



**FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ  
INSTITUTO GONÇALO MONIZ**

**Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde e  
Medicina Investigativa**

**TESE DE DOUTORADO**

**IDENTIFICAÇÃO DOS ARBOVÍRUS CAUSANDO MENINGITE VIRAL  
EM UM HOSPITAL DE REFERÊNCIA DE SALVADOR**

**TAMIRIS TATIANE DIAS**

**Salvador – Bahia**

**2018**

**FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ  
INSTITUTO GONÇALO MONIZ**

**Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina  
Investigativa**

**IDENTIFICAÇÃO DOS ARBOVÍRUS CAUSANDO MENINGITE VIRAL EM UM  
HOSPITAL DE REFERÊNCIA DE SALVADOR**

**TAMIRIS TATIANE DIAS**

Orientador: Dr. Luciano Kalabric Silva

Coorientador: Dr. Mitermayer Galvão dos Reis

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa para a obtenção do grau de Doutor.

**Salvador - Bahia**

**2018**

Ficha Catalográfica elaborada pela Biblioteca do  
Instituto Gonçalo Moniz / FIOCRUZ - Salvador - Bahia.

D541i Dias, Tamiris Tatiane  
Identificação dos arbovírus causando meningite viral em um hospital de  
referência de Salvador. / Tamiris Tatiane Dias. - 2018.  
143 f. : il. ; 30 cm.

Orientador: Prof. Dr. Luciano Kalabric Silva, Laboratório de Patologia  
e Biologia Molecular.

Dissertação (Mestrado de Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa)  
Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Gonçalo Moniz, 2018.

1. Meningite viral. 2. Vírus. 3. Diagnóstico molecular. 4. Vigilância  
epidemiológica. I. Título.

CDU 616.981.21

" IDENTIFICAÇÃO DOS ARBOVÍRUS CAUSANDO MENINGITE VIRAL EM UM HOSPITAL DE REFERÊNCIA DE SALVADOR."

**TAMIRIS TATIANE DIAS**

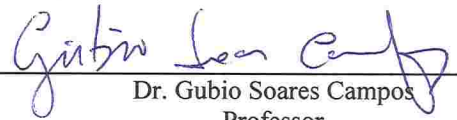
FOLHA DE APROVAÇÃO

COMISSÃO EXAMINADORA



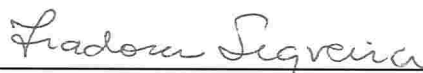
---

Dra. Maria Fernanda Rios Grassi  
Pesquisadora Titular  
IGM/FIOCRUZ



---

Dr. Gubio Soares Campos  
Professor  
UFBA



---

Dra. Isadora Cristina de Siqueira  
Pesquisadora  
IGM/FIOCRUZ

## **DEDICATÓRIA**

Aos meus pais, hoje e sempre!

## **AGRADECIMENTOS**

Em primeiro lugar, agradeço a Deus por tudo! Sem Ele, nada somos!

Depois, agradeço aos meus pais pelo apoio incondicional, desde sempre! Não existem palavras suficientes para descrever tudo o que já fizeram, e continuam fazendo por mim!

Agradeço aos meus orientadores por todos os conselhos, pelo apoio, pela paciência, pelos puxões de orelha. Pelos anos de convivência e pelos aprendizados.

Agradeço aos meus colegas que fizeram parte da equipe da pesquisa! Sem eles, este trabalho não seria o mesmo.

Agradeço às agências de fomento pelo financiamento do projeto e pela bolsa de doutorado.

Agradeço à Fiocruz por ter me possibilitado o desenvolvimento desse projeto, bem como o meu desenvolvimento pessoal e profissional.

Agradeço à Biblioteca da Fiocruz pela revisão da formatação do trabalho.

Agradeço ao Hospital Couto Maia e a toda a sua equipe pela colaboração no projeto.

Agradeço a minha chefe pelo apoio e pela compreensão.

Agradeço àqueles amigos especiais, quase irmãos, que, mesmo não entendendo muito sobre o que eu fazia, sempre me apoiaram.

Agradeço a todos, que, de uma maneira ou de outra, colaboraram para que a ideia de um projeto virasse esta tese.

“A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu, mas pensar o que ninguém ainda pensou sobre aquilo que todo mundo vê.”

*Arthur Schopenhauer*  
(filósofo alemão, 1788-1860)

DIAS, Tamiris Tatiane. Identificação dos arbovírus causando meningite viral em um hospital de referência de Salvador. 143 f. il. Tese (Doutorado em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa) – Fundação Oswaldo Cruz. Instituto Gonçalo Moniz, Salvador, 2018.

## RESUMO

**INTRODUÇÃO:** Classicamente, o vírus mais frequentemente detectado nos casos de meningite é o Enterovirus (EV). Recentemente, diferentes arbovírus surgiram e se tornaram endêmicos no Brasil, causando principalmente doenças febris agudas, no entanto, manifestações neurológicas também foram relatadas. **OBJETIVO:** Este estudo teve como objetivo investigar quais os vírus envolvidos na etiologia da meningite e a contribuição dos arbovírus circulantes em Salvador, Bahia, Brasil. **MÉTODOS:** De junho de 2014 a fevereiro de 2016, 170 pacientes com suspeita de meningite viral foram identificados por meio de vigilância diurna ativa no Hospital Couto Maia (HCM), Salvador-BA, Brasil. Dados demográficos e médicos foram coletados por meio de entrevista e revisão de prontuários. Amostras de líquido cefalorraquidiano (LCR) foram investigadas para possível etiologia viral por detecção direta de ácido nucléico viral: reação em cadeia da polimerase via transcriptase reversa (RT-PCR) para diferentes arbovírus: vírus da dengue (DENV), zika vírus (ZIKV) e vírus da chikungunya (CHIKV) e para o EV; e PCR para herpes simples I / II (HSV I/II), vírus varicela zoster (VZV), vírus Epstein-Barr (EBV) e citomegalovírus (CMV). Além disso, o ELISA foi realizado para detecção de antígeno DENV IgM e NS1, ZIKV IgM e CHIKV IgM. **RESULTADOS:** Os dados demográficos incluem distribuição semelhante entre os gêneros, maioria afrodescendente, com idade variando de 0 a 73 anos e residente na Grande Salvador. Trinta e quatro pacientes foram positivos para PCR ou ELISA para pelo menos um dos vírus estudados (prevalência global de 20,0%), dos quais arbovírus foram responsáveis por 76,5%. O DENV foi o agente mais frequentemente detectado (13 casos; 7,6%). Destes, 8 (4,7%) eram DENV1, 2 (1,2%) DENV3 e 3 (1,8%) DENV4. Também detectamos 6 (3,5%) casos de CHIKV. Apenas 98 amostras estavam disponíveis para o ELISA de ZIKV e 7 (7,1%) foram positivas. Quatro casos (2,4%) de coinfeção viral foram detectados: DENV1 + CHIKV, DENV1 + EV, DENV4 + ZIKV e CHIKV + ZIKV. Entre as meningites não arbovirais, a etiologia mais comum foi o EV (11 casos; 6,5%). Apenas 107 amostras estavam disponíveis para testar os HHV e um (0,9%) foi PCR positivo para o VZV. Não foram detectados casos de DENV2, HSV I/II, EBV e CMV. Todas as amostras testadas por ELISA para DENV IgM, antígeno NS1 e para CHIKV IgM foram negativas. A prevalência geral de meningite viral não foi associada a nenhum histórico médico, características clínicas ou hospitalares, exceto a rigidez do pescoço e uma amostra de líquido



cefalorraquidiano apresentando aspecto ligeiramente turvo ou turvo. Os arbovírus, como um grupo, estavam associados apenas à rigidez do pescoço. Ter uma amostra de LCR apresentando um aspecto ligeiramente turvo ou turvo e mais de 5 células/mm<sup>3</sup> foram variáveis estatisticamente significativas nos casos do ZIKV. Ter ≤15 anos de idade, uma amostra de LCR apresentando um aspecto ligeiramente turvo ou turvo e mais de 100 células/mm<sup>3</sup> foram variáveis estatisticamente significativas nos casos EV. Não houve associação entre as características estudadas e o DENV, CHIKV ou VZV. **CONCLUSÕES:** Os arbovírus foram responsáveis pela maioria dos vírus identificados entre os pacientes com suspeita de meningite viral. Em áreas onde eles são endêmicos, é crucial aumentar a vigilância viral e considerá-los no diagnóstico diferencial de meningite.

