álcool 70% e novamente centrifugado a 21000 x g. Posteriormente, o sobrenadante foi desprezado e o *pellet* levado ao banho seco a 56°C por 10 minutos para evaporação do etanol e ressuspendido em 40 µL de tampão de eluição. A seguir, o DNA foi quantificado no espectrofotômetro NanoDrop™ 2000c (Thermo Scientific™, EUA).

e) *PCR para amplificação das amostras*

O cDNA fita dupla proveniente da reação anterior foi subsequentemente amplificado por PCR com o *primer* K (tabela 11), que corresponde somente ao trecho constante do *primer* randômico K-8N. Para tal, foi preparado um *mix* contendo 2.5mM de MgCl₂, 32,4 µL água livre de nucleases, 5 µL de buffer (1x); 0,2mM de dNTP, 0,8 µM de *primer* K e 1U de Taq Platinum. A este *mix* foi adicionado 5 µL do cDNA fita dupla e, então, levado ao termobloco sob a seguinte ciclagem: 94°C por 3 minutos, cinco ciclos de 94°C por 1 minuto, 56°C por 1 minuto, 72°C por 2 minutos. Após o término deste ciclo, mais 33 ciclos de 94°C por 20 segundos, 56°C por 20 segundos, 72°C por 2 minutos (adicionando 2 segundos/ciclo) foi realizado, finalizando com 72°C por 7 minutos e 4°C ∞.

Após este passo foi realizada uma eletroforese em gel de agarose 1,5% para a verificação da amplificação. Em caso de sucesso, era esperado um “arraste” de tamanho entre 200-1000 nucleotídeos. Só então, depois de todos estes processos, as amostras ficaram prontas para o sequenciamento de nova geração.

Tabela 11. Sequência do Primer K.

<i>Primer</i>	Sequência (5' – 3')	Referência
<i>Primer K</i>	GACCATCTAGCGACCTCCAC	173

4.11. SEQUENCIAMENTO DE NOVA GERAÇÃO (ÍON TORRENT)

Para o sequenciamento, foi utilizada a plataforma da Life Technologies, o Íon Torrent (adquirida via FAPESP para o programa multiusuários). O sequenciamento

apresenta três etapas: preparo da biblioteca, preparo do template (molde) e o sequenciamento.

a) Preparo da Biblioteca

O primeiro passo foi a fragmentação do DNA das amostras. Foi utilizada a fragmentação mecânica (sonicação), através do Bioruptor® UCD-200 (Diagenode). O DNA foi preparado em Low TE buffer (Ion Plus Fragment Kit, Invitrogen), mantendo as amostras no gelo. Os parâmetros do aparelho foram ajustados para a fragmentação das bibliotecas para que, ao final, tivessem entre 100 e 300 pb. Após este processo, os microtubos permanecem em gelo. Em seguida, as amostras foram submetidas ao reparo das extremidades, uma vez que foram quebradas mecanicamente, utilizando os reagentes 5X End Repair Buffer e End Repair Enzyme (Ion Plus Fragment Kit, Life Technologies) conforme protocolo do fabricante. Após, foi adicionado o reagente Agencourt® AMPure® XP (Beckman Coulter) (figura 7), o qual contém *beads* magnéticas, onde o DNA presente nas amostras foi ligado seguindo o protocolo do fabricante.

Figura 7. Sistema de purificação utilizando o Agencourt AMPure® XP. Fonte: adaptado do protocolo AGENCOURT® AMPURE® XP (https://www.beckmancoulter.com/wsrportal/bibliography?docname=Protocol_000387v001.pdf).

Ao final deste passo, os sobrenadantes contendo apenas o DNA foram transferidos para um novo tubo Eppendorf LoBind de 1,5 mL. A seguir, ocorreu a ligação dos adaptadores e barcodes ao DNA, utilizando os reagentes 10X Ligase Buffer, Ion P1 Adapter, Ion Xpress™ Barcode “X” (barcode a ser utilizado, representado por número, para posterior identificação das amostras), dNTP Mix, água livre de nucleases, DNA Ligase e Nick Repair Polymerase, presentes no Ion Plus Fragment Kit (Life Technologies), conforme protocolo do fabricante. Ao término da reação, as soluções foram transferidas para microtubos Eppendorf LoBind® de 1,5 mL e adicionado o reagente Agencourt® AMPure® XP às soluções (Conforme protocolo do fabricante) para a eliminação dos fragmentos sem barcodes. Então, os sobrenadantes contendo o DNA eluído foram transferidos para um novo tubo Eppendorf LoBind de 1,5 mL. A etapa seguinte consistiu na escolha do tamanho da biblioteca, com a utilização do E-Gel® SizeSelect™ 2% Agarose Gel (Invitrogen) por eletroforese. As bandas de interesse foram monitoradas de acordo com o tamanho, e os fragmentos eram recuperados quando a banda de interesse (300 – 350 pb de DNA + 50 pb dos adaptadores e *barcodes*) chegava à linha de referência (figura 8).

Figura 8. Bandas de interesse monitoradas no E-Gel® SizeSelect™ 2% Agarose Gel. Fonte: arquivo pessoal.

O próximo passo foi a quantificação da biblioteca. Foram preparadas cinco diluições seriais (1:10) da biblioteca controle E. coli DH10B, no gelo, iniciando com a diluição 0.1 até 0.00001. A partir de uma diluição inicial de 1:20, foram preparadas as demais diluições da biblioteca das amostras (1:2000 e 1:20000). Em seguida, foi preparado o *master mix* com os reagentes do Ion Library TaqMan™ Quantitation Kit de acordo com o protocolo do kit, para a quantificação, com a reação de PCR em tempo Real.

b) Preparo do template

Para este passo, foi preparada uma solução contendo as bibliotecas, as *Ion Sphere Particle* (ISP – microesferas com 3 µm de diâmetro) e os reagentes necessários para a reação de PCR em emulsão. Esta solução foi cuidadosamente transferida para o filtro (Ion PGM™ OneTouch Plus Reaction Filter Assembly), e logo

em seguida adicionado uma solução oleosa (Ion OneTouch™ Reaction Oil). O filtro foi, então, invertido (rotação de 180°) com extremo cuidado evitando que a fase aquosa se misture com a fase oleosa. Na sequência, o filtro foi acoplado ao equipamento Ion OneTouch™ 2 200 (Life Technologies). Só então, ocorre a mistura das duas fases. Este processo leva a formação de milhões de micelas. Cada micela formada pela emulsão se comporta como um microrreator onde ocorrerá a PCR. Idealmente, em cada uma das micelas, consta uma ISP, um fragmento de DNA (ligado ao adaptador e ao *barcode*) e os reagentes necessários para a amplificação. O One Touch realizou a reação de PCR em emulsão. A amplificação se deu na superfície das ISPs. Ao final da PCR (16 horas), foram obtidas ISP livres e ISPs template-positivas (ISPs com várias cópias dos fragmentos de DNA aderidos em sua superfície) separadamente. Por fim, um último procedimento foi realizado nesse mesmo aparelho que separa e descarta as ISPs livres, ficando apenas as ISPs template-positivas, as quais estão prontas para o sequenciamento.

c) Sequenciamento

Finalmente as ISPs enriquecidas foram transferidas para um chip 314 (pode gerar até 100 Megabases por reação) semicondutor, o qual possui milhões de micropoços, sensíveis a alterações de pH. Cada ISP ocupa um único micropoço onde ocorre a reação do sequenciamento. O chip foi então inserido no equipamento Ion PGM Sequencer (Life Technologies), onde ocorreram ciclos de fluxos de cada um dos nucleotídeos intercalados por lavagens. As quatro bases nitrogenadas (citocina, guanina, adenosina e timina) foram introduzidas sequencialmente e a cada incorporação bem-sucedida à fita simples de DNA, ocorreu a liberação de um íon H^+ e, conseqüentemente, uma alteração de pH. Esta alteração era detectada pelo sistema de sensores de pH presentes nos micropoços, e convertida em voltagem,

cujas diferenças de potencial eram transmitidas para o sistema como *basecalls*. Após, as *basecalls* de cada fragmento sequenciado foram traduzidas em *reads* e foram exportadas no formato de arquivo FASTQ, que foi analisado com o auxílio do CLC Genomics Workbench 6.5.1 (CLC Bio), programa utilizado para manipulação das sequências.

RESULTADOS

5. RESULTADOS

5.1. PACIENTES E DADOS DEMOGRÁFICOS

O presente estudo foi estabelecido para tentar compreender melhor a etiologia das encefalites e meningites em São Paulo. Conforme já mencionado, foram analisadas neste projeto 120 amostras de LCR de pacientes provenientes da ISCMSP e HCFMUSP.

Dos 120 pacientes, 108 (90%) eram imunocompetentes e 12 (10%) eram pacientes portadores do vírus HIV (tabela 12). Do total de pacientes coletados, apenas 19 (15,9%), apresentaram sintomas compatíveis com meningite, 1 (0,8%) meningoencefalite e os demais manifestaram sintomas compatíveis com encefalite (83,3%).

A idade média dos pacientes foi de 44 anos, sendo 49,2% mulheres e 50,8% homens.

Tabela 12. Dados demográficos e clínicos dos pacientes incluídos no estudo.

Dados demográficos e clínicos	
Idade	n=120
18-40 anos	55 (45,8%)
41-60 anos	44 (36,7%)
61-84 anos	21 (17,5%)
Sexo	n=120
Feminino	59 (49,2%)
Masculino	61 (50,8%)
HIV+	12 (10,0%)
Proteína LCR (mg/dL) - mediana (min - máx)	46,5 (4-1614)
Glicose LCR (mg/dL) - mediana (min - máx)	60,0 (9-227)
Leucócitos LCR (cél/s/mm ³) – mediana (min - máx)	11,0 (0-462)
Sintomas	
Febre	110 (91,2%)
Tontura	50 (41,6%)
Cefaleia	120 (100%)
Vômito	115 (95,8%)
Ataxia	10 (8,3%)
Afecção visual	3 (2,5%)
Convulsão	90 (75%)
Rigidez de nuca	20 (16,6%)
Óbitos	10 (8,3%)

Foi realizado um levantamento do período de coleta das amostras, sendo possível obter a distribuição mensal (figura 9).

Figura 9. Distribuição mensal por ano das amostras coletadas.

5.2. CONTROLE INTERNO

Os fragmentos dos dois vírus utilizados como controle interno foram amplificados com sucesso em todas as amostras batizadas, evidenciando que a extração foi realizada de forma correta.

5.3. PADRONIZAÇÃO DAS PCRS EM TEMPO REAL

De acordo com os testes, foi estabelecida a concentração de *primers* e a temperatura de anelamento ótimas para cada agente proposto (tabelas 13, 14 e 15). A concentração dos *primers* nas reações para os vírus influenza e enterovírus foi menor, pois na concentração de 0,4 μM , ideal para o restante dos protocolos, observamos dímeros de *primers* muito fortes.

Tabela 13. Concentração dos *primers* e temperatura de anelamento para os vírus HVS, VZV, HHV6, JCV/BKV, flavivírus.

REAGENTES	PROTOCOLO	CICLAGEM	
	Volume e conc. final		
SYBR green master mix	12,5 μL	50° C – 2'	
<i>Primer Forward</i>	1 μL (0,4 μM)	95°C – 10'	
<i>Primer Reverse</i>	1 μL (0,4 μM)	95°C -15".	40 ciclos
Água livre de nuclease	5,5 μL	58°C – 45".	
<i>Template</i>	5 μL	60°C – 60".	
<i>Volume total</i>	25 μL	Curva de dissociação	

Tabela 14. Concentração dos *primers* e temperatura de anelamento para os vírus influenza e enterovírus.

REAGENTES	PROTOCOLO	CICLAGEM	
	Volume e conc. final		
SYBR green master mix	12,5 μL	50° C – 2'	
<i>Primer Forward</i>	0,75 μL (0,3 μM)	95°C – 10'	
<i>Primer Reverse</i>	0,75 μL (0,3 μM)	95°C -15"	40 ciclos
Água livre de nuclease	5,5 μL	58°C – 45"	
<i>Template</i>	5 μL	60°C – 60"	
<i>Volume total</i>	25 μL	Curva de dissociação	

Tabela 15. Concentração dos *primers* e temperatura de anelamento para o vírus da caxumba.

REAGENTES	PROTOCOLO	CICLAGEM	
	Volume e conc. final		
TaqMan master mix	12,5 µL	40 ciclos	
Sonda	0,4 µL (0,16 µM)		
<i>Primer Forward</i>	1 µL (0,4 µM)		
<i>Primer Reverse</i>	1 µL (0,4 µM)		
Água livre de nuclease	5,1 µL		
<i>Template</i>	5 µL		
<i>Volume total</i>	25 µL		

Os resultados da PCR em tempo real foram analisados por meio de uma curva padrão, construída com DNA de plasmídeo em diluições conhecidas. O R^2 mede quão próximo é o ajuste entre a regressão linear da curva padrão e os valores individuais de Ct (*threshold cycle*) das amostras padrão (valor de 1 indica um ajuste perfeito entre a regressão linear e os dados individuais). O *slope* indica a eficiência de amplificação para o ensaio (valor de -3,3 representa 100% de eficiência), e o *y-intercept* indica o valor esperado de Ct para uma amostra com 1 cópia/mL. Utilizando-se o *slope* pode se calcular a eficiência de cada reação (Applied Biosystems, 2010).

As curvas padrão apresentaram R^2 de 0,99 a 1 e *slope* de -3,4 a -3,6, revelando uma eficiência de amplificação de aproximadamente 92% para o DNA de plasmídeo, conforme as figuras 5 a 11. De acordo com as instruções da Applied Biosystems¹⁷⁴, uma curva padrão que apresentar um coeficiente de correlação (valor R^2) < 0,99, a precisão dos dados é questionável.

A utilização das curvas padrão dos 8 vírus citados no item 4.7.1.b, composta de 3 diluições logarítmicas de plasmídeo e amplicon (AgT e NS5) em decaplicata apresentaram boa reprodutibilidade e linearidade, e o limite de detecção foi de 10 cópias/mL (figuras 10 a 17).

Figura 10. Reação de PCR em tempo real para determinação da curva padrão do HSV. A. Reta formada pelos pontos da curva padrão. B. Amplificação da diluição seriada na base 10. C. Curva de *Melting*.

Figura 11. Reação de PCR em tempo real para determinação da curva padrão do HHV6. A) Retra formada pelos pontos da curva padrão. B) Amplificação da diluição seriada na base 10. C) Curva de *Melting*.

Figura 12. Reação de PCR em tempo real para determinação da curva padrão do VZV. A) Amplificação da diluição seriada na base 10. B) Reta formada pelos pontos da curva padrão. C) Curva de *Melting*.

Figura 13. Reação de PCR em tempo real para determinação da curva padrão do vírus influenza. A) Amplificação da diluição seriada na base 10. B) Reta formada pelos pontos da curva padrão. C) Curva de *Melting*.

Figura 14. Reação de PCR em tempo real para determinação da curva padrão do enterovírus. A) Amplificação da diluição seriada na base 10. B) Reta formada pelos pontos da curva padrão. C) Curva de *Melting*.

Figura 15. Reação de PCR em tempo real para determinação da curva padrão do poliomavírus. A) Reta formada pelos pontos da curva padrão. B) Amplificação da diluição seriada na base 10. C) Curva de *Melting*

Figura 16. Reação de PCR em tempo real para determinação da curva padrão do flavivírus. A) Retas formadas pelos pontos da curva padrão. B) Amplificação da diluição seriada na base 10. C) Curva de *Melting*

Figura 17. Reação de PCR em tempo real (TaqMan) para determinação da curva padrão do vírus da caxumba. A) Retra formada pelos pontos da curva padrão. B) Amplificação da diluição seriada na base 10.

5.4. PCR CONVENCIONAL E EM TEMPO REAL

Foram analisadas 120 amostras de LCR, as quais foram submetidas à qPCR para HSV 1 e 2, VZV, HHV6, influenza, enterovírus, vírus da caxumba, poliomavírus (AgT) e flavivírus (NS5). Do total de amostras apenas 44 (36,7%) apresentaram resultado positivo para algum dos vírus analisados no âmbito desta pesquisa, dentre elas 17 (14,2%) para poliomavírus, 22 (18,3%) para HSV 1 e 2 e 5 (4,2%) apresentaram coinfeção de polimavírus com HSV (figura 18), totalizando 22 positivos para AgT e 27 para HSV. Dentre as 22 positivas na PCR real time genérico

para o AgT, apenas 5 (4,2%) foram confirmadas pela PCR real time específico para BKV e 2 (1,7%) amostras foram confirmadas para JCV também pela PCR real time. As 15 amostras restantes tiveram o fragmento do AgT sequenciados por Sanger, usando os mesmos *primers* genéricos utilizados para a PCR em tempo real. Já as amostras positivas para HSV foram submetidas à PCR convencional PanHerpes para confirmação e diferenciação dos vírus. A reação confirmatória no PanHerpes infelizmente não resultou em amostras positivas para HSV. Como será discutido posteriormente, acreditamos que isso seja consequência de diferenças nas sensibilidades das técnicas utilizadas. Por outro lado, na reação PanHerpes foi encontrado um material positivo para o vírus Epstein-Barr (EBV), o qual não fazia parte da lista de agentes procurados neste estudo.

Dentre os 26 casos positivos para HSV na PCR em tempo real, 8 eram suspeitos de meningite, ou seja, quase um terço destes positivos. Os demais correspondiam a casos suspeitos de encefalite. Apenas nos casos suspeitos de meningite positivos para HSV, 4 eram portadores de HIV. A idade destes 26 pacientes variou de 18 a 70 anos, com mediana de 39 anos.

Em se tratando dos pacientes positivos para poliomavírus, dos 22 positivos 2 (BKV) eram pacientes com suspeita de meningites e 20 (2 JCV e 18 BKV) com suspeita de encefalites. Nenhum destes pacientes era portador do HIV. Porém 5 pacientes positivos para BKV apresentaram coinfeção com HSV, um deles indo a óbito. Três pacientes apenas BKV positivos também foram a óbito. A idade destes indivíduos variou de 18 a 64 anos, com mediana de 36,5 anos.

Figura 18. Gráfico do resultado das PCRs realizadas.

5.5. SEQUENCIAMENTO PELO MÉTODO DE SANGER

As 15 amostras positivas para AgT sequenciadas apresentaram sequencias com identidade com BKV. Uma delas, inclusive, possui como melhor hit no BLAST o vírus do tipo 2 (figura 19). Dado o tamanho do fragmento do AgT (186 pb), entretanto, não foi possível determinar o genótipo do BKV de todas as sequencias com segurança. Por ser esta uma região de pouca variabilidade entre os vírus, os genótipos não podem ser definidos com precisão.

Sequences producing significant alignments:

Select: All None Selected:0

Alignments Download GenBank Graphics Distance tree of results

	Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
☐	Human polyomavirus 1 strain BK-2, complete genome	232	232	97%	2e-57	97%	KY487998.1
☐	BK polyomavirus isolate CH-1, complete genome	232	232	97%	2e-57	97%	KP984526.1
☐	BK polyomavirus isolate Ir-HC-06 large tumor antigen gene, partial cds	232	232	97%	2e-57	97%	GU130550.1
☐	BK polyomavirus isolate sew25 large T antigen gene, partial cds	232	232	97%	2e-57	97%	FJ666993.1
☐	BK polyomavirus DNA, complete genome, isolate: A-62H	232	232	97%	2e-57	97%	AB369092.1
☐	BK polyomavirus isolate pat_242_la large T antigen and small T antigen genes, partial cds	232	232	97%	2e-57	97%	EU681739.1
☐	BK polyomavirus isolate pat_236_la large T antigen and small T antigen genes, partial cds	232	232	97%	2e-57	97%	EU681738.1
☐	BK polyomavirus isolate pat_206_la large T antigen and small T antigen genes, partial cds	232	232	97%	2e-57	97%	EU681737.1

Figura 19. Resultado do alinhamento da sequência de BKV na ferramenta BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>).

5.6. PCR CONVENCIONAL PARA PANHERPES COM ENZIMA DE RESTRIÇÃO

Das 27 amostras positivas para HSV na PCR em tempo real que foram submetidas ao PanHerpes, apenas uma apresentou positividade que foi, surpreendentemente, para EBV.

5.7. SEQUENCIAMENTO DE NOVA GERAÇÃO (ION TORRENT)

Por se tratar da plataforma Ion Torrent, que possui baixa cobertura, foram selecionadas apenas 8 amostras. Estas foram divididas em 2 dois chips de 314 (pode gerar até 100mb) e foram realizadas duas corridas, uma para cada chip. A figura abaixo ilustra o resultado da amplificação randômica, onde pode ser observada uma distribuição homogênea dos produtos de PCR, que se apresentam na forma de arraste na eletroforese em gel de agarose (figura 20).

Figura 20. Gel da eletroforese realizada para verificação da amplificação do material.
Fonte: arquivo pessoal

Inicialmente, as montagens dos 8 sequenciamentos, referentes a 8 amostras distintas, foram feitas “contra referência”, utilizando como referência um banco de genomas completos de vírus. Esses genomas foram obtidos de um repositório contendo sequências de referência (não redundantes) de todos os vírus já sequenciados e disponibilizados no GenBank (<ftp://ftp.ncbi.nlm.nih.gov/refseq/release/viral/>). Esse banco foi baixado e utilizado como referência no próprio programa CLC Genomics Workbench. Entretanto, para as amostras onde nenhum vírus era encontrado, uma nova montagem usando a ferramenta “de novo” era feita, e os *contigs* obtidos eram contrastados com o banco de dados público do GenBank.

Ao realizar a montagem contra o banco de vírus de referência foram encontrados *reads* dos vírus utilizados para “batizar” as amostras, e nos pacientes sabidamente positivos para HIV (PEV1, PEV 53), foram observados *reads* compatíveis com este vírus. Uma amostra (PEV 95) apresentou *reads* compatíveis com SV40 (poliomavírus), com *e-value* significativa (figura 20).

Select: All None Selected:0

Alignments Download GenBank Graphics Distance tree of results

	Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
☐	Simian virus 40 isolate SV40-SP(KT), complete genome	439	439	100%	2e-119	99%	EF579804.1
☐	Simian virus 40 isolate SV40-LP(KT), complete genome	439	439	100%	2e-119	99%	EF579803.1
☐	Simian virus 40 isolate SV40(PV)264, complete genome	439	439	100%	2e-119	99%	EF579666.1
☐	Simian virus 40 isolate SV40(PV)251, complete genome	439	439	100%	2e-119	99%	EF579665.1
☐	Simian virus 40 isolate SV40(PV)241, complete genome	439	439	100%	2e-119	99%	EF579664.1
☐	Simian virus 40 isolate SV40(PV)236, complete genome	439	439	100%	2e-119	99%	EF579663.1
☐	Simian virus 40 isolate SV40(PV)232, complete genome	439	439	100%	2e-119	99%	EF579662.1
☐	Simian virus 40 isolate SV40(Ad)211, complete genome	439	439	100%	2e-119	99%	EF579660.1
☐	Simian virus 40 isolate SV40(Ad)201, complete genome	439	439	100%	2e-119	99%	EF579659.1
☐	Simian virus 40 isolate SV40(Ad)191, complete genome	439	439	100%	2e-119	99%	EF579658.1
☐	TPA: Simian virus 40 late nonstructural protein VP4 gene, complete cds	439	439	100%	2e-119	99%	BK006135.1

Figura 20. Resultado do alinhamento do *contig* obtido do PEV 95 apresentando similaridade ao vírus SV40 na ferramenta BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>).

Interessantemente, ao serem realizadas as montagens “de novo” com posterior alinhamento dos *contigs* na ferramenta BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>), 4 das 8 amostras sequenciadas apresentaram sequências similares a protozoário, bactérias e fungos. A amostra PEV 1, advinda de um paciente com sintomas compatíveis com meningoencefalite, apresentou *reads* similares a *Toxoplasma gondii*. PEV 39 e 48 pertenciam a indivíduos com sintomas compatíveis com meningite e apresentaram *reads* similares com *Cryptococcus neoformans*. PEV 53, paciente com sintomatologia compatível com meningite apresentou *reads* similares a *Treponema pallidum* e PEV 80 com sintomatologia compatível com meningite teve similaridade com *Stenotrophomonas maltophilia* (Figuras 22 a 26). Além das amostras PEV1, PEV 53, nenhuma outra era de paciente HIV positivos.

Notar que os *e-values* obtidos não deixam dúvidas em relação a identidade dos mesmos, correspondendo, portanto, a *matches* específicos.