**Palavras-chave:** Meningite viral, Arbovírus, Diagnóstico Molecular, Vigilância Epidemiológica

DIAS, Tamiris Tatiane. Identificação dos arbovírus causando meningite viral em um hospital de referência de Salvador. 143 f. il. Tese (Doutorado em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa) – Fundação Oswaldo Cruz. Instituto Gonçalo Moniz, Salvador, 2018.

## ABSTRACT

**BACKGROUND:** Classically, the most frequently detected virus in meningitis cases is Enterovirus (EV). Recently, different arboviruses emerged and became endemic in Brazil mostly causing acute febrile illnesses, however neurological manifestations have also been reported. **AIM:** This study aimed to investigate which viruses were involved in the meningitis etiology and the contribution of the circulating arboviruses in Salvador, Bahia, Brazil. **METHODS:** From June, 2014, to February, 2016, 170 patients with suspected viral meningitis were identified by active day-time surveillance in Couto Maia Hospital (HCM), Salvador-BA, Brazil. Demographical and medical data were collected through interview and medical chart review. Their cerebral spinal fluid (CSF) samples were investigated for possible viral etiology by direct detection of viral nucleic acid: reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) for different arboviruses: dengue virus (DENV), zika virus (ZIKV) and chikungunya virus (CHIKV), and for the EV; and PCR for herpes simplex I/II (HSV I/II), varicella zoster virus (VZV), Epstein-Barr virus (EBV) and cytomegalovirus (CMV). Also, ELISA was carried out for detection of DENV IgM and NS1 antigen, ZIKV IgM and CHIKV IgM. **RESULTS:** Demographics include similar gender distribution, mostly African descent, age ranging from 0 to 73 and resident in Greater Salvador. Thirty-four patients were PCR or ELISA positive for at least one of the studied virus (overall prevalence 20.0%), from which arboviruses accounted for 76.5%. DENV was the agent most frequently detected (13 cases; 7.6%). Of them, 8 (4.7%) were DENV1, 2 (1.2%) DENV3, and 3 (1.8%) DENV4; we also detected 6 (3.5%) cases of CHIKV. Only 98 samples were available for ZIKV testing and 7 (7.1%) were ELISA positive. Four cases (2.4%) of viral co-infection were detected: DENV1 + CHIKV, DENV1 + EV, DENV4 + ZIKV, and CHIKV + ZIKV. Among the non-arboviral meningitis, the most common etiology was the EV (11 cases; 6.5%). Only 107 samples were available for HHV testing and one (0.9%) was PCR positive for VZV. No cases of DENV2, HSV I/II, EBV and CMV were detected. All samples tested by ELISA for DENV IgM and NS1 antigen and for CHIKV IgM were negative. Overall prevalence of viral meningitis was not associated with any medical background, clinical or hospital course characteristics, except neck rigidity and a CSF sample presenting slightly turbid or turbid aspect. Arboviruses, as a group, were associated with neck rigidity only. A CSF sample presenting slightly turbid or turbid aspect and more than 5 cells/mm<sup>3</sup> were statistically significant variables within the ZIKV cases. Being ≤15 years of age, a CSF sample presenting slightly turbid or turbid aspect

and more than 100 cells/mm<sup>3</sup> were statistically significant variables within the EV cases. There was no association between the studied characteristics and DENV, CHIKV or VZV.

**CONCLUSIONS:** Arboviruses accounted for the majority of identified viruses among patient with suspected viral meningitis. In areas where they are endemic it is crucial to increase viral surveillance and consider them in the differential diagnosis of meningitis.

**Keywords:** Viral meningitis, Arboviruses, Molecular Diagnosis, Epidemiological surveillance

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Esquema mostrando as três meninges que recobrem o sistema nervoso central: cérebro e medula espinhal.....21
- Figura 2. A punção lombar é, geralmente, feita com o paciente deitado, e a coleta é feita, preferencialmente, entre as vértebras lombares L3 e L4. ...25
- Figura 3. Esquema do genoma dos Enterovirus (adaptado de (LIN et al., 2009).....30
- Figura 4. Esquema do genoma do DENV (GUZMAN *et al.*, 2010).....38
- Figura 5. Esquema do genoma do CHIKV (GALÁN-HUERTA *et al.*, 2015). .....41
- Figura 6. Esquema do genoma do ZIKV (GALÁN-HUERTA *et al.*, 2016). .....43
- Figura 7. Capacidade de detecção do PCR para os DENVs. Foi utilizado um marcador de peso molecular de 100 pb. As setas indicam os tamanhos esperados da banda para os DENVs (482 pb para o DENV1 e 392 bp para o DENV4). .....50
- Figura 8. Limite de detecção do PCR para os EVs. Foi utilizado um marcador de peso molecular de 50 pb. A seta indica o tamanho esperado da banda para o 1º PCR dos EVs (197 pb).....51
- Figura 9. Limite de detecção do PCR para os HHVs. Foi utilizado um marcador de peso molecular de 50 pb. A seta indica o tamanho esperado da banda para os VZV (275 pb). .....52
- Figura 10. Capacidade de detecção do PCR para os HHVs. Foi utilizado um marcador de peso molecular de 50 pb. As setas indicam os tamanhos esperados da banda para os HHVs (147 pb para o HSV1, 275 pb para o VZV, 182 pb para o EBV, e 256 pb para o CMV). .....52

Figura 11. Limite de detecção do PCR para o CHIKV. Foi utilizado um marcador de peso molecular de 50 pb. A seta indica o tamanho esperado da banda para o CHIKV (305 pb). .....53

Figura 12. Limite de detecção do PCR para o ZIKV. Foi utilizado um marcador de peso molecular de 50 pb. A seta indica o tamanho esperado da banda para o ZIKV (192 pb). .....53

## FIGURAS DO ARTIGO

Figure 1. Number of suspected viral meningitis cases included in the study among patients who attended Couto Maia Hospital, between July 2014 and February 2016, Salvador (BA), Brazil. ....	85
--	----

## LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Epidemiologia e transmissão da meningite viral.....	23
Quadro 2. Características do LCR normal, com infecção bacteriana e viral. ....	26

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Análise in silico da sensibilidade presumida dos primers para os DENVs.....	48
Tabela 2. Análise in silico da sensibilidade presumida dos primers para o vírus Chikungunya.....	49
Tabela 3. Análise in silico da sensibilidade presumida dos primers para o vírus Zika.....	49
Tabela 4. Análise in silico da sensibilidade presumida dos primers para os Enterovirus. ....	49
Tabela 5. Análise in silico da sensibilidade presumida dos primers para os HHVs...50	



## TABELAS DO ARTIGO

Table 1. Demographic baseline data from patients with suspected viral meningitis attended Couto Maia Hospital, between July 2014 and February 2016, Salvador (BA), Brazil. ....	77
Table 2. Viral diagnosis from patients with suspected viral meningitis who attended Couto Maia Hospital, between July 2014 and February 2016, Salvador (BA), Brazil. ....	79
Table 3. Clinical data stratified by PCR positivity from patients with suspected viral meningitis who attended Couto Maia Hospital, between July 2014 and February 2016, Salvador (BA), Brazil. ....	81
Table 4. Statistically significant prevalence ratios (PR) stratified by etiological agent from patients with suspected viral meningitis who attended Couto Maia Hospital, between July 2014 and February 2016, Salvador (BA), Brazil. ....	83

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A	Linhagem Asiática do CHIKV (do inglês <i>Asan</i> )
AMAN	Neuropatia axonal motora motora (do inglês <i>acute motor axonal neuropathy</i> )
BA	Bahia
CAAE	Certificado de Apresentação para Apreciação Ética
CDC	Centros de Controle e Prevenção de Doenças (do inglês <i>Centers for Disease Control and Prevention</i> )
cDNA	DNA complementar
CHIKV	Vírus Chikungunya
CMV	Citomegalovírus
CNS	<i>Central nervous system</i> (sistema nervoso central)
CPqGM	Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz
CSF	<i>Cerebrospinal fluid</i> (líquido cefalorraquidiano)
CV	Coxsackievírus
CVA	Coxsackievírus do grupo A
CVB	Coxsackievírus do grupo B
DENV	Vírus da dengue
DICT <sub>50</sub>	Dose infectante em cultura de tecido capaz de infectar 50% as células
DNA	Ácido desoxirribonucleico (do inglês <i>deoxyribonucleic acid</i> )
dNTPs	Desoxinucleotídeos trifosfatados (do inglês <i>deoxynucleotide triphosphates</i> )
EBV	Vírus Epstein-Barr
ECP	Efeito citopático
ECSA	Linhagem do Leste-Centro-Sul Africano do CHIKV (do inglês <i>East/Center/South African</i> )
ECV	Echovirus
ELISA	Ensaio imunoabsorção enzimática (do inglês <i>enzyme-linked immunosorbent assay</i> )
EV	Enterovírus
FDA	Administração de Alimentos e Medicamentos (do inglês <i>Food and Drug Administration</i> )

FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
HCM	Hospital Couto Maia
HHV	Vírus do herpes humano (do inglês <i>Human herpes virus</i> )
HSV	Vírus do herpes simples (do inglês <i>Herpes simplex virus</i> )
ICTV	Comitê Internacional de Taxonomia Viral (do inglês <i>International Committee on Taxonomy of Viruses</i> )
IFI	Imunofluorescência indireta
IO	Linhagem do Oceano Índico do CHIKV (do inglês <i>Indian Ocean</i> )
JEV	Vírus da encefalite japonesa (do inglês <i>Japanese encephalitis virus</i> )
LCR	Líquido cefalorraquidiano
LPBM	Laboratório de Patologia e Biologia Molecular
Mg <sup>++</sup>	Magnésio (íons de magnésio)
NAAT	<i>Nucleic acid amplification test</i> (teste de amplificação de ácidos nucleicos)
nsP	Proteína não estrutural (do inglês, <i>non structural protein</i> )
ORF	Fase de leitura aberta (do inglês <i>open reading frame</i> )
PCR	Reação em cadeia da polimerase (do inglês <i>reação em cadeia da polimerase</i> )
PL	Punção lombar
PR	<i>Prevalence ratio</i> (razão de prevalência)
PRNT	Teste de neutralização por redução de placas (do inglês <i>plaque reduction neutralization test</i> )
PV	<i>Poliovirus</i>
RNA	Ácido ribonucleico (do inglês <i>ribonucleic acid</i> )
RP	Razão de prevalência
RT	Transcrição reversa (do inglês <i>reverse transcription</i> )
rtPCR	PCR em tempo real (do inglês, <i>real time PCR</i> )
SGB	Síndrome de Guillain-Barré
SLV	Vírus da Encefalite de Saint-Louis (do inglês <i>Saint-Louis encephalitis virus</i> )
SNC	Sistema nervoso central
Ta	Temperatura de anelamento
TCLE	Termo de consentimento livre e esclarecido
TN	Teste de neutralização

UTR	Região não traduzida (do inglês <i>untranslated region</i> )
VZV	Vírus da varicela zoster
WA	Linhagem do Oeste Africano do CHIKV (do inglês <i>West African</i> )
WNV	Vírus do Oeste do Nilo (do inglês, <i>West Nile virus</i> )
ZIKV	Zika vírus

## SUMÁRIO

1	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	20
2	<b>REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	21
2.1	<b>MENINGITE</b> .....	21
2.1.1	<b>Definição</b> .....	21
2.1.2	<b>Etiologia</b> .....	21
2.1.3	<b>Manifestações Clínicas</b> .....	23
2.1.4	<b>Diagnóstico</b> .....	24
2.1.5	<b>Epidemiologia Das Meningites Virais</b> .....	27
2.2	<b>AGENTES VIRAIS CLASSICAMENTE ASSOCIADOS ÀS MENINGITES</b> ....	29
2.2.1	<b>Enterovírus (EV)</b> .....	29
2.2.2	<b>Herpesviridae (HHV)</b> .....	34
2.3	<b>TRÍPLICE EPIDEMIA</b> .....	36
2.3.1	<b>Vírus da Dengue (DENV)</b> .....	37
2.3.2	<b>Vírus Chikungunya (CHIKV)</b> .....	40
2.3.3	<b>Vírus Zika (ZIKV)</b> .....	42
3	<b>OBJETIVOS</b> .....	45
3.1	<b>OBJETIVO GERAL</b> .....	45
3.2	<b>OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b> .....	45
4	<b>METODOLOGIA</b> .....	46
4.1	<b>PADRONIZAÇÃO DAS TÉCNICAS</b> .....	46
4.2	<b>DESENHO DO ESTUDO, MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	47
5	<b>RESULTADOS – Capítulo 1: Padronização das técnicas moleculares</b> .....	48
6	<b>RESULTADOS – Capítulo 2: Avaliação dos casos</b> .....	54
7	<b>DISCUSSÃO</b> .....	86
8	<b>CONCLUSÕES</b> .....	90
9	<b>RISCOS E DIFICULDADES</b> .....	91
10	<b>LIMITAÇÕES DO ESTUDO</b> .....	92
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	93
	APÊNDICE I – Termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) para o participante adulto .....	105
	APÊNDICE II – Termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) para o responsável do participante menor .....	108
	APÊNDICE III – Termo de assentimento para o participante menor .....	111
	APÊNDICE IV – Questionário clínico-epidemiológico .....	114
	APÊNDICE V – Regulamento para Biorrepositório .....	128
	ANEXO I – Carta de aceite do HCM .....	132
	ANEXO II – Termo de compromisso da FIOCRUZ-BA .....	134
	ANEXO III – Carta de aprovação do CEP-FIOCRUZ-BA .....	138
	ANEXO IV – Carta de aprovação do CEP-HCM .....	142

## 1 INTRODUÇÃO

Recentemente, diferentes arbovírus foram identificados e se tornaram endêmicos no Brasil. Apesar da sua relevância já conhecida em doenças febris agudas, apresentando sinais e sintomas inespecíficos, como febre, mal-estar, mialgia e artralgia, os arbovírus também estão associados a manifestações neurológicas nos últimos anos. Portanto, a inclusão de arbovírus no diagnóstico diferencial de infecções do sistema nervoso central (SNC) tem sido considerada cada vez mais importante ao longo dos anos, especialmente em regiões endêmicas.

O diagnóstico das meningites virais é feito com base na clínica e de maneira presuntiva. Ainda assim, como a equipe médica não tem garantias sobre o diagnóstico, opta pelo uso empírico de antibióticos. Dessa maneira, se o diagnóstico das meningites virais fosse feito na rotina, a situação seria proveitosa para o paciente, para o médico e para o sistema de saúde como um todo. O paciente não precisaria se submeter a uma terapia desnecessária que, inclusive, aumentaria o tempo de estadia no hospital; o médico teria certeza do diagnóstico e não ficaria na dúvida quanto a prescrever ou não os antibióticos; o sistema de saúde economizaria milhares de reais por cada paciente que tivesse um diagnóstico preciso e reduziria as chances do desenvolvimento de resistência antimicrobiana na população.

Infelizmente, essa não é uma prática comum, e a detecção e caracterização dos vírus envolvidos nos casos de meningite viral continuam sendo feitas apenas no âmbito da pesquisa. O fato é que os vírus estão presentes de maneira ubíqua no nosso meio e, apesar de comumente não causarem doença grave, isso é uma possibilidade. Assim como já existe todo um arsenal de métodos diagnósticos e terapêuticos para combater as bactérias, quanto antes for possível, ao menos, diagnosticar os vírus com precisão, melhor para todos.