Sequences producing significant alignments:

Select: [All](#) [None](#) Selected:0

Alignments Download GenBank Graphics Distance tree of results

	Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
☐	Toxoplasma gondii isolate TgCTBr16 dihydropteroate synthase (dhps) gene, complete cds	183	183	100%	5e-43	97%	KT714074.1
☐	Toxoplasma gondii isolate TgCTBr11 dihydropteroate synthase (dhps) gene, complete cds	183	183	100%	5e-43	97%	KT692934.1
☐	Toxoplasma gondii isolate TgCTBr08 dihydropteroate synthase (dhps) gene, partial cds	183	183	100%	5e-43	97%	KT625490.1
☐	Toxoplasma gondii isolate TgCTBr07 dihydropteroate synthase (dhps) gene, partial cds	183	183	100%	5e-43	97%	KT582107.1
☐	Toxoplasma gondii isolate TgCTBr03 dihydropteroate synthase (dhps) gene, partial cds	183	183	100%	5e-43	97%	KT582106.1
☐	Toxoplasma gondii hydroxymethyldihydropterin pyrophosphokinase-dihydropteroate synthase	183	183	100%	5e-43	97%	U61852.1
☐	Toxoplasma gondii hydroxymethyldihydropterin pyrophosphokinase-dihydropteroate synthase	183	183	100%	5e-43	97%	U81497.1
☐	Toxoplasma gondii ME49 dihydropteroate synthase partial mRNA	178	178	100%	2e-41	96%	XM_002365108.2
☐	TPA: Toxoplasma gondii VEG, chromosome chrVIIb, complete genome	178	178	100%	2e-41	96%	LN714497.1
☐	Hammondia hammondi dihydropteroate synthase partial mRNA	165	165	99%	2e-37	94%	XM_008884848.1

Figura 22. Resultado do alinhamento do *contig* obtido do PEV 1 apresentando similaridade a *Toxoplasma gondii* na ferramenta BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>).

Sequences producing significant alignments:

Select: [All](#) [None](#) Selected:0

Alignments Download GenBank Graphics Distance tree of results

	Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
☐	Cryptococcus neoformans var. grubii strain KN99 chromosome 2, complete sequence	138	138	100%	2e-29	98%	CP022322.1
☐	Cryptococcus neoformans var. grubii H99 25S ribosomal RNA rRNA	138	138	100%	2e-29	98%	XR_001045460.1
☐	Cryptococcus neoformans var. grubii strain W52233 internal transcribed spacer 1, partial sequ	138	138	100%	2e-29	98%	KM085009.1
☐	Parathemisto japonica voucher USNM:1196378 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	138	138	100%	2e-29	98%	KC428873.1
☐	Cryptococcus neoformans var. grubii H99 chromosome 2, complete sequence	138	138	100%	2e-29	98%	CP003821.1
☐	Cryptococcus gattii WM276 chromosome B, complete sequence	138	6917	100%	2e-29	98%	CP000287.1
☐	TPA: Cryptococcus neoformans var. neoformans B-3501A genes for 25S rRNA, 5S rRNA, 18S	138	138	100%	2e-29	98%	BR000310.1
☐	Filobasidiella neoformans var. neoformans 5S ribosomal RNA, 17S ribosomal RNA genes, inte	138	138	100%	2e-29	98%	AF356652.1
☐	Cryptococcus neoformans var. neoformans JEC91 chromosome 2 sequence	138	376	100%	2e-29	98%	AF017342.1

Figura 23. Resultado do alinhamento do *contig* obtido do PEV 39 apresentando similaridade a *Cryptococcus neoformans* na ferramenta BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>).

Sequences producing significant alignments:

Select: [All](#) [None](#) Selected:0

Alignments Download GenBank Graphics Distance tree of results

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
☐ Cryptococcus gattii WM276 chromosome B, complete sequence	185	9097	100%	1e-43	98%	CP000287.1
☐ Cryptococcus neoformans 5.8S and 25S ribosomal RNA genes	185	185	100%	1e-43	98%	L14067.1
☐ Cryptococcus neoformans var. grubii strain KN99 chromosome 2, complete sequence	180	360	100%	6e-42	97%	CP022322.1
☐ Cryptococcus neoformans var. grubii H99 25S ribosomal RNA rRNA	180	180	100%	6e-42	97%	XR_001045460.1
☐ Cryptococcus neoformans var. grubii H99 chromosome 2, complete sequence	180	360	100%	6e-42	97%	CP003821.1
☐ TPA: Cryptococcus neoformans var. neoformans B-3501A genes for 25S rRNA, 5S rRNA, 18S rRNA	180	180	100%	6e-42	97%	BR000310.1
☐ Filobasidiella neoformans var. neoformans 5S ribosomal RNA, 17S ribosomal RNA genes, internal	180	180	100%	6e-42	97%	AF356652.1
☐ Cryptococcus neoformans var. neoformans JEC21 chromosome 2 sequence	180	360	100%	6e-42	97%	AE017342.1
☐ Cryptococcus neoformans 5.8S and 25S ribosomal RNA sequences	180	180	100%	6e-42	97%	L14068.1

Figura 24. Resultado do alinhamento do *contig* obtido do PEV 48 apresentando similaridade a *Cryptococcus neoformans* na ferramenta BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>).

Sequences producing significant alignments:

Select: [All](#) [None](#) Selected:0

Alignments Download GenBank Graphics Distance tree of results

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
☐ Treponema pallidum subsp. pertenue strain CDC 2575	91.5	182	100%	1e-15	96%	CP020366.1
☐ Treponema pallidum subsp. pertenue strain Ghana-051	91.5	182	100%	1e-15	96%	CP020365.1
☐ Treponema pallidum subsp. pallidum strain Seattle Nichols genome	91.5	182	100%	1e-15	96%	CP010422.1
☐ Treponema pallidum subsp. pallidum strain PT_SIF0877_3 genome	91.5	182	100%	1e-15	96%	CP016048.1
☐ Treponema pallidum subsp. pallidum strain PT_SIF0751 genome	91.5	182	100%	1e-15	96%	CP016046.1
☐ Treponema pallidum subsp. pallidum strain PT_SIF1348 genome	91.5	182	100%	1e-15	96%	CP016069.1
☐ Treponema pallidum subsp. pallidum strain PT_SIF1299 genome	91.5	182	100%	1e-15	96%	CP016068.1
☐ Treponema pallidum subsp. pallidum strain PT_SIF1280 genome	91.5	182	100%	1e-15	96%	CP016067.1
☐ Treponema pallidum subsp. pallidum strain PT_SIF1378 genome	91.5	182	100%	1e-15	96%	CP016066.1

Figura 25. Resultado do alinhamento do *contig* obtido do PEV 53 apresentando similaridade a *Treponema pallidum* na ferramenta BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>).

Sequences producing significant alignments:

Select: [All](#) [None](#) Selected:0

[Alignments](#)
[Download](#)
[GenBank](#)
[Graphics](#)
[Distance tree of results](#)

	Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
☐	Stenotrophomonas maltophilia D457 complete genome	346	346	100%	1e-91	98%	HE798556.1
☐	Stenotrophomonas maltophilia JV3 complete genome	279	279	100%	1e-71	92%	CP002986.1

Figura 26. Resultado do alinhamento do *contig* obtido do PEV 80 apresentando similaridade a *Stenotrophomonas maltophilia* na ferramenta BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>).

DISCUSSÃO

6. DISCUSSÃO

Neste estudo, tínhamos como objetivo descrever a prevalência de diferentes agentes microbianos presentes nas meningites e encefalites assépticas. Inicialmente, nos baseamos nos agentes descritos como mais frequentes na literatura médica e científica, no Brasil e em outras partes do mundo. Entretanto, o desafio aqui era de fato confirmar a presença desses agentes através de métodos padronizados e otimizados em nosso laboratório, bem como descrever possíveis agentes não conhecidos ou não esperados como causadores (frequentes) dessas enfermidades.

De fato, obtivemos cerca de 40% de positividade frente os oito agentes pesquisados. Ainda, grande parte das amostras com resultado positivo na PCR em tempo real para algum agente pesquisado foi positiva para poliomavírus. Os resultados descritos neste estudo concordam com a literatura, onde há diversos relatos de encefalite e meningites por JCV e BKV tanto em imunocomprometidos, como imunocompetentes^{90; 94; 95; 96; 98}. A maior parte das amostras positivas do presente estudo são de indivíduos imunocompetentes e sem coinfeção com outros agentes. A detecção destes vírus no LCR de pacientes imunocomprometidos e imunocompetentes com suspeita de doença neurológica sugere que estes vírus possam ter um papel patogênico na etiologia das encefalites e meningites, tanto no início, quanto no desenvolvimento de lesões observadas nos tecidos relacionados ao SNC^{94; 95}.

Por outro lado, há controvérsias em relação aos poliomavírus serem os responsáveis pelas encefalites. É possível que esses vírus tenham sido reativados durante a doença causada por outro agente, uma vez que estes vírus fazem latência no SNC. Não é impossível que estes vírus tenham sido detectados no LCR de

pacientes com sintomatologia compatível com encefalites e meningites, porém a presença dos poliomavírus no LCR, principalmente os BKVs, pode ter sido consequência de transativação/reativação, e não necessariamente como agente principal. O que acreditamos que possa ter ocorrido nos 4 casos onde houve coinfeção de BKV com HSV.

Em relação as 26 amostras positivas na PCR em tempo real para HSV1 e 2, de fato, esse agente é extremamente prevalente em EMs, e de acordo com Boucher et al.³⁰ é encontrado como sendo o mais frequente agente etiológico em 65% de todos os estudos do tipo. No presente trabalho, também encontramos os Herpesvírus simples como sendo o agente mais prevalente. Das amostras positivas para esse vírus, 19 eram de suspeita de encefalites, 8 casos suspeitos de meningite, dentre estas, 23 eram negativas para HIV, dado esse também esperado³⁰.

Como mencionado, as amostras positivas para a PCR HSV 1 e 2 foram submetidas ao PanHerpes para diferenciação entre esses vírus, entretanto, nenhuma delas foi sequer positiva para HSV nesta reação. Acreditamos que isto possa ter ocorrido por esta última ser uma técnica de PCR convencional, e, portanto, menos sensível que a técnica em tempo real. De fato, o limite de detecção da PCR em tempo real alcançado neste estudo foi de 10 cópias/mL, e a média das cargas virais apresentadas neste estudo foi de $1,02 \times 10^2$ cópias/mL. Embora o artigo que descreve a reação do PanHerpes (convencional) atesta que o HSV apresentou limite de 100 cópias/mL¹⁷², a reação foi repadronizada em nosso laboratório, mas não temos a informação do limite alcançado aqui. Dessa forma, é plausível esperar que o sucesso na detecção desses agentes, com carga viral muito baixa, seja menor em reações do tipo convencional que necessitam de digestão enzimática, como é o PanHerpes.

Ainda sobre o PanHerpes, uma das amostras submetidas a ele se apresentou positiva para outro herpesvírus, o Epstein Barr (EBV) em um paciente HIV positivo.

Este vírus é mais comumente encontrado em crianças que apresentam manifestações neurológicas, incluindo encefalite, meningite asséptica, mielite transversa, ataxia cerebelar aguda e encefalomielite desmielinizante aguda¹⁷⁵. Já em adultos imunocompetentes, existem poucos relatos de encefalite por EBV relatados¹⁷⁶, porém, quando se trata de paciente HIV positivo, estes casos se tornam mais frequentes, como observado em um estudo realizado por Telenti et al¹⁷⁷. Os autores avaliaram o LCR de 103 pacientes portadores de HIV com encefalite e detectaram EBV em 75% deles. O caso apresentado pelo presente trabalho foi isolado, no entanto, como já mencionado anteriormente, a técnica utilizada (PCR convencional) é menos sensível, e se tratando de LCR (uma amostra teoricamente asséptica), não se pode descartar a presença deste vírus em outros pacientes, pois neste estudo haviam 12 portadores de HIV.

Vale aqui ressaltar que o EBV não foi proposto no presente estudo, porém por fazer parte da técnica que detecta 4 tipos de herpesvírus, como descrito no item 4.8 acabou sendo identificado.

O sequenciamento de nova geração utilizando a plataforma Ion Torrent foi escolhido para este trabalho pela facilidade de acesso ao equipamento e por já possuímos os kits para esta plataforma. Porém, este equipamento é mais utilizado para sequenciar DNA previamente amplificado, como por exemplo para verificação de mutação, pois ele tem baixa cobertura (é capaz de gerar entre 400 mil e 5 milhões de leituras com um tamanho médio entre 200 e 400 nucleotídeos), quando comparado com outras plataformas de sequenciamento para o propósito deste estudo.