A rápida identificação do agente etiológico nas meningites virais pela técnica de PCR contribui para a melhoria da saúde pública, pois gera impactos na escolha da conduta terapêutica da doença, reduz o uso da antibioticoterapia empírica e o tempo de internamento.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 MENINGITE

#### 2.1.1 Definição

O termo meningite refere-se à inflamação da aracnoide, da pia-máter (Figura 1) e do líquido cefalorraquidiano (LCR). O processo inflamatório se estende por todo o espaço subaracnóideo em torno do cérebro e da medula espinhal e habitualmente compromete os ventrículos (GOLDMAN e AUSIELLO, 2011).

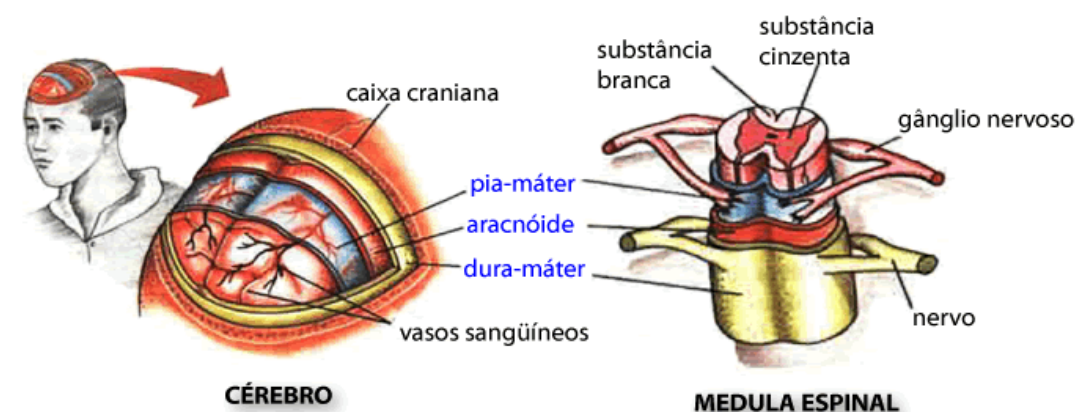


Figura 1. Esquema mostrando as três meninges que recobrem o sistema nervoso central: cérebro e medula espinhal.

Fonte: <http://cistosaracnoide.org/images/anatomia/cerebro/meninges2.png>

#### 2.1.2 Etiologia

Entre as etiologias podemos destacar bacterianas, confirmadas pelo crescimento bacteriano na cultura do líquido cefalorraquidiano (LCR), e as assépticas, que incluem uma gama de outros agentes, tais como vírus, fungos, fármacos, neoplasias malignas e doenças autoimunes.

Os microrganismos mais frequentemente responsáveis pela meningite bacteriana adquirida na comunidade são o *Streptococcus pneumoniae*, *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus agalactiae* (ou *Streptococcus* do grupo B) e *Listeria monocytogenes*. A *N. meningitidis* é o agente etiológico associado às epidemias recorrentes e aos surtos (LONGO *et al.*, 2013).

As meningites assépticas são definidas como uma síndrome aguda ou subaguda de inflamação das meninges, sem evidência de infecção bacteriana

piogênica em testes microbiológicos. As meningites virais são as principais representantes das meningites assépticas e podem ocorrer em qualquer idade, no entanto, é mais comum entre as crianças (LOGAN e MACMAHON, 2008; GOLDMAN e AUSIELLO, 2011).

Além da meningite viral, a meningite asséptica também pode apresentar outras causas infecciosas, ou ainda, não infecciosas. As causas infecciosas não virais são incomuns ou raras, em comparação com a meningite viral ou supurativa aguda, e incluem bactérias, como o *Treponema pallidum* e o *Mycobacterium tuberculosis*; fungos como o *Cryptococcus neoformans* e a *Candida* sp.; e protozoários como o *Toxoplasma gondii*. Entre as causas não infecciosas, podem ser citadas a hipersensibilidade a drogas; doenças sistêmicas como o lúpus eritematoso sistêmico e a sarcoidose; doenças neoplásicas como a meningite de carcinoma metastático e tumores do SNC; além de processos inflamatórios que comprometem estruturas do SNC, como a meningite química subsequente à mielografia e a vasculite cerebral granulomatosa (GOLDMAN e AUSIELLO, 2011).

Os vírus mais comumente associados com as meningites pertencem a três famílias: *Picornaviridae*, *Herpesviridae* e *Flaviviridae*. Entre os *Picornaviridae*, destaca-se o gênero *Enterovirus* (EV) e seus representantes: os *Echovirus* (ECV 3, 4e, 6, 9, 11, 75, 21 e 30), os *Poliovirus* (PV) e os *Coxsackievirus* (CV) dos grupos A e B 1,2 (Meningites virais, 2006). A família *Herpesviridae* inclui os vírus do herpes humano (HHV) tipos 1 a 6 e foi associada a condições de imunodeficiência. Entre os *Flaviviridae*, destaca-se o gênero *Flavivirus* e seus representantes: vírus da encefalite japonesa (JEV), vírus da Encefalite de Saint-Louis (SLV), vírus da dengue (DENV) e vírus Zika (ZIKV) (Quadro 1). (SOLOMON *et al.*, 2000; GOLDMAN e AUSIELLO, 2011; PUTZ *et al.*, 2013; ACEVEDO *et al.*, 2017; DE OLIVEIRA *et al.*, 2017; MARINHO *et al.*, 2017; PRADHAN *et al.*, 2017).

Os arbovírus (do inglês, *arthropod-borne viruses*) são vírus cuja transmissão se dá através de mosquitos, carrapatos ou outros artrópodes. No caso dos arbovírus aqui tratados, a transmissão se dá pela picada dos mosquitos infectados do gênero *Aedes* sp., *A. aegypti* e/ou *A. albopictus*,

Muitos *Flaviviridae* são arbovírus, (do inglês, *arthropod-borne viruses*), que são vírus cuja transmissão se dá através de mosquitos, carrapatos ou outros artrópodes. No caso dos arbovírus aqui tratados, a transmissão se dá pela picada dos mosquitos infectados do gênero *Aedes* sp., *A. aegypti* e/ou *A. albopictus*.



Quadro 1. Epidemiologia e transmissão da meningite viral.

	<b><i>Enterovirus</i></b>	<b><i>Herpesviridae</i></b>	<b><i>Flaviviridae</i></b>
<b>Subtipos</b>	Echovirus 30, 11, 9, 6, 7, 18, 16, 71, 25 Coxsackievirus B2, A9, B1, B3, B4	HSV-1, HSV-2, CMV, EBV, VZV	DENV 1-4, SLEV, JEV
<b>Incidência</b>	85-95%	0,5-3%	
<b>Transmissão</b>	Fecal-oral → estômago → viremia	Contato com a mucosa de pessoas infectadas	Inoculação cutânea (vetor) → replicação local → tecido linfático

HSV-1/2: vírus do herpes simplex tipos 1 e 2; CMV: citomegalovírus; EBV: vírus Epstein-Barr; VZV: vírus da varicela zoster; DENV: vírus da dengue; SLEV: vírus da encefalite de Saint Louis; JEV: vírus da encefalite japonesa. Traduzido e modificado de PUTZ *et al.* (2013)

Assim, outros arbovírus de outras famílias, como o Chikungunya (CHIKV), podem co-circular em áreas onde há transmissão do DENV e ZIKV, por exemplo. Manifestações neurológicas associadas a estes arbovírus têm sido relatadas cada vez mais frequentemente na literatura ao longo dos últimos anos (SOLOMON *et al.*, 2000; ACEVEDO *et al.*, 2017; DE OLIVEIRA *et al.*, 2017; MARINHO *et al.*, 2017; PRADHAN *et al.*, 2017). Portanto, a inclusão dos arbovírus no diagnóstico diferencial das infecções do SNC tem sido considerada cada vez mais importante ao longo dos anos, especialmente em regiões epidêmicas.

### 2.1.3 Manifestações clínicas

A infecção aguda das meninges se apresenta com a combinação característica de febre, dor de cabeça e meningismo. O meningismo consiste na tríade: dor de cabeça, fotofobia e rigidez de nuca. Frequentemente, estes sintomas são acompanhados por outros sinais de irritação meníngea, incluindo o sinal de Kernig (no qual a extensão do joelho com o quadril flexionado causa espasmo nos músculos isquiotibiais) e o sinal de Brudzinski (no qual a flexão passiva do pescoço causa a flexão dos quadris e joelhos). O meningismo não é específico da meningite e pode ocorrer em pacientes com hemorragia subaracnóidea (DAVIDSON *et al.*, 2014).

A maioria dos sinais e sintomas da meningite são indistinguíveis entre a meningite bacteriana e viral: cefaleia, fotofobia, febre e rigidez de nuca, podendo ser acompanhados por náuseas e vômitos. No entanto, a gravidade varia de acordo com

o agente etiológico, assim como a presença de outras características, tais como o *rash*. A cefaleia quase sempre está presente e, com frequência, caracteriza-se pela sua localização frontal ou retro-orbitária e por estar frequentemente associada à fotofobia e à dor nos movimentos oculares. Podem apresentar ainda mal estar, mialgia e anorexia. Letargia leve e sonolência também são frequentes. Ainda pode-se observar, de maneira rara, convulsão, rebaixamento do nível de consciência e ou sinais neurológicos focais, que indicam comprometimento encefálico. (DAMIANI *et al.*, 2012; LONGO *et al.*, 2013; DAVIDSON *et al.*, 2014).

Na maioria dos casos, a infecção viral é benigna e autolimitada, sendo necessárias apenas medidas de suporte clínico. Normalmente, a recuperação ocorre dentro de alguns dias (R. KUMAR, 2005; LOGAN e MACMAHON, 2008; DAMIANI *et al.*, 2012; DAVIDSON *et al.*, 2014).

#### **2.1.4 Diagnóstico**

A distinção clínica entre meningites virais e bacterianas é muito difícil, e o diagnóstico diferencial é feito a partir da análise do LCR, utilizando-se testes bioquímicos e microbiológicos.

O LCR tem como principais funções a proteção mecânica do SNC e a remoção de metabólitos através da sua drenagem em massa. Mais recentemente, têm-se sugerido o papel do LCR, bem como do tecido que o secreta – o plexo coroide –, no desenvolvimento, homeostase e reparação do SNC (REDZIC *et al.*, 2005). Ele circula no espaço subaracnoide, localizado entre as membranas pia-máter e aracnoide, e é coletado através de punção lombar (PL).

A PL é indicada quando há a necessidade de investigar ou excluir meningite e a sua etiologia; excluir hemorragia subaracnoide na presença de dor de cabeça severa e aguda; investigar desordens neurológicas [tais como a esclerose múltipla, a síndrome de Guillian Barré (SGB) e a polineuropatia desmielinizante]; ou ainda administrar medicamentos ou agentes diagnósticos (tais como anestesia espinal, quimioterapia e antibióticos intratecais, meio de contraste para a mielografia) (DOHERTY e FORBES, 2014).

Para a execução da PL, o paciente deve, preferencialmente, estar em decúbito lateral, com as vértebras alinhadas em um plano horizontal, a cabeça em uma posição neutra e os joelhos flexionados. Após a esterilização do local, administra-se um anestésico local, e a punção deve ser feita, preferencialmente,

entre as vertebrae L3 e L4. A agulha deve passar pela pele, tecido subcutânea, ligamento supraespinal, ligamento interespinal, *ligamentum flavum*, espaço epidural, as meninges dura-máter e aracnoide, e, finalmente alcançar o espaço subaracnoide. Ela deve ser inserida em um ângulo que permita a sua passagem pelos processos espinhais (DOHERTY e FORBES, 2014) (Figura 2).

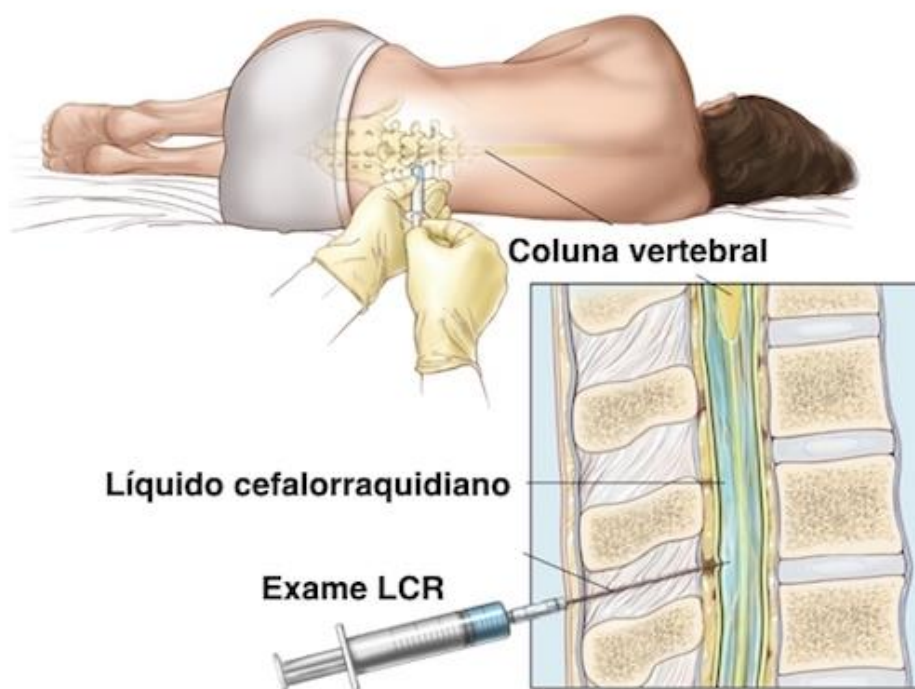


Figura 2. A punção lombar é, geralmente, feita com o paciente deitado, e a coleta é feita, preferencialmente, entre as vértebras lombares L3 e L4.

Fonte: <https://static.tuasaude.com/img/ex/am/exames-que-confirmam-a-meningite-1-640-427.jpg>

O LCR de pacientes normais é límpido, incolor, contém até 4 células/mm<sup>3</sup> e o nível de glicose equivale a dois terços do nível sanguíneo (Quadro 2). Em casos de meningite viral, o LCR é bastante similar ao de uma pessoa sadia, podendo, inclusive, estar “normal” (DAWOOD *et al.*, 2014). Nas infecções bacterianas, ele apresenta alterações mais proeminentes e sugestivas de envolvimento bacteriano (DAMIANI *et al.*, 2012).

A diferenciação bioquímica do LCR entre meningites virais e bacterianas é mostrada no Quadro 2. Alguns critérios clínicos e marcadores bioquímicos, tais como lactato, procalcitonina e interleucinas, têm sido pesquisados na tentativa de diferenciar a meningite viral da bacteriana, no entanto, os resultados não foram satisfatórios e esse tópico permanece em discussão (R. KUMAR, 2005; DUBOS *et*

*al.*, 2007; LOGAN e MACMAHON, 2008; VIALON *et al.*, 2011; DAMIANI *et al.*, 2012; BELOGUROV *et al.*, 2016; GARCIA-HERNANDEZ *et al.*, 2016; HENRY *et al.*, 2016; NAZIR *et al.*, 2018).

Quadro 2. Características do LCR normal, com infecção bacteriana e viral.

<b>Critérios</b>	<b>Normal</b>	<b>Meningite Viral</b>	<b>Meningite Bacteriana</b>
Aspecto	Límpido	Opalescente	Purulento
Cor	Incolor	Levemente xantocrômico	Turvo
Citologia	Até 4 células/mm <sup>3</sup>	Pleocitose moderada	Pleocitose evidente
Citomorfolgia	Linfócitos: 50-70% Monócito: 30-50%	Linfomonocitário	Neutrofilia
Proteinorraquia	Até 40 mg/dL	Normal ou discretamente aumentado	Aumentado
Clororraquia	118-130 mEq/L	-	-
Glicorraquia	50-80 mg/dL (2/3 da sérica)	Normal	Diminuída
Pressão de abertura	DL: 5-20 cmH <sub>2</sub> O (3,5-15 mmHg) Sentado: até 45 cmH <sub>2</sub> O (33 mmHg)	Normal	Aumentada

LCR – líquido cefalorraquidiano; DL – decúbito lateral.