Como trabalhamos com amostras humanas e com agentes desconhecidos, a baixa cobertura deste equipamento poderia ter negligenciado a presença de agentes virais presentes em baixa concentração. Ainda, mesmo após tratamentos com

DNase, a menor quantidade de DNA humano remanescente poderia inviabilizar o achado do agente etiológico buscado.

Por este motivo, foi necessário padronizar uma etapa anterior ao protocolo de sequenciamento, a qual chamamos de “limpeza das amostras”.

Vale aqui ressaltar que desde o início deste trabalho, diversos protocolos foram testados com várias alterações ao longo deste período. As primeiras amostras sequenciadas apresentaram muitos *reads* de genoma humano, mesmo após o tratamento do material com DNase. Então, realizamos uma etapa incluindo uma membrana de captura de DNA por hibridização (utilizando DNA humano de uma linhagem celular humana livre de patógenos fixada na membrana) e, infelizmente, a inclusão da etapa da membrana de captura de DNA por hibridização não surtiu o efeito esperado, dificultando até a recuperação dos vírus incluídos nas amostras iniciais, utilizados como controle (CPV e CDV). Houve, portanto, muita perda de DNA/RNA total.

Em conversa com o Dr. Eric Delwart, da Universidade da Califórnia e especialista em metodologias de sequenciamento direto para a descoberta de novos vírus, foi levantado que de fato a recuperação de sequências de vírus de amostras biológicas como LCR é muito mais complicada do que parece. Mesmo utilizando a plataforma Illumina Hi Seq, que fornece uma profundidade de cobertura maior (mais de 1000x), resultados negativos em termos de sequências de microrganismos são muito comuns. Por isso, inserimos mais um passo desta metodologia, a utilização de um *primer* randômico (K-8N – onde K é uma sequência conhecida que funciona como cauda). Utilizando esse *primer* para a síntese de cDNA e depois para a construção da dupla fita, era possível realizar uma amplificação específica de todo o material gerado (utilizando um *primer* complementar a cauda 8N que agora está nas extremidades do DNA), aumentando assim a concentração de material total.

Com o método devidamente padronizado, 8 amostras que apresentaram resultados negativos para as técnicas de PCR foram sequenciadas pela plataforma Íon Torrent. Ao analisar os resultados das mesmas, verificamos que 4 delas apresentaram sequencias compatíveis com *Toxoplasma gondii* (protozoário), *Cryptococcus neoformans* (fungo) e *Treponema pallidum* (bactéria causadora de Sífilis, neste caso neurosífilis). Estes agentes são amplamente conhecidos por provocarem encefalites e/ou meningites^{178; 179; 180}. Estes resultados foram confirmados por técnicas (pesquisa de DNA de *Toxoplasma gondii* por PCR, antígeno solúvel para *C. neoformans* e hemaglutinação para sífilis) desenvolvidas por outro centro de diagnóstico a partir da amostra de LCR de cada paciente.

Tanto o paciente com suspeita de meningoencefalite diagnosticado para *Toxoplasma gondii*, quanto o indivíduo com suspeita de meningite positivo para *Treponema pallidum* são portadores do HIV, confirmando os dados apresentados na literatura, que demonstram que estes agentes são mais frequentes em infecções no SNC em portadores do vírus HIV^{178;181;182}. Da mesma forma, no caso dos pacientes com meningite por *Cryptococcus neoformans*, os resultados vão de encontro com o que se conhece. O *Cryptococcus neoformans* é um fungo oportunista, e provoca meningite criptocócica (MC) em hospedeiros imunocomprometidos^{180; 183; 184}. Porém, alguns estudos relatam que indivíduos imunocompetentes também podem ser suscetíveis a MC^{185; 186; 187}. Em indivíduos com sistema imune intacto, a MC apresenta sinais e sintomas típicos de meningite, incluindo febre, cefaleia e rigidez do pescoço¹⁷⁹ e em alguns casos, apresenta afecção visual¹⁸⁷. Isso vai ao encontro com os sinais apresentados por este paciente, que chegou ao hospital com febre, cefaleia, mal-estar, tontura, vômito, fraqueza, falta de apetite, afecção visual e rigidez de nuca, com suspeita de meningite.

Com relação ao caso com *Stenotrophomonas maltophilia*, se tratava de um idoso (72 anos), que chegou ao hospital debilitado com perda ponderal, adenomia, otite persistente (15 dias de tratamento com antibiótico) apresentando lesões crostosas no pavilhão auditivo, cefaleia, febre, tontura e vômito. Sabe-se que a *Stenotrophomonas maltophilia* é uma bactéria emergente, resistente a diversos antibióticos^{188; 189}, causadora de uma ampla gama de infecções tanto em pacientes imunocomprometidos quanto em Imunocompetentes^{190; 191}. Além de bacteremia, essa infecção é responsável por infecções do trato urinário, respiratório, infecções cutâneas e de tecidos moles, endocardite, infecções oculares e meningite^{192; 193} e mais raramente, otite externa¹⁹⁴. Porém, não há relatos de caso como o apresentado neste trabalho de uma otite seguida de meningite. Acredita-se na possibilidade de as bactérias terem migrado para as meninges e provocado a meningite, por uma questão anatômica, pela proximidade entre o ouvido médio e a meninge. De qualquer forma, a ausência de leituras de sequências de outros agentes patogênicos além da *S. maltophilia* no LCR deste paciente sugere fortemente que este microrganismo tenha alguma relação com a manifestação apresentada.

A presença do poliomavírus vírus do símio do 40 (SV40) no LCR foi uma surpresa, pois de acordo com a literatura, não está provado que este vírus possa causar alguma enfermidade em humanos. Este vírus foi introduzido na população humana entre 1955 e 1963, por vacinas de pólio contaminadas produzidas em células de macaco infectadas com SV40¹⁹⁵.

O SV40 é um poliomavírus oncogênico conhecido por induzir câncer primário no cérebro e ossos, mesotelioma maligno e linfomas em animais de laboratório. Um estudo demonstrou que este vírus oncogênico também causa infecções em seres humanos e representa um patógeno emergente¹⁹⁶.

O sequenciamento de nova geração duas amostras não geraram dados correspondentes a nenhum agente infeccioso. Porém, ao analisarmos o prontuário destes dois pacientes, verificamos que o paciente PEV 109 era usuário de cocaína, podendo este ser um caso de encefalopatia por cocaína conforme Damiani et al¹⁹⁷ relatam em seu estudo.

Sabe-se que nem todas as encefalites e meningites são causadas por microrganismos. Estas, por apresentarem sintomatologia semelhante, podem ser facilmente confundidas com encefalopatias causadas por doenças autoimunes, por agentes tóxicos como uso de drogas ilícitas (cocaína), intoxicação por pesticidas, síndromes carenciais (deficiência de tiamina - encefalopatia de Wernicke, ou ainda deficiência de vitamina B12), distúrbios metabólicos sistêmicos (encefalopatia hepática em pacientes portadores de hepatopatia crônica avançada ou insuficiência hepática aguda), anomalias hereditárias (doença de Wilson, transmitida de forma autossômica recessiva caracterizada pelo acúmulo tóxico de cobre no organismo, inclusive no SNC), ou ainda uso crônico de álcool, uso prolongado de diuréticos, entre outros^{197; 198}. Em todos estes casos a ressonância magnética é uma ferramenta extremamente útil para estreitar os possíveis diagnósticos diferenciais em pacientes, pois características de imagem, como os sítios anatômicos acometidos e o padrão de sinal e realce em ressonância magnética (RM), podem ser úteis para definir a causa, em associação com dados clínicos e laboratoriais. Porém, esta não é a técnica de diagnóstico por imagem mais frequentemente utilizada. Na maioria dos casos é realizado primeiramente uma tomografia computadorizada, a qual é limitada a capacidade de diferenciação entre substância branca e cinzenta. A grande deficiência é vista nas doenças desmielinizantes ou em algumas lesões neoplásicas infiltrativas¹⁹⁹.

Um grande percentual de casos ainda permaneceu sem identificação etiológica. Após analisar os resultados juntamente com os dados clínicos dos pacientes, chegou-se à conclusão de que, ao menos, parte das amostras negativas podem ser oriundas de pacientes que sofriam de outras infecções não investigadas neste trabalho como fungos, bactérias e protozoários, bem como doenças não infecciosas, como por exemplo síndromes tóxicas (uso de drogas, intoxicação por produtos agrícolas, etc.) e doenças autoimunes, que apresentam sintomatologia semelhante a encefalite e meningite. Outra possível explicação para as amostras negativas seria a presença de carga viral abaixo do limite de detecção das técnicas padronizadas neste trabalho (falsos negativos). De fato, a replicação dos vírus, bem como a presença do DNA/RNA viral não persistem indefinidamente no LCR dos pacientes infectados, particularmente em pacientes imunocompetentes que geralmente não apresentam demora em montar uma resposta eficaz de anticorpos neutralizantes. É possível, portanto, que a demora, por menor que seja, na coleta (data de entrada do paciente ao hospital, início dos sintomas) do LCR após o aparecimento dos sintomas, possa ter impactado na detecção do agente etiológico de certos casos.

É claro que embora tenhamos detectado possíveis agentes causadores de encefalites e meningites, muitos dos quais sendo perfeitamente compatíveis com os quadros observados, apenas com a identificação de material genético no LCR o diagnóstico final não pode ser fechado, particularmente em indivíduos com HIV, que pelo estado imunológico comprometido, podem apresentar coinfeções e reativações de patógenos não necessariamente relacionadas diretamente ao quadro neurológico observado. Portanto, nossos resultados apenas indicam a presença de agentes, virais ou não, que juntamente às suspeitas iniciais levantadas pelos neurologistas responsáveis, podem indicar que sejam os agentes etiológicos responsáveis.

A técnica de PCR tem sido utilizada para complementar o diagnóstico das infecções do SNC, porém, estas técnicas ainda precisam ser otimizadas, com sensibilidade suficiente, talvez com limite de detecção abaixo de 10 cópias/mL, para detectar agentes no LCR. Ainda, a simples detecção de material genético pertencente a um patógeno não necessariamente é diagnóstica, pois este fluido circula entre o espaço subaracnóide do SNC e a medula, representando indiretamente o que está acontecendo no SNC. Ainda, a pequena quantidade de material genético viral presente em testes moleculares pode decorrer de acidente de punção, que as vezes por ser muito sutil não é visualmente detectado. A coleta de sangue, realizada em paralelo, pode ajudar a diferenciar esse tipo de situação. De qualquer forma, entende-se que amostra ideal para a pesquisa do agente seria material de biopsia encefálica ou meníngea, o qual é menos utilizado por ser um método muito invasivo.

Técnicas moleculares, como a PCR, são ideais para identificar organismos difíceis ou impossíveis de serem cultivados e tem sido amplamente aplicada na detecção de vírus de DNA e RNA no LCR. A técnica pode ser realizada de forma rápida e barata, e se tornou um componente integral da prática médica diagnóstica em países desenvolvidos. Além de seu uso para a identificação de agentes etiológicos no cenário clínico, a PCR também tem sido usada para quantificar a carga viral e monitorar a duração e adequação da terapia com drogas antivirais em diferentes patologias. Entretanto, apesar do emprego dessas técnicas ser cada vez maior nos grandes centros, ainda uma grande porcentagem dos casos de encefalites e meningites (até 70%) permanece sem diagnóstico²⁰⁰.

Embora técnicas moleculares sejam sensíveis e muito indicadas para o diagnóstico rápido, as limitações impostas pela própria técnica (como limite de detecção, presença de ácido nucleico em quantidade suficiente no momento da

coleta, e especificidade - pode ser prejudicial ao negligenciar cepas/linhagens distintas daquela cuja a técnica foi desenhada para detectar), levam a não determinação do agente etiológico em muitos casos. Pensando nisso, muitos trabalhos objetivaram padronizar técnicas de PCR multiplex, onde é possível pesquisar mais de um agente de uma só vez.

O Panherpes¹⁶⁴ é um exemplo. Capaz de detectar os 8 herpesvirus humanos de uma só vez, pode ser bastante útil. Entretanto, este protocolo em particular requer digestão enzimática pós amplificação. Se por um lado temos aumento na capacidade de busca de vários patógenos de uma só vez, perde-se na sensibilidade desta técnica. Outros autores desenvolveram PCR multiplex que visam detectar certos herpesvírus e enterovirus²⁰¹, que são realmente os agentes tidos como mais prevalentes em encefalites e meningites ao redor do mundo.

Finalmente, as encefalites e meningites assépticas podem ser causadas por agentes tóxicos, reações autoimunes, agentes bacterianos, fúngicos, protozoários e em se tratando de vírus, mais de cem foram descritos como potenciais causadores de encefalites em humanos²⁰², que, obviamente variam em prevalência e incidência de acordo com a população. Determinar, portanto, a etiologia dessas enfermidades em nosso país é importante e necessária, pois o atraso no reconhecimento do agente pode ser extremamente prejudicial ao paciente, que está sofrendo lesões muitas vezes irreversíveis.

Cabe ainda ressaltar a importância de aplicação ou desenvolvimento de novas técnicas de diagnóstico rápido como por exemplo os métodos de sequenciamento em larga escala, os quais têm sido aprimorados e direcionados para auxiliar no diagnóstico de uma grande variedade de doenças infecciosas. Esses métodos permitem uma rápida e precisa caracterização do agente etiológico, encontrando DNA ou RNA de microrganismos em qualquer tipo de amostra biológica.

De fato, a metagenômica é uma alternativa viável para a identificação de patógenos que não requer a amplificação previa de um gene particularmente conhecido para que seja realizada. Ainda, embora os principais agentes etiológicos associados à EMs compreendam uma lista limitada, a possibilidade de infecção por outros agentes, já associados ou não a EMs é muito mais extensa.

Dessa forma, acreditamos que esse estudo contribuiu na compreensão da epidemiologia das EMs.

CONCLUSÃO

7. CONCLUSÃO

- Foi possível identificar o DNA de BKV, JCV, HSV e EBV por técnicas de PCR no LCR de indivíduos diagnosticados com encefalite e/ou meningite. Cinco pacientes para BKV eram coinfectados com BKV/HSV.
- Foram padronizadas metodologias de PCR convencional e em tempo real para diferentes agentes virais, e as técnicas de PCR em tempo real apresentaram um limite de 10 cópias/ μ L.
- Dentre os poliomavírus detectados nas amostras de LCR analisadas, o BKV foi o mais prevalente. Os demais vírus propostos não foram identificados nas demais amostras.
- Através do sequenciamento em larga escala identificamos a presença de agentes infecciosos no LCR em 6 das 8 amostras consideradas negativas ou inconclusivas para os agentes investigados pela PCR convencional e Real Time, mostrando-se uma alternativa conveniente para detecção de agentes no LCR.

REFERÊNCIAS

8. REFERÊNCIAS

1. Machado LR, Gomes HR. Processos Infecciosos do Sistema Nervoso. In: Nitrini R, Bacheschi LA. A neurologia que todo médico deve saber. São Paulo: Editora Atheneu, 2003, p.205-234.
2. Netter, FH. Cabeça e pescoço. In: Netter, FH. Atlas de anatomia humana. Ediotra: Elsevier editora LTDA, 2015, p.101-116.
3. Canuto, R, Puccioni-Sohler, M. Fundamentos do exame. In: Puccioni-Sohler, M. Diagnóstico de Neuroinfecção com abordagem dos exames do líquido cefalorraquidiano e neuroimagem. Editora Rubio, p. 3-26, 2008.
4. Jurado R, Walker HK. Cerebrospinal Fluid. In: Walker H K, Hall W D, Hurst JW. Clinical Methods: The History, Physical, and Laboratory Examinations. 3rd edition. Boston: Butterworths; 1990. Chapter 74. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK398/>. Acesso em 16 de março de 2018.
5. Melo CL, Martins AMC, Martins RD, Queiroz MGR. Análise laboratorial do líquido céfalo-raquidiano (líquor/LCR). Revista Brasileira de Análises Clínicas, 2003, 35(3):109-112.
6. Netter, FH. Dorso e medula espinhal. In: Netter, FH. Atlas de anatomia humana. Ediotra: Elsevier editora LTDA, 2015, p.160-170
7. Laterra J, Keep R, Betz LA, Goldstein GW. Blood-Cerebrospinal Fluid Barrier. In: SIEGEL, G. J., AGRANOFF, B. W., ALBERS, R.W., FISHER, S. K., UHLER, M. D. Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular and Medical Aspects. 6th edition. Philadelphia: Lippincott-Raven; 1999. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK27998/>. Acesso em 23 de janeiro de 2018.
8. Sakkaa L, Coll G, Chazala J. Anatomie et physiologie du liquide cérebrospinal. Annales françaises d'Oto-rhino-laryngologie et de Pathologie Cervico-faciale, 2011,128(6):359-366.
9. Correale J, Villa A. Cellular elements of the blood-brain barrier. Neurochem Res., 2009, 34(12):2067-77. doi: 10.1007/s11064-009-0081-y.
10. Silverthorn, D. U. Central Nervous System. In: Silverthorn, D. U. Human physiology: an integrated approach, 5ª ed. Cap. 9, p.296-332, 2010.

11. 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. *Revista Brasileira Terapia Intensiva*, 2011, 23(2):222-227.
12. Zlokovic BV. The blood–brain barrier in health and chronic neurodegenerative disorders. *Neuron.*, 2008, 57:178–201.
13. Daneman R. The Blood–Brain Barrier in Health and Disease. *Ann. Neurol*, 2012, 72:648–672.
14. Harrison-Brown M, Liu G-J, Banati R. Checkpoints to the Brain: Directing Myeloid Cell Migration to the Central Nervous System. Muraca M, ed. *International Journal of Molecular Sciences*. 2016, 17(12):2030. doi:10.3390/ijms17122030.
15. Daneman R, Prat A. The Blood-Brain Barrier. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biolog*, 2015, 7(1):1-23. doi:10.1101/cshperspect.a020412.
16. WHO - World Health Organization. What are neurological disorders? Update 2016. Disponível em: <http://www.who.int/features/qa/55/en/>. Acesso em 17 de abril de 2018.
17. Parikh V, Tucci V, Galwankar S. Infections of the nervous system. *International Journal of Critical Illness and Injury Science*, 2012, 2(2):82-97. doi:10.4103/2229-5151.97273.
18. Nath A, Berger JR. Meningite viral aguda e encefalite. In: GOLDMAN, L.; AUSIELLO, D. *Tratado de Medicina Interna*. 22ª Edição. Rio de Janeiro: Editora Elsevier. cap. 451, p. 2728-2731, 2005.
19. Zanini LA, Melo-Souza, S. E. Infecções do Sistema Nervoso Central. In: PORTO, C. C. *Semiologia Médica*. 5ª Edição. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan. p. 1191-1194, 2005.
20. Kennedy P. VIRAL ENCEPHALITIS: CAUSES, DIFFERENTIAL DIAGNOSIS, AND MANAGEMENT. *Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry*. 2004;75(Suppl1):i10-i15. doi:10.1136/jnnp.2003.034280.

21. CVE (CENTRO DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA). CVE/CCD/SES-SP: O que você precisa saber sobre meningite. São Paulo, fev. 2008. Disponível em ftp://ftp.cve.saude.sp.gov.br/doc_tec/RESP/MENI_SOBRE.pdf. Acesso em: 07 de fevereiro de 2013.
22. NSWG– New South Wales Government. Disease reporting. 2010. Disponível em: <http://www.health.nsw.gov.au/Infectious/Documents/ph-hospitals-notification.pdf>. Acesso em: 06 de abril de 2018.
23. WHO – World Health Organization. Dengue and severe dengue. 2017 Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs117/en/>. Acesso em 08 de abril de 2018.
24. Forbes CD, Jackson WF. Atlas colorido e texto de Clínica Médica. 2ª edição. São Paulo: Editora MIR Assessoria, 1998.
25. Chadwick DR. Viral meningitis. Brazilian Medical Bulletin, 75:01-14, 2005.
26. Thomas CL. Dicionário Médico Enciclopédico Taber. Barueri, Sp: Manole, p. 1508, 2000.
27. Varella RB, Pires IL, Saraiva CA, Guimarães ACC, et al. Diagnóstico laboratorial da infecção pelo vírus herpes simples (HSV) em pacientes transplantados e não-transplantados. Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial, 2005, 41(4):257-62.
28. SES/SP - Secretaria de Estado de Saúde de São Paulo. Meningites virais. Revista de Saúde Pública, 2006, 40(4):748-50.
29. Handique SK. Viral infections of the central nervous system. Neuroimaging Clinics of North America, 2011, 21(4):777-794.
30. Boucher A, Herrmann JL, Morand P, Buzelé R, et al. Epidemiology of infectious encephalitis causes in 2016. Médecine et maladies infectieuses, 2017, 47(3):221-235. doi: 10.1016/j.medmal.2017.02.003.
31. Mendoza LP, Bronzoni RV, Takayanagui OM, Aquino VH, et al. Viral infections of the central nervous system in Brazil. Journal of Infection, 2007, 54:589-596.

32. Santos DC. Estabelecimento de métodos moleculares para aplicação no diagnóstico rápido de vírus neurotrópicos. 2009. 165f. Tese (Doutorado em Microbiologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo.
33. Araújo F, Nogueira R, Araújo MS, Perdigão A, et al. Dengue in Patients with Central Nervous System Manifestations, Brazil. *Emerging Infectious Diseases*, 2012, 18:677-792 doi: 10.3201/eid1804.111522.
34. Cohen FS. How Viruses Invade Cells. *Biophysical Journal*, 2016, 110(5):1028-1032, 2016. doi: 10.1016/j.bpj.2016.02.006.
35. Gonçalves JLS, Couceiro JNSS, von Hubinger MG, Arentz LAMGF, et al. Viroses do Sistema Nervoso Central. In: Santos NSO, Romanos MTV, Wigg MD. *Virologia Humana*, 2015, 3ed., 2015, p. 429-487.
36. Charles PC, Trgovcich J, Davis NL, Johnston RE. Immunopathogenesis and immune modulation of Venezuelan equine encephalitis virus-induced disease in the mouse. *Virology*. 2001, 284(2):190-202.
37. Wigg MD. Viroses dermatóticas. In: Santos NSO, Romanos MTV, Wigg MD. *Virologia Humana*, 3ed. 2015, p. 232-269.
38. Roizman B, Carmichael LE, Deinhardt F, de-The G, Nahmias A, J, Plowright W, Rapp F, Sheldrick P, Takahashi M, Wolf K, *Herpesviridae Definition, Provisional Nomenclature, and Taxonomy*. *Intervirology*, 1981, 16:201-217.
39. Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA. Herpes-vírus Humanos. In: Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA. *Microbiologia Médica*, Elsevier 7 ed., 2013, p. 461-483.
40. Butel JS. Herpesvirus. In: Jawetz, Melnick & Adelberg. *Microbiologia Médica*, 26.ed., cap. 33, p. 437-441, 2014.
41. Lehman IR, Boehmer PE. Replication of Herpes Simplex Virus DNA. *The Journal of Biological Chemistry*, 1999, 274(40):28059–28062.
42. Laine RF, Albecka A, Van de Linde S, Rees EJ, et al. Structural analysis of herpes simplex virus by optical super-resolution imaging. *Nature Communications*, 2015. <http://dx.doi.org/10.1038/ncomms6980>. Disponível

em: <https://www.nature.com/articles/ncomms6980#supplementary-information>. Acesso em: 08 de abril de 2018.

43. Schleiss MR. Persistent and recurring viral infections: the human herpesviruses. *Current Problems in Pediatric and Adolescent Health Care*, St. Louis, 2009, 39:7-23.
44. Kieff E, Hoyer B, Bachenheimer S, Roizman B. Genetic Relatedness of type 1 and type 2 Herpes simplex viruses. *Journal of Virology*, 1972, 9(5):738-745.
45. Whitley RJ, Roizman B. Herpes simplex virus infections. *The Lancet*, 2001, 357:513-518.
46. LeGoff J, Péré H, Bélec L. Diagnosis of genital herpes simplex virus infection in the clinical laboratory. *Virology Journal*. 2014, 11:83. doi:10.1186/1743-422X-11-83.
47. Modrow S, Falke D, Truyen U, Schätzl H. Herpesviruses. In: Modrow S, Falke D, Truyen U, Schätzl H. *Molecular Virology*. Berlin Springer, 2010, p. 740-794.
48. Azambuja TWF, Bercini F, Furlanetto TW. Herpes simples: revisão da literatura. *R. Fac. Odonto*, 2004, 45(2):43-46.
49. Wald A, Link K. Risk of human immunodeficiency virus infection in herpes simplex virus type 2-seropositive persons: a meta-analysis. *J. Infect. Dis.*, 2002, 185:45-52.
50. Kennedy PGE, Chaudhuri A. Herpes simplex encephalitis: Herpes simplex virus encephalitis still has an unacceptably high mortality. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry*. 2002, 73:237-238.
51. Nazareth C, Pereira B, Alves H, Da Cunha JG, et al. Encefalite por vírus herpes simplex: estatística de 19 anos de um serviço de doença infecciosa. *Revista Portuguesa de Doenças Infecciosas*, 2011, 7(2):68-76.
52. Stahl JP, Mailles A, Dacheux L, Morand P. Epidemiology of viral encephalitis in 2011. *Médecine et maladies infectieuses*, 2011, 41(9):453-464. doi: 10.1016/j.medmal.2011.05.015.