Fonte: (DAMIANI *et al.*, 2012).

O diagnóstico presuntivo das meningites bacterianas pode ser feito a partir do esfregaço corado pelo Gram, para o diagnóstico de meningite bacteriana é necessário um período entre 48 e 72 horas para a obtenção do resultado de cultura (DUBOS *et al.*, 2007). É importante verificar se o paciente não fez uso de antibióticos antes da punção lombar, o que pode levar a resultados microbiológicos falso-negativos (DAVIDSON *et al.*, 2014).

O diagnóstico das meningites virais não é uma prática rotineira nos laboratórios de análises clínicas, mesmo naqueles localizados dentro de hospitais devido a indisponibilidade do isolamento viral em culturas celulares e a métodos sorológicos, ainda que apresentem baixa acurácia. Recentemente, o uso de técnicas moleculares tem sido proposto como novo padrão-ouro para o diagnóstico molecular das meningites, particularmente, para o diagnóstico das infecções virais (RAMERS *et al.*, 2000; DAMIANI *et al.*, 2012).

## MÉTODOS MOLECULARES

Diversos métodos podem ser utilizados no diagnóstico molecular das infecções, sendo o principal a reação em cadeia da polimerase (PCR, do inglês, *polymerase chain reaction*). Este método consiste na multiplicação exponencial (amplificação) do DNA viral a fim de facilitar a sua detecção. A mistura de reagentes da PCR inclui a DNA polimerase, os quatro desoxinucleotídeos trifosfatados (dNTPs), um par de oligonucleotídeos iniciadores da reação (do inglês, *primers*), tampão e cofator da enzima, além do DNA alvo propriamente. Para vírus com o genoma RNA, uma etapa denominada transcrição reversa (RT, do inglês, *reverse transcription*) deve ser realizada antes da PCR. Nesta etapa um DNA complementar (cDNA) é sintetizado a partir do RNA viral e este é amplificado pela PCR. O diagnóstico pode ser confirmado pela detecção do material amplificado, “*amplicon*”, sob a forma de “bandas” após eletroforese em um gel de agarose ou poliacrilamida, corado com intercalante fluorescente e visualizado sob a luz ultravioleta. Para melhorar a sensibilidade e especificidade deste método, diferentes alternativas vêm sendo avaliadas, como por exemplo, o uso de diferentes polimerases, a realização da RT-PCR em uma única etapa (*one step RT-PCR*) e a PCR aninhada (do inglês, *nested PCR*). Esta última corresponde à amplificação do DNA alvo em duas reações sucessivas com pares de *primers* externos e internos, respectivamente.

Além dos métodos baseados na PCR convencional descrita acima, foram desenvolvidas outras PCRs capazes de detectar e quantificar os ácidos nucléicos, além de minimizar o risco de contaminação cruzada entre as amostras. O principal método com estas características é a PCR em tempo real (rtPCR, do inglês, *real time PCR*). Este método baseia-se na detecção e quantificação da fluorescência produzida pela incorporação de um intercalante ou pela hidrólise de um oligonucleotídeo marcados com fluoróforo (sonda) durante a amplificação. A detecção é realizada durante a rtPCR, diretamente no tubo, sem a necessidade de eletroforese.

Além disso, o método de sequenciamento de DNA e análise filogenética também podem ser utilizados para a tipagem viral.

### **2.1.5 Epidemiologia das meningites virais**

Desde a implantação das vacinas para os principais agentes bacterianos (*Haemophilus influenza*, *Neisseria meningitidis* e *Streptococcus pneumoniae*) houve uma redução significativa na incidência das meningites bacterianas e um aumento

relativo da importância das meningites assépticas nos últimos anos. Atualmente, cerca de 50% dos casos de meningite são assépticas, chamando à atenção para as causas virais, fúngicas, por fármacos, neoplasias malignas e doenças reumatológicas e de etiologia não especificadas (R. KUMAR, 2005; MACHADO *et al.*, 2007; DAMIANI *et al.*, 2012).

No Brasil, entre 2010 e 2015, foram notificados 109.482 casos de meningite em nível nacional, dos quais 47.975 casos (43,8%) foram declarados como sendo de etiologia viral (SINAN). Entretanto, para a maioria dos casos não há identificação do agente etiológico e o diagnóstico é presuntivo (Meningites virais, 2006). Além disso, a vigilância epidemiológica fica impossibilitada de identificar surtos e adotar medidas de prevenção adequadas (Meningites virais, 2006).

Segundo a literatura recente, a taxa de detecção do EV varia entre 3,4% e 18% (TAN *et al.*, 2010; DUPUIS *et al.*, 2011; OTHMAN *et al.*, 2016; SADEGHI *et al.*, 2017). Dentre os agentes detectados nos casos de meningite viral, este vírus é responsável por 32,6% a 70,1% dos casos (BASTOS *et al.*, 2014; AI *et al.*, 2017; DE OLIVEIRA *et al.*, 2017; HASBUN *et al.*, 2017; KAMINSKI *et al.*, 2017).

Embora eles só tenham testado 20% das amostras, e principalmente por cultura, BANNIETTIS *et al.* (2017) identificaram, em crianças, que as infecções virais do SNC são 7,5 vezes mais frequentes do que as bacterianas, e os EV foram os únicos vírus isolados.

Em um estudo realizado no Hospital Couto Maia, referência do estado da Bahia para doenças infecciosas, SILVA *et al.* (2002) obtiveram uma taxa de detecção de 44,6% (50/112), e o EV foi responsável por 84% dessa positividade. Eles não detectaram nenhum arbovírus. Para a detecção do EV, eles utilizaram tanto o PCR quanto a cultura de LCR e/ou fezes.

DE CROM *et al.* (2012) analisam casos de meningite causados pelo EV com ausência de pleocitose no LCR. Em alguns casos, o genoma viral não foi detectado no LCR, mas sim nas fezes e/ou *swab* de garganta. Os autores concluíram que, especialmente em crianças jovens, a ausência de pleocitose não justifica a exclusão do diagnóstico de meningite pelo EV.

Em geral, a taxa de isolamento e detecção de EVs em amostras esporádicas é menor que aquelas observadas em surtos, indicando que estes vírus tendem a disseminar-se rapidamente na comunidade. Em trabalhos que fizeram a caracterização molecular de agentes virais envolvidos em surtos de meningite pelo

mundo, há experiências em que o diagnóstico foi realizado a partir da cultura (CHOI *et al.*, 2010; TSAI *et al.*, 2011; CHEN *et al.*, 2013) ou diretamente do LCR (KIM *et al.*, 2012; MARTINEZ *et al.*, 2012).

Em relação à família *Herpesviridae*, a taxa de detecção dos vírus foi de 2,8% para os HSV 1-2; 0,5% a 1,9% para o VZV; e 3,6% para o EBV (DUPUIS *et al.*, 2011; ZEYTIINOGLU *et al.*, 2017). Entre os casos positivos, a proporção dos vírus dessa família foi de 2,3% a 8,2% para o HSV 1; 12,0% a 13,6% para o VZV; 22,4% para o EBV; e 18,4% para o CMV (BASTOS *et al.*, 2014; DE OLIVEIRA *et al.*, 2017; KAMINSKI *et al.*, 2017)

A detecção do DENVs varia de 4,2% a 13,5% (SOLOMON *et al.*, 2000; JACKSON *et al.*, 2008; SOARES *et al.*, 2011; BASTOS *et al.*, 2014), e ela pode ocorrer mesmo sem a presença de características clássicas da dengue (SOLOMON *et al.*, 2000).

LEWTHWAITE *et al.* (2009) detectaram CHIKV em amostras de plasma de 14,0% (8/58) de crianças com suspeita de infecção do SNC na Índia, e também foi detectado no CSF de 3 crianças.