53. Pessa LFC. Infecções pelos vírus da família Herpesviridae no sistema nervoso central: aspectos clínicos, epidemiológicos e laboratoriais em pacientes imunocomprometidos e imunocompetentes. 2011. 180f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Departamento de Patologia Básica, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará, Curitiba, 2011.
54. Breuer J, Grose C, Norberg P, Tipples G, et al. A proposal for a common nomenclature for viral clades that form the species varicella-zoster virus: summary of VZV Nomenclature Meeting 2008, Barts and the London School of Medicine and Dentistry. *J Gen Virol.* 2010, 9(4):821-828.
55. Campadelli-Fiume G, Menotti L. Entry of alphaherpesviruses into the cell. In: Arvin A, Campadelli-Fiume G, Mocarski E, Moore PS, Roizman B, Whitley R, Yamanishi M. *Human Herpesviruses: Biology, Therapy, and Immunoprophylaxis.* Cambridge University Press, 2007. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK47385/>. Acesso em 16 de fevereiro, 2018.
56. Brasil. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica, Brasília. Varicela/Herpes zoster. Doenças infecciosas e parasitárias: guia de bolso, 2008, 7:351-358.
57. Gilden D, Cohrs RJ, Mahalingam R, Nagel MA. Varicella zoster virus vasculopathies: diverse clinical manifestations, laboratory features, pathogenesis, and treatment. *Lancet Neurol.*, 2009, 8(8): 1-19.
58. Grann JWJ. Varicella Zoster virus: atypical presentations and unusual complications. *The Journal of Infectious Diseases*, 2002, 186 (suppl 1):s91-98.
59. Dominguez G, Dambaugh TR, Stamey FR, Dewhurst S, et al. Human Herpesvirus 6B Genome Sequence: Coding Content and Comparison with Human Herpesvirus 6A. *J. Virol.*, 1999, 73(10):8040-8052.
60. Costa LJ. Viroses multissistêmicas – Herpesvirus humano 6 e 7. In: Santos NS de O, Romanos MTV, Wigg MD. *Virologia Humana*, 3ed., 2015, p. 385-395.
61. Yoshida M, Uno F, Bat ZL, Yamada M, Nii S, Sata T, Kurata T, Yamanishi K, Takahashi M. Electron Microscopic Study of a Herpes-Type Virus Isolated from an Infant with Exanthem Subitum. *Microbiol. Immunol.* 1989, 33(2):147-154.

62. De Bolle L, Naesens L, De Clercq E. Update on Human Herpesvirus 6 Biology, Clinical Features, and Therapy. *Clinical Microbiology Reviews*, 2005, 18(1):217–245. <http://doi.org/10.1128/CMR.18.1.217-245.2005>.
63. Mori, Y., Yang X, Akkapaiboon P, Okuno T, Yamanishi K. Human herpesvirus 6 variant A glycoprotein H-glycoprotein L-glycoprotein Q complex associates with human CD46. *J. Virol.*, 2003, 77:4992-4999.
64. Corti M, Villafañe MF, Trione N, Mamanna L, Bouzas B. Human herpesvirus 6: report of emerging pathogen in five patients with HIV/AIDS and review of the literature. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 2011, 44(4):522-525.
65. Tavakoli NP, Nattanmai S, Hull R, Fusco H, et al. Detection and Typing of Human Herpesvirus 6 by Molecular Methods in Specimens from Patients Diagnosed with Encephalitis or Meningitis. *J. Clin. Microbiol.*, 2007, 45(12):3972-3978.
66. Fotheringham J, Akhyani N, Vortmeyer A, Donati D, et al. Detection of Active Human Herpesvirus-6 Infection in the Brain: Correlation with Polymerase Chain Reaction Detection in Cerebrospinal Fluid, *The Journal of Infectious Diseases*, Volume 195, Issue 3, 1 February 2007, Pages 450–453, <https://doi.org/10.1086/510757>
67. Herpesvirus–6 Infection in the Brain: Correlation with Polymerase Chain Reaction Detection in Cerebrospinal Fluid. *The Journal of Infectious Diseases* 2007; 195:450–445.
68. Strausbaugh LJ, Caserta MT, Mock DJ, Dewhurst S. Human herpesvirus 6. *Clinical Infectious Diseases*, 2001, 33(6):829-33.
69. Vinnard C, Barton T, Jerud E, Blumberg E. A report of human herpesvirus 6-associated encephalitis in a solid organ transplant recipient and a review of previously published cases. *Liver Transplantation*, 2009, 15(10):1242-6.
70. Yao K, Honarmand S, Espinoza A, Akhyani N, Glaser C, Jacobson, S. Human-6 Herpesvirus Detection in Cerebrospinal Fluid of Encephalitis Patients *Annals of neurology*, 2009, 65(3):257-267. doi:10.1002/ana.21611.
71. Isaacson E, Glaser CA, Forghani B, Amad Z, et al. Evidence of human herpesvirus 6 in 4 immunocompetent patients with encephalitis. *Clin. Infect. Dis.*, 2005, 40:890-893.

72. Birnbaum T, Padovan CS, Sporer B, Rupprecht TA, et al. Severe meningoencephalitis caused by human herpesvirus 6 type B in an immunocompetent woman treated with ganciclovir. *Clin. Infect. Dis.*, 2005, 40:887-889, 2005.
73. Whitley RJ, Lakeman FD. Human Herpesvirus 6 Infection of the Central Nervous System: Is It Just a Case of Mistaken Association? *Clinical Infectious Diseases*, 2005, 40(6): 894–895. <https://doi.org/10.1086/427953>.
74. Astriti M, Zeller V, Boutolleau D, Gautheret-Dejean A, Allen G, Seilhean D, Agut H, Bricaire F, Katlama C, Bossi P. Fatal HHV-6 associated encephalitis in an HIV-1 infected patient treated with cidofovir. *J. Infect.* 2006, 52(4):237-42.
75. Barigou M, Garniera C, Debard A, Mengelle C, et al. Favorable outcome of severe human herpes virus-6 encephalitis in an HIV-infected patient. *AIDS* 2016, 30(3):532-534. doi:10.1097/QAD.0000000000000973.
76. Kasberg-Koniarczyk HL. Human Herpesvirus-6 Encephalitis After Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Journal of the Advanced Practitioner in Oncology*. 2014;5(5):373-378.
77. Ogata M, Fukuda T, Teshima T. Human herpesvirus-6 encephalitis after allogeneic hematopoietic cell transplantation: What we do and do not know. *Bone Marrow Transplantation*, 2015, 50:1030–1036. doi:10.1038/bmt.2015.76.
78. Ogata M, Oshima K, Ikebe T, Takano K, Kanamori H, Kondo T, Ueda Y, Mori T, Hashimoto H, Ogawa H, Eto T, Ueki T, Miyamoto T, Ichinohe T, Atsuta Y & Fukuda T. Clinical characteristics, and outcome of human herpesvirus-6 encephalitis after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplantation*, 2017, 52:1563–1570. doi:10.1038/bmt.2017.175.
79. Phan TL, Lautenschlager I, Razonable RR, Munoz FM. HHV-6 in liver transplantation: A literature review. *Liver Int.*, 2018, 38(2):210-223. doi: 10.1111/liv.13506.
80. Nicolle AL, Stark GL, Taylor CE, Wipat W, Jackson GH. HUMAN HERPESVIRUS 6 ENCEPHALITIS FOLLOWING FLAG CHEMOTHERAPY. *British Journal of Haematology*, 2003, 122, 159–167.

81. Frey JW, Cherabie JN, Assi MA. Human herpesvirus-6 encephalitis following chemotherapy induction for acute myelogenous leukemia. *Transpl. Infect. Dis.* 2017, 19(6). doi: 10.1111/tid.12756.
82. Frisque RJ, Bream GL, Cannella MT. Human polyomavirus JC virus genome. *Journal of Virology*, 51(2):458-469, 1984.
83. Padgett BL, Walker DL, ZuRhein GM, Eckroade RJ, Dessel BH. Cultivation of papova like virus from human brain with progressive multifocal leucoencephalopathy. *Lancet.*,1971,1(7712):1257-60.
84. Kwark EJ, Vilchez AR, Randhawa P, et al. Pathogenesis and management of polyomavirus infection in transplant recipients. *Clin Infect Dis.* 2002, 35:1081-1087.
85. Ahsan N, Shah KV. Polyomaviruses and Human Diseases. In: Ahsan N. (eds) *Polyomaviruses and Human Diseases. Advances in Experimental Medicine and Biology*, 2006, 577:1-18.
86. Randhawa P, Vats A, Shapiro R, Weck K, Scantlebury V. BK Virus: Discovery, Epidemiology, and Biology. *Graft.* 2002,5:S19-S27.
87. Olsen GH, Andresen PA, Hilmarsen HT, Bjørang O, et al. Genetic variability in BK Virus regulatory regions in urine and kidney biopsies from renal-transplant patients. *J Med Virol.* 2006, 78(3):384-393.
88. Chang D, Haynes JI 2nd, Brady JN, Consigli RA. Identification of a nuclear localization sequence in the polyomavirus capsid protein VP2. *Virology.* 1992, 191(2):978-983.
89. Snyderman DR, Kwak EJ, Vilchez, RA, Randhawa P, Shapiro R, Butel JS, Kusne S. Pathogenesis and Management of Polyomavirus Infection in Transplant Recipients, *Clinical Infectious Diseases*,2002, 35(9): 1081–1087. <https://doi.org/10.1086/344060>.
90. Silva, R L. Polyoma BK virus: an emerging opportunistic infectious agent of the human central nervous system. *Brazilian Journal of Infectious Diseases*, 2011, 15(3), 276-284. <https://dx.doi.org/10.1590/S1413-86702011000300017>.

91. Dörries K. Latent and Persistent Polyomavirus Infection. In: Khalili K, Stoner GL. Human polyomaviruses: molecular and clinical perspectives. 1st ed. New York: Wiley-Liss, 2001, p.197-235.
92. Hirsch HH. BK virus: opportunity makes a pathogen. *Clinical Infectious Diseases*. 2005, 41(3):354-360.
93. Reploeg MD, Storch GA, Clifford DB. BK Virus: A Clinical Review, *Clinical Infectious Diseases*, 2001, 33(2):191–202. <https://doi.org/10.1086/321813>.
94. Jørgensen GEK, Hammarin AL, Bratt G, Grandien, et al. Identification of a Unique BK Virus Variant in the CNS of a Patient With AIDS. *Journal of Medical Virology*, 2003, 7:14–19.
95. Behzad-Behbahani A, Klapper PE, Valley PJ, Cleator GM, et al. Detection of BK virus and JC virus DNA in urine samples from immunocompromised (HIV-infected) and immunocompetent (HIV-non- infected) patients using polymerase chain reaction and microplate hybridization. *Journal of Clinical Virology*, 2003, 29(4):224-229.
96. Dang X, Wüthrich C, Gordon J, Sawa H, et al. JC Virus Encephalopathy Is Associated with a Novel Agnoprotein-Deletion JCV Variant. *PLoS ONE*, 2012, 7(4):1-10.
97. Vago L, Cinque P, Sala E, Nebuloni Ma, Caldarelli R, Racca S, et al. JCV-DNA and BKV-DNA in the CNS tissue and CSF of AIDS patients and normal subjects. Study of 41 cases and review of the literature. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol.*, 1996, 12:139-146.
98. Vidal JE, Fink MC, Cedeno-Laurent F, Delbue S, et al. BK virus associated meningoencephalitis in an AIDS patient treated with HAART. *AIDS Res Ther*. 2007, 4(13):1-5.
99. Azzi A, De Santis R, Ciappi S, Leoncini F, et al. Human polyomaviruses DNA detection in peripheral blood leukocytes from immunocompetent and immunocompromised individuals. *J. Neurovirol.* 1996, 2(6):411-416.
100. Dolei A, Pietropaolo V, Gomes E, Di Taranto C, Ziccheddu M, Spanu M, Lavorino C, Manca M, Degener A. Polyomavirus persistence in lymphocytes: prevalence in lymphocytes from blood donors and healthy personnel of a blood transfusion centre. *J. Gen. Virol.* 2000, 81(8):1967-1973. doi:10.1099/0022-1317-81-8-1967.

101. Antonioli L, Borges R, Goldani LZ. BK Virus Encephalitis in HIV-Infected Patients: Case Report and Review. *Case Reports in Medicine*. 2017, 2017:1-5. doi:10.1155/2017/4307468.
102. Kimura T, Sasaki M, Okumura M, Kim E, Sawa H. Flavivirus Encephalitis Pathological Aspects of Mouse and Other Animal Models. *Veterinary Pathology*, 2010, 47(5): 806-818.
103. Mackenzie JS, Gubler DJ, Petersen LR, Emerging flaviviruses: the spread and resurgence of Japanese encephalitis, West Nile and dengue viruses. *Nat. Med.*, 2004, 10:S98-S109.
104. Gould EA, Solomon T. Pathogenic flaviviruses. *Lancet*, 2008, 371:500-509.
105. Costello M, Yungbluth M. Infecções Virais. In: HENRY, J. B. Diagnósticos clínicos e tratamento por métodos laboratoriais. 20ª Edição. São Paulo: Editora Manole. 2008, p. 1203-1233.
106. Romanos MTV, Cavalcanti JF. Febre amarela e Dengue. In: Santos NS de O, Romanos MTV, Wigg MD. *Virologia Humana*, 3ed., 2015, p. 489-497.
107. Garcia MDF, Mazzon M, Jacobs M, Amara A. Pathogenesis of Flavivirus Infections: Using and Abusing the Host Cell. *Cell Host & Microbe*, 2009, 5(4):318-328, ISSN 1931-3128. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1931312809001024>, acesso em 27 de março de 2018.
108. Karabatsos N. International catalogue of arboviruses, including certain other viruses of vertebrates. 3rd ed. San Antonio - USA: American Society of Tropical Medicine and Hygiene, 1985.
109. Casseb AR. et al. Abovírus: Importante zoonose na Amazônia Brasileira. *Vet. e Zootec.* 2013, 20(3):9-21.
110. Figueiredo LTM. Emergent arboviruses in Brazil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 2007, 40(2):224-229. <https://dx.doi.org/10.1590/S0037-86822007000200016>.

111. Van der Meulen KM, Pensaert MB, Nauwynck, HJ. West Nile Virus in the Vertebrate World, Arch Virol. 2005, 150:637-657.
112. Soares CN, Castro MJ, Peralta JM, Freitas MR, Puccioni-Sohler M. O vírus do Nilo Ocidental é uma causa potencial de infecção do sistema nervoso central no Brasil? Arq Neuropsiquiatr., 2010, 68: 761-3.
113. Vieira MACS, Romano APM, Borba AS, et al. West Nile Virus Encephalitis: The First Human Case Recorded in Brazil. The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene. 2015, 93(2):377-379. doi:10.4269/ajtmh.15-0170.
114. Figueiredo ML, Figueiredo LT. Revisão sobre infecções do sistema nervoso central pelos flavivírus de St. Louis, encefalite, Rocio e Nilo Ocidental no Brasil, 2004-2014. Adv Microbiol., 2014; 955-61.
115. CDC - Centers for Disease Control and Prevention. West Nile Virus. 2016a <https://www.cdc.gov/features/westnilevirus/index.html>. Acesso em: 08 de abril de 2018.
116. SESAPI – Secretaria de Estado da Saúde do Piauí. 2017. Disponível em: <http://www.saude.pi.gov.br/noticias/2017-06-15/8057/nota-febre-do-nilo-ocidental.html>. Acesso em: 08 de abril de 2018.
117. Ferreira MLB, Cavalcanti CG, Coelho CA, Mesquita SD. Neurological Manifestations of Dengue: study of 41 cases. Arquivos de Neuropsiquiatria, 2005, 63:488-493.
118. Villabona-Arenas CJ, De Oliveira JL, Capra C de S, Balarini K, Loureiro M, Fonseca CR, Passos S., Zanotto PM. Detection of four dengue serotypes suggests rise in hyperendemicity in urban centers of Brazil. PLoS Negl Trop Dis. 2014 Feb 27; 8(2):e2620. doi: 10.1371/journal.pntd.0002620. eCollection 2014.
119. Tassara MP, Guilarde AO, Rocha BAM, Féres VCR, et al. Neurological manifestations of dengue in Central Brazil. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, 2017, 50(3):379-382. <https://dx.doi.org/10.1590/0037-8682-0444-2016>.
120. Heinen LBS, Zuchi N, Serra OP, Cardoso BF, et al. Vírus da encefalite de Saint Louis em Mato Grosso, Centro-Oeste, Brasil. Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, 2015, 57(3):215-220. <https://dx.doi.org/10.1590/S0036-46652015000300006>.

121. CDC - Centers for Disease Control and Prevention. Saint Louis Encephalitis 2017. Disponível em: <https://www.cdc.gov/sle/index.html>. Acesso em: 09 de abril de 2018.
122. Díaz LA, Albrieu Llinás G, Vázquez A, Tenorio A, Contigiani MS. Silent Circulation of St. Louis Encephalitis Virus Prior to an Encephalitis Outbreak in Cordoba, Argentina (2005). Powers AM, ed. PLoS Neglected Tropical Diseases. 2012;6(1):e1489. doi:10.1371/journal.pntd.0001489.
123. Pinheiro FP, LeDuc JW, Travassos da Rosa AP, Leite OF. Isolation of St. Louis encephalitis virus in patient from Belém, Brazil. Am. J. Trop. Med. Hyg., 1981, 30(1):145-148.
124. Rocco IM, Santos, CLS, Bisordi I, Petrella SMCN, et al. Vírus da encefalite de St. Louis: primeiro isolamento de um humano no estado de São Paulo, Brasil. Rev Inst Med Trop São Paulo, 2005, 47(5):281-285. <http://dx.doi.org/10.1590/S0036-46652005000500008>.
125. Mondini A, Cardeal ILS, Lázaro E, et al. Saint Louis Encephalitis Virus, Brazil. Emerging Infectious Diseases. 2007, 13(1):176-178. doi:10.3201/eid1301.060905.
126. Maia FGM, Chávez JH, Souza WM, Romeiro MF, et al. Infection with Saint Louis encephalitis virus in the city of Ribeirão Preto, Brazil: report of one case. Int. J. Infect. Dis., 2014, 269:96-7.
127. Figueiredo LT. Infecção pelos vírus Rocio e Saint Louis podem se tornar emergentes no Brasil. SBM – Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. 2017. Disponível em: <http://www.sbmt.org.br/portal/infeccao-pelos-virus-rocio-e-saint-louis-podem-se-tornar-emergentes-no-brasil/>. Acesso em: 08 de abril de 2018.
128. Iversson LB. Aspectos da epidemia de encefalite por arbovirus na região do Vale do Ribeira, S. Paulo, Brasil, no período de 1975 a 1978. Rev. Saúde Pública, 1980, 14(1):9-35.
129. Lopes OS, Sacchetta LA, Coimbra TLM, Pinto GA, et al. Emergence of a new arbovirus disease in Brazil. II. Epidemiologic studies on 1975 epidemic. Amer. J. Epidem., 1978, 108(5):394-401.

130. Neves AS, Machado CJ. A reemergência do vírus Rocio no Brasil. Rev Fac Ciênc Méd Sorocaba. 2016, 18(1):61-2.
131. Burakoff A, Lehman J, Fischer M, Staples JE, et al. West Nile Virus and Other Nationally Notifiable Arboviral Diseases - United States, 2016. Morbidity and Mortality Weekly Report. 2018, 67(1):13-17. doi:10.15585/mmwr.mm6701a3.
132. ICTV – International Committee on Taxonomy of Viruses. ICTV 9th Report, 2011. Disponível em: https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_9th_report/negative-sense-rna-viruses-2011/w/negrna_viruses/209/orthomyxoviridae. Acesso em: 09 de abril de 2018
133. Couch RB. Orthomyxoviruses. In: Baron S, editor. Medical Microbiology. 4th edition. Galveston (TX): University of Texas Medical Branch at Galveston, 1996. Chapter 58. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK8611/> Acesso em: 15 de maio, 2015.
134. Couceiro JNSS, Mendes GS, Silva RC. Viroses Respiratórias. In: Santos NS de O, Romanos MTV, Wigg MD. Virologia Humana, 3ed., 2015, p.302-349
135. CDC - Centers for Disease Control and Prevention. Influenza Type A Viruses and Subtypes. 2013. Disponível em: <https://www.cdc.gov/flu/avianflu/influenza-a-virus-subtypes.htm>. Acesso em: 5 de abril de 2018.
136. Bouvier NM, Palese P. "The biology of influenza viruses". Vaccine. 2008, 26(4):D49-53. <https://dx.doi.org/10.1016/j.vaccine.2008.07.039>.
137. Wright, PF, Neumann, G, Kawaoka, Y. Orthomyxoviruses. In: Knipe DM, Howley PM, editors. Fields Virology. Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins. 5th. edn. 2007. p. 1691-1740.
138. Hayden FG. Influenza. In: Goldman L, Ausiello D. Tratado de Medicina Interna. 22ª Edição. Rio de Janeiro: Editora Elsevier, 2005, p. 2306-2311.
139. Meijer WJ, Linn FHH, Wensing AMJ, et al. Acute influenza virus-associated encephalitis and encephalopathy in adults: a challenging diagnosis. JMM Case Reports. 2016, 3(6):e005076. doi:10.1099/jmmcr.0.005076.
140. ICTV - International Committee on Taxonomy of Viruses. Virus Taxonomy: The Classification and Nomenclature of Viruses Review, 2014.

141. Yin-Murphy M, Almond JW. Picornaviruses. In: Baron S, editor. Medical Microbiology. 4th edition. Galveston (TX): University of Texas Medical Branch at Galveston; 1996. Chapter 53. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK7687/> acesso em: 28 de março de 2018.
142. Couceiro JN dos SS, von Hubinger MG, Arentz LAMGF. Viroses do Sistema Nervoso Central - Enterovírus. In: Santos NS de O, Romanos MTV, Wigg MD. Virologia Humana, 2015, 3ed., p. 447-452.
143. Pallansch MR, Roos R. Enteroviruses. In: Knipe DM, Howley PM, editors. Fields Virology. Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins 5th ed, 2007. p.839–893.
144. Horstmann DM. Enterovirus infections of the central nervous system. The present and future of poliomyelitis. Med Clin North Am., 1967, 51(3):681-92.
145. Strikas RA, Anderson LJ, Parker RA. Source: The Journal of Infectious Diseases, 1986, 153(2):346-351.
146. CDC - Centers for Disease Control and Prevention. Viral Meningitis. 2016b. Disponível em: <https://www.cdc.gov/meningitis/viral.html>. Acesso em: 08 de abril de 2018.
147. Ahlbrecht J, Hillebrand LK, Schwenkenbecher P, Ganzenmueller T, et al. Cerebrospinal fluid features in adults with enteroviral nervous system infection. Int J Infect Dis. 2018, 2(68):94-101. doi: 10.1016/j.ijid.2018.01.022.
148. Enders G. Paramyxoviruses. In: Baron S, editor. Medical Microbiology. 4th edition. Galveston (TX): University of Texas Medical Branch at Galveston; 1996. Chapter 59. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK8461/>. Acesso em: 20 de maio de 2015.
149. Santos NSO, Wigg MD. Viroses Multissistêmicas – Vírus do Sarampo e Vírus da caxumba. In: Santos NSO, Romanos MTV, Wigg MD. Virologia Humana, 2015, 3ed., p.350-374.