A presença do ZIKV no SNC tem sido descrita por diversos autores (NICASTRI *et al.*, 2016; ACEVEDO *et al.*, 2017; DA SILVA *et al.*, 2017; DE BROUCKER *et al.*, 2017; PARDIGON, 2017; PRADHAN *et al.*, 2017), incluindo casos de meningite/encefalite (CARTEAUX *et al.*, 2016; DA SILVA *et al.*, 2017; PRADHAN *et al.*, 2017; SCHWARTZMANN *et al.*, 2017)

## 2.2 AGENTES VIRAIS CLASSICAMENTE ASSOCIADOS ÀS MENINGITES

### 2.2.1 Enterovírus (EV)

#### DESCRIÇÃO VIRAL: CLASSIFICAÇÃO E ORGANIZAÇÃO GENÔMICA

Segundo o Comitê Internacional de Taxonomia Viral (ICTV, do inglês *International Committee on Taxonomy of Viruses*), a família *Picornaviridae* é composta por 16 gêneros, entre eles, o *Enterovirus* (EV) que são considerados os principais agentes responsáveis pelos casos de meningite viral no mundo com um espectro da infecção que varia desde infecções assintomáticas, doenças

respiratórias leves, até casos mais graves de meningoencefalite (DE CROM *et al.*, 2012).

Os EVs são vírus pequenos, não envelopados, com genoma RNA de fita simples, com polaridade positiva e aproximadamente 7,5 kb de tamanho. Contém uma única fase de leitura aberta (ORF, do inglês *open reading frame*), flanqueada por duas regiões não traduzidas (UTRs, do inglês *untranslated regions*), 5' e 3' terminais (Figura 3). A ORF codifica uma poliproteína que é clivada dando origem às diversas proteínas estruturais e não estruturais (RACANIELLO, 2007; MIYOSHI *et al.*, 2013).

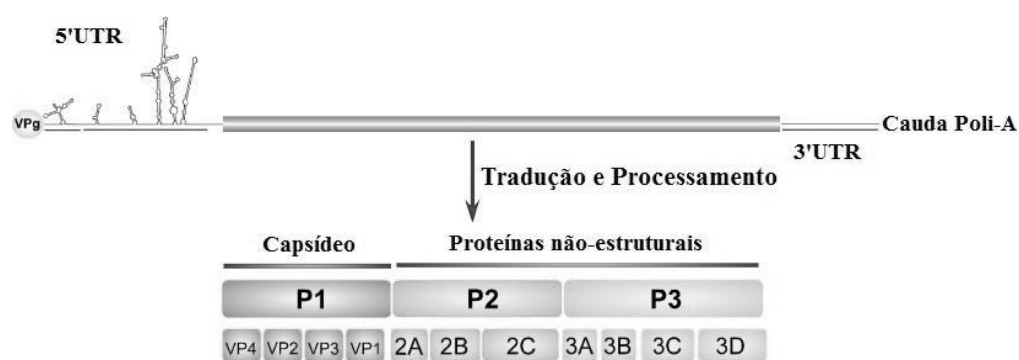


Figura 3. Esquema do genoma dos Enterovirus (adaptado de (LIN *et al.*, 2009).

Tradicionalmente, os EVs são divididos, com base nas diferenças entre os vírus quanto a sua antigenicidade, aos hospedeiros acometidos e ao seu potencial patogênico, em cinco subgêneros: *Poliovirus* (PV), *Coxsackievirus* (CV) do grupo A (CVA), CV do grupo B (CVB), *Echovirus* (E) e os “novos” *Enterovirus* (EV). Cada subgênero contém vários sorotipos únicos, que podem ser distinguidos com base na neutralização de antissoros específicos. No total, são mais de 90 sorotipos já identificados (GOLDMAN e AUSIELLO, 2011; KNIPE e HOWLEY, 2013; LONGO *et al.*, 2013). Mais tarde, a partir da análise molecular do seu genoma, os sorotipos dos vírus não-pólio vêm sendo classificados nas espécies EV A-J (ICTV, 2012). Alguns dos sorogrupos são endêmicos e outros são sazonais, produzindo epidemias periódicas (FARIAS *et al.*, 2011).

## APRESENTAÇÃO CLÍNICA

A maioria das infecções por PV é assintomática. Após um período de incubação de 3 a 6 dias, cerca de 4% a 8% dos pacientes desenvolvem poliomielite



abortada, doença leve evidenciada por febre, mal-estar, dor de garganta, anorexia, mialgia e cefaleia, com ou sem sinais gastrointestinais. Em geral, essa condição regride em 3 dias. Cerca de 1% dos pacientes desenvolvem meningite asséptica. A apresentação clínica menos comum é a poliomielite parálitica, na qual, depois de uma a vários dias, os sinais e sintomas da meningite asséptica são seguidos por dores graves nas costas, no pescoço, nos músculos e pelos desenvolvimento rápido ou gradativo de fraqueza motora. A dor muscular é um reflexo do crescimento viral neste tecido (KNIPE e HOWLEY, 2013; LONGO *et al.*, 2013).

A paralisia causada pelo PV pode ser classificada em espinal ou bulbar, a depender do grau de acometimento. A paralisia espinal afeta a medula espinal, e apresenta-se como assimétrica, flácida e limitada às extremidades e tronco e varia de uma fraqueza leve à quadriplegia. A poliomielite bulbar tem o envolvimento dos nervos cranianos motores ou do tronco encefálico, centro medular que controla a respiração e o sistema vasomotor, podendo levar à dificuldade de engolir, falar, ao comprometimento respiratório. O comprometimento autonômico também pode ser observado como anormalidades na transpiração, micção, defecação e controle da pressão arterial. A forma espinal pode se tornar associada à forma bulbar, levando à pólio bulboespinal (KNIPE e HOWLEY, 2013).

Outros EVs, além do PV, podem causar poliomielite ou paralisia flácida aguda. O EV71 é tido como o EV neurotrópico mais virulento no período pós-erradicação do PV, inclusive com envolvimento bulbar (KNIPE e HOWLEY, 2013).

Pelo menos 50% a 80% das infecções por EVs não-pólio são assintomáticas, as infecções assintomáticas costumam se manifestar como doenças febris, indiferenciadas e de curta duração, frequentemente acompanhadas de sintomas relacionados ao trato respiratório superior ou um dos vários tipos de exantema; no entanto, uma enorme gama de síndromes clínicas pode ser observada. Algumas síndromes pode ser causadas por vários sorotipos, enquanto outras são predominantemente causadas por certos subgrupos ou sorotipos (GOLDMAN e AUSIELLO, 2011; KNIPE e HOWLEY, 2013; LONGO *et al.*, 2013).

A apresentação clínica mais comum das infecções por EV é uma doença febril inespecífica, que se apresenta como febre de início súbito, mal-estar e cefaleia, podendo também apresentar sinais e sintomas associados às vias respiratórias superiores (resfriado comum, laringotraqueobronquite, epigloteite), além de náuseas e vômitos. Enquanto as infecções causadas por outros vírus respiratórios são mais

comuns no final do outono e no início da primavera, a esta doença febril inespecífica causada pelo EV (e também chamada de gripe do verão), comumente ocorre no verão e no início do outono (KNIPE e HOWLEY, 2013; LONGO *et al.*, 2013).

A doença da mão-pé-boca apresenta-se com febre, anorexia e mal-estar, seguidas por dor de garganta e vesículas na mucosa oral, e depois pelo aparecimento de lesões vesiculosas dolorosas no dorso das mãos. Estas, em geral, regredem no decorrer de uma semana, mas a doença pode apresentar complicações graves, incluindo doença do SNC, miocardite e hemorragia pulmonar (KNIPE e HOWLEY, 2013; LONGO *et al.*, 2013).

A pleurodinia, ou doença de Bornholm, caracteriza-se por febre de início súbito e espasmos de intensa dor torácica pleurítica ou abdominal alta. Estes podem durar de 15 a 30 minutos e estão associados a sudorese e taquipneia, sem, no entanto, apresenta fraqueza muscular. Nos lactentes, ocorrem enterovirose mais graves, que se assemelham à sepse bacteriana, com febre, irritabilidade e letargia. Dados laboratoriais mostram leucocitose com desvio à esquerda, trombocitopenia e função hepática alterada. Os EVs podem, ainda, causar herpangina, miocardite e pericardite, exantemas, conjuntivite hemorrágica aguda e outras manifestações (KNIPE e HOWLEY, 2013; LONGO *et al.*, 2013).