150. Rubin S, Eckhaus M, Rennick LJ, Bamford CG, Duprex WP. Molecular biology, pathogenesis and pathology of mumps virus. *The Journal of pathology*, 2015, 235(2):242-252. doi:10.1002/path.4445.
151. Gnann J, W Jr. Caxumba. In: Goldman L, Ausiello D. *Tratado de Medicina Interna*. 22ª Edição. Rio de Janeiro: Editora Elsevier. 2005, p.2322-2324.
152. Moran A, Shandera, Wayne X. Doenças infecciosas: infecções virais e riquetsioses. In: Tierney LMJr, Mcphee SJ, Papadakis MA. *Current Medicina diagnóstico e tratamento*. 45ª Edição. Rio de Janeiro: Editora McGraw-Hill Interamericana do Brasil, 2006, p.1257-1304.
153. Rantalaiho T, Färkkiläb M, Vaheria A, Koskiniemi M. Acute encephalitis from 1967 to 1991. *J. Neurol. Sci.*, 2001, 184(2):169–177.
154. Nagai T, Okafuji T, Miyazaki C, et al. A comparative study of the incidence of aseptic meningitis in symptomatic natural mumps patients and monovalent mumps vaccine recipients in Japan. *Vaccine*, 2007, 25(14):2742-2747.
155. Cruz-Jr LCH, Gasparetto EL, Domingues RC. Imagem na neuroinfecção. In: Puccioni-Sohler, M. *Diagnóstico de Neuroinfecção com abordagem dos exames do líquido cefalorraquidiano e neuroimagem*. Editora Rubio, 2008, p. 129-154.
156. Greenlee J. E. Encephalitis and postinfectious encephalitis. *Continuum Lifelong Learning Neurology*, 2012, 18(6):1271–1289.
157. Gasecki AP, Steg RE. Correlation of early MRI with CT scan, EEG, and CSF: analyses in a case of biopsy-proven herpes simplex encephalitis. *Eur. Neurol.*, 1991, 31(6):372-5.
158. Soares CN, Puccioni-Sohler, M. Infecções Virais do Sistema Nervoso Central - Encefalites Virais. In: Puccioni-Sohler, M. *Diagnóstico de Neuroinfecção com abordagem dos exames do líquido cefalorraquidiano e neuroimagem*. Editora Rubio, 2008, p.102-113.
159. Almeida SM, Nogueira MB, Raboni SM, Vidal LR. Laboratorial diagnosis of lymphocytic meningitis. *Braz Infect Dis.*, 2007, 11(5):489-495.
160. Cinque P, Cleator GM, Weber T, Monteyne P, et al. The role of laboratory investigation in the diagnosis and management of patients with suspected

herpes simplex encephalitis: a consensus report. The EU Concerted Action on Virus Meningitis and Encephalitis. *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry*, 1996, 61(4):339-345.

161. Decaro N, Elia G, Martella V, Desario C, Campolo M, Trani LD, Tarsitano E, Tempesta M, Buonavoglia C. A real-time PCR assay for rapid detection and quantitation of canine parvovirus type 2 in the feces of dogs. *Veterinary Microbiology*, 2005, 105(1):19–28.
162. Frisk AL, König M, Moritz A, Baumgärtner W. Detection of Canine Distemper Virus Nucleoprotein RNA by Reverse Transcription-PCR Using Serum, Whole Blood, and Cerebrospinal Fluid from Dogs with Distemper. *Journal of Clinical Microbiology*, 1999, 37(11):3634–3643.
163. Arthur RR, Dagostin S, Shah KV. Detection of BK virus and JC virus in urine and brain tissue by the polymerase chain reaction. *Journal of Clinical Microbiology*, 1989, 27(6):1174-1179.
164. Johnson N, Wakeley PR, Mansfield KL, Mccracken F, Haxton B, Phipps LP, Fooks AR. Assessment of a novel real-time pan-flavivirus RT-polymerase chain reaction. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 2010, 10(7):665-71. doi: 10.1089/vbz.2009.0210.
165. Ryncarz AJ, Goddard J, Wald A, Huang ML, Roizman B, Corey L. Development of a high-throughput quantitative assay for detecting herpes simplex virus DNA in clinical samples. *J. Clin. Microbiol.*, 1999, 37(6):1941-7.
166. Luiz CR, Machado CM, Canto CL, Christ SC, Pestana JO, Kotton CN, Camargo LF. Monitoring for HHV-6 infection after renal transplantation: evaluation of risk factors for sustained viral replication. *Transplantation*, 2013, 95(6):842-6. doi:10.1097/TP.0b013e3182807ab7.
167. Verstrepen WA, Kuhn S, Kockx MM, Van de Vyvere ME, Mertens H. Rapid Detection of Enterovirus RNA in Cerebrospinal Fluid Specimens with a Novel Single-Tube Real-Time Reverse Transcription-PCR Assay. *J. Clin. Microbiol.*, 2001, 39(11):4093-4096.
168. WHO. World Health Organization - information for molecular diagnosis of influenza virus in humans - update. 2011. Disponível em: http://www.who.int/influenza/gisrs_laboratory/molecular_diagnosis/en/. Acesso em 10 fevereiro de 2015.

169. Espy MJ, Teo R, Ross TK, Svien KA, Wold AD, Uhl JR, Smith TF. Diagnosis of varicellazoster virus infections in the clinical laboratory by LightCycler PCR. *J. Clin. Microbiol.*, 2000, 38(9):3187-3189.
170. Jin L, Beard S, Brown DWG. Genetic Heterogeneity of Mumps Virus in the United Kingdom: Identification of Two New Genotypes. *The Journal of Infectious Diseases*, 1999, 180(3):829–833.
171. Staroscik, A. dsDNA copy number calculator. URI Genomics and Sequencing Center, 2004. Disponível em <http://cels.uri.edu/gsc/cndna.html>. Acesso em 04 de julho de 2016.
172. Johnson G, Nelson S, Petric M, Tellier R. Comprehensive PCR-Based Assay for Detection and Species Identification of Human Herpesviruses. *Journal of Clinical Microbiology*, 2000, 38(9):3274-3279.
173. Stang A, Korn K, Wildner O, Überla K. Characterization of Virus Isolates by Particle-Associated Nucleic Acid PCR. *J. Clin. Microbiol.*, 2005, 43(2):716-720.
174. Applied Biosystems. Real-time PCR: understanding Ct. 2016. Disponível em: https://www.thermofisher.com/content/dam/LifeTech/Documents/PDFs/P_G1503-PJ9169-CO019879-Re-brand-Real-Time-PCR-Understanding-Ct-Value-Americas-FHR.pdf. Acesso em 30 de janeiro de 2017.
175. Hashemian S, Ashrafzadeh F, Akhondian J, Beiraghi Toosi, M. Epstein-Barr Virus Encephalitis: A Case Report. *Iranian Journal of Child Neurology*, 2015, 9(1):107-110.
176. Khanal D, Singh T, Rabinstein A. Epstein Barr Virus Encephalitis in Adults: A Case Series. *Neurology*, 2016, 86(16):293.
177. Telenti A, Uehlinger DE, Marchesi F, Germann D, Malinverni R, Matter L. Epstein-Barr virus infection in HIV-positive patients. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 1993, 12(8):601–609.
178. Scheck DN, Hook EW. Neurosyphilis. *Infect. Dis. Clin. North Am.*, 1994, 8(4):769-795.

179. Thompson HI. Not Your “Typical Patient”: Cryptococcal Meningitis in an Immunocompetent Patient. *The Journal of neuroscience nursing: journal of the American Association of Neuroscience Nurses*, 2005, 37(3):144-148.
180. Rajasingham R, Rhein J, Klammer K, Musubire A, Nabeta H, Akampurira A, et al. Epidemiology of meningitis in an HIV-infected Ugandan cohort. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 2015, 92(2):274–279.
181. Luft, B. J., Remington, J.S. AIDS commentary: toxoplasmic encephalitis. *Journal of Infectious Diseases*, 1988, 157(1):1-6.
182. Grant IH, Gold JW, Rosenblum M, Niedzwiecki D, Armstrong D. *Toxoplasma gondii* serology in HIV infected patients: the development of central nervous system toxoplasmosis in AIDS. *AIDS*, 1990, 4(6):519-521.
183. Pappas, P. G., Perfect, J. R., Cloud, G. A., Larsen, R. A., Pankey, G. A., Lancaster, D.J, et al. Cryptococcosis in human immunodeficiency virus-negative patients in the era of effective azole therapy. *Clin. Infect. Dis.*, 2001, 33(5):690–699.
184. Pyrgos V, Seitz AE, Steiner CA, Prevots DR, Williamson PR. Epidemiology of cryptococcal meningitis in the US: 1997–2009. *PLoS ONE*, 2013, 8(3):e56269.
185. Zhu LP, Wu JQ, Xu B, Ou XT, Zhang QQ, Weng XH. Cryptococcal meningitis in non-HIV infected patients in a Chinese tertiary care hospital, 1997–2007. *Med. Mycol.*, 2010, 48(4):570–579.
186. Bello YB, Machado HG, Silveira JF, Schettini F, Martins-Junior G, Dortas-Junior S, et al. Cryptococcal meningitis in immunocompetent patient-case report. *American Medical Journal*, 2013, 4(1):100-104.
187. Li J, Wang P, Ye L, Wang Y, Zhang X, Yu S. Cryptococcal meningitis initially presenting with eye symptoms in an immunocompetent patient: A case report. *Exp Ther Med*. 2016, 12(2):1119-1124.
188. Brooke JS. *Stenotrophomonas maltophilia*: An Emerging Global Opportunistic Pathogen. *Clinical Microbiology Reviews*, 2012, 25(1):2-41.

189. Denton M, Kerr KG. Microbiological and Clinical Aspects of Infection Associated with *Stenotrophomonas maltophilia*. Clinical Microbiology Reviews. 1998, 11(1):57-80.
190. Nseir S, Di Pompeo C, Brisson H, Dewavrin F, Tissier S, Diarra M, et al. Intensive care unit-acquired *Stenotrophomonas maltophilia*: incidence, risk factors, and outcome. Crit. Care, 2006, 10(5):143.
191. Thomas J, Prabhu VN, Varaprasad IR, Agrawal S, Narsimulu G. *Stenotrophomonas maltophilia*: A very rare cause of tropical pyomyositis. Int. J. Rheum. Dis., 2010, 13(1):89-90.
192. Caylan R, Aydin K, Köksal I. Meningitis Caused by *Stenotrophomonas Maltophilia*: Case Report and Review of the Literature. Article in Annals of Saudi medicine, 2002, 22(3-4):216-218.
193. Falagas M, Valkimadi P-E, Huang Y-T, Matthaiou DK, Hsueh PR. Therapeutic options for *Stenotrophomonas maltophilia* infections beyond co-trimoxazole: a systematic review. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2008, 62(5):889–894.
194. Al-Ghamdi KB, Rammal AA, Sindi RS. Otitis externa due to *Stenotrophomonas maltophilia* in an immunocompetent patient: Case report. Journal of Infectious Diseases and Immunity, 2012, 4(2):20-22.
195. Dang-Tan T, Mahmud SM, Puntoni R, Franco EL. Polio vaccines, Simian Virus 40, and human cancer: the epidemiologic evidence for a causal association. Oncogene, 2004, 23(38):6535-6540.
196. Vilchez R A, Butel JS. Emergent human pathogen simian virus 40 and its role in cancer. Clin. Microbiol. Rev., 17(3):495-508, 2004.
197. Damiani D, Laudanna N, Barril C, Sanches R, Borelli, NS, Damiani D. Encefalopatias: etiologia, fisiopatologia e manuseio clínico de algumas das principais formas de apresentação da doença. Rev. Bras. Clin. Med., 2013, 1(11):67-74.
198. Bimbato EM, Carvalho AG, Reis F. Encefalopatias tóxicas e metabólicas: ensaio iconográfico. Radiol Bras., 2015, 48(2):121–125.

199. Amaro-Júnior, E., Yamashita, H. Aspectos básicos de tomografia computadorizada e ressonância magnética. *Revista Brasileira de Psiquiatria*, 2001, 23(1):2-3.
200. Glaser CA, Gilliam S, Schnurr D, Forghani B, et al. In search of encephalitis etiologies: diagnostic challenges in the California Encephalitis Project, 1998-2000. *Clin. Infect. Dis.* 2003; 36(6):731-42.
201. Casas I, Tenorio A, Echevarria JM, Klapper PE, et al. Detection of enteroviral RNA and specific DNA of herpesviruses by multiplex genome amplification. *J. Virol. Methods.*, 1997, 66:39-50.
202. Whitley RJ, Gnann J. Viral encephalitis: familiar infections and emerging pathogens. *The Lancet*, 2002; 359(9305):507-513.