### Quadro neurológico

A características clínicas da meningite enteroviral em crianças mais velhas e em adultos começam muitas vezes abruptamente com cefaleia, febre e rigidez de nuca. Em alguns pacientes, a evolução é bifásica, com fase prodrômica inicial caracterizada por febre de baixo grau (associada ao sintomas constitucionais) e sintomas inespecíficos (mal estar, dor de garganta, diarreia), seguida por uma segunda fase na qual há comprometimento meníngeo, com desenvolvimento de febre mais alta, náusea, vômito, mialgia, fotofobia e rigidez cervical. Podem apresentar faringite e calafrios. O meningismo, quando presente, varia de brando a grave, e os sinais de Kernig e Brudzinski estão presentes em cerca de um terço dos indivíduos acometidos (GOLDMAN e AUSIELLO, 2011; KNIPE e HOWLEY, 2013).

Anormalidades não-neurológicas associadas aos EVs podem ser observadas, tais como o *rash*, e podem ser úteis no diagnóstico (KNIPE e HOWLEY, 2013). Podem ainda coexistir outras síndromes enterovirais. A sua evolução clínica é geralmente benigna e os sintomas regredem em uma semana em crianças e podem

continuar durante várias semanas nos adultos (GOLDMAN e AUSIELLO, 2011; KNIPE e HOWLEY, 2013).

## DIAGNÓSTICO

A celularidade do LCR costuma estar entre 10 e 500 células/mm<sup>3</sup>, mas pode exceder 1.000 células/mm<sup>3</sup>. Níveis menores que 10 células/mm<sup>3</sup> são observados em poucos casos. Logo no início do processo, costuma haver maior proporção de neutrófilos no LCR, mas na contagem diferencial há, invariavelmente, predominância de linfócitos em 1 a 2 dias. Até 15% dos pacientes, mais comumente lactentes de pouca idade, podem apresentar uma contagem normal de leucócitos no LCR. De modo geral, os níveis de glicose do LCR estão normais, e os de proteína podem estar normais ou levemente aumentados (GOLDMAN e AUSIELLO, 2011; LONGO *et al.*, 2013).

O diagnóstico dos EVs preconizado pela OMS é realizado através do isolamento em cultura para observação do efeito citopático (ECP); e/ou por sorologia, sendo principalmente utilizados a imunofluorescência indireta (IFI) e o teste de neutralização (TN). Entretanto, a taxa de isolamento viral é baixa, necessitando de métodos mais sensíveis. Deste modo, cada vez mais estudos vêm avaliando o uso de métodos moleculares como padrão-ouro para o diagnóstico dos EVs.

O principal alvo diagnóstico tem sido a 5'UTR, por ser a região mais conservada do genoma viral, enquanto a região VP1 é utilizada para a genotipagem. Não há consenso na literatura em relação ao método a ser utilizado, mas há uma tendência na utilização do *real time* PCR devido as suas características (eficiência, baixo risco de contaminação, velocidade, ampla aplicabilidade devido à possibilidade de detecção qualitativa, quantitativa e genotipagem). Alguns autores preferem partir do sobrenadante da cultura, enquanto outros partem diretamente do LCR. Além disso, poucos trabalhos apresentam resultados de validação dos métodos (NINOVE *et al.*, 2011; NOLTE *et al.*, 2011; VOLLE *et al.*, 2012).

Em relação à genotipagem, procede-se com o sequenciamento e análise filogenética da região variável VP1. Todavia, cerca de 30% dos isolados são classificados como não-tipáveis pela incapacidade de “anelamento” dos *primers* com esta região e amplificação do alvo.

## 2.2.2 Herpesviridae (HHV)

### DESCRIÇÃO VIRAL: CLASSIFICAÇÃO E ORGANIZAÇÃO GENÔMICA

A família *Herpesviridae* é composta por 3 subfamílias, *Alphaherpesvirinae*, *Betaherpesvirinae* e *Gammaherpesvirinae* (ICTV, 2012). Na subfamília *Alphaherpesvirinae* são encontrados os gêneros *Simplexvirus*, no qual estão incluídos os herpesvírus humanos 1 e 2 (HHV-1 e HHV-2, do inglês, *Human herpesvirus 1, 2*), antes denominados vírus simples do herpes (HSV-1 e HSV-2, do inglês, *Herpes simplex virus 1, 2*); e *Varicellovirus*, que inclui o HHV-3, antes denominado VZV (do inglês, *Varicella zoster virus*). Na subfamília *Betaherpesvirinae* são encontrados os gêneros *Citomegalovirus*, que inclui o HHV-5, antes denominado CMV (*Citomegalovirus*); e *Roseolovirus*, que inclui os HHV-6A, HHV-6B e HHV-7. E, finalmente, na subfamília *Gammaherpesvirinae* encontra-se os gêneros *Lymphocryptovirus* e *Rhadinovirus*. O HHV-4, antes designado EBV (do inglês, *Epstein-Barr virus*) pertence ao gênero *Lymphocryptovirus*, enquanto, o HHV-8, herpesvírus associado ao sarcoma de Kaposi (ou KSHV) pertence ao gênero *Rhadinovirus* (ICTV, 2012).

Os herpesvírus apresentam partícula viral relativamente grande, envelopada. Está entre os, com cerca de 150 Kb, e é representado por um único segmento de DNA de fita dupla linear que codifica mais de 70 ORFs. Devido a sua complexidade, vários métodos e alvos têm sido utilizados para pesquisa da família e de seus membros.

### APRESENTAÇÃO CLÍNICA

A gengivoestomatite, usualmente causada pelo HSV-1, ocorre mais frequentemente em crianças com menos de 5 anos. É caracterizada por febre, dor de garganta, edema de faringe e eritema, seguidos pelo desenvolvimento de lesões vesiculares ou ulcerativas na mucosa oral ou faríngea. As infecções recorrentes de orofaringe são mais frequentemente manifestadas como herpes simples labialis e usualmente aparecem na transição cutaneomucosa do lábio superior. São desencadeadas por febre, estresse, exposição à luz ultravioleta, entre outros (GOLDMAN e AUSIELLO, 2011).

O herpes genital é classicamente associado ao HSV-2, com uma frequência crescente de casos associados ao HSV-1. A doença primária se associa com febre,

mal-estar, anorexia e adenopatia inguinal bilateral. Infecções recorrentes podem ser angustiantes e apenas um terço dos indivíduos infectados não tem ou tem poucas recorrências clínicas (GOLDMAN e AUSIELLO, 2011).

A varicela, causada pelo VZV, caracteriza-se por um exantema generalizado, de distribuição centrípeta; máculas eritematosas, pápula, vesículas, e lesões escoriativas podem estar presentes ao mesmo tempo. Nos pacientes imunocomprometidos, a doença é frequentemente grave. A reativação do vírus causa a erupção cutânea conhecida como herpes zoster (GOLDMAN e AUSIELLO, 2011).

O CMV pode causar (1) infecção congênita e neonatal, com microcefalia, calcificação intracerebral, hepatoesplenomegalia e exantema; (2) infecção em receptores de transplante, com a presença da “síndrome CVM”, caracterizada por febre, neutropenia, linfócitos atípicos, e hepatoesplenomegalia; (3) infecção em imunocompetentes, que geralmente é assintomática, mas em alguns pacientes pode se assemelhar à mononucleose infecciosa, mas com mínimas faringite e linfadenopatia (GOLDMAN e AUSIELLO, 2011).

A maioria dos casos de infecção aguda pelo EBV é clinicamente silenciosa. A síndrome da mononucleose infecciosa consiste em uma tríade clínica de febre, dor de garganta e linfadenopatia, em associação com um linfocitose atípica e a aparição transitória de anticorpos heterofilos (GOLDMAN e AUSIELLO, 2011).

### Quadro neurológico

A meningite asséptica por HSV é uma complicação da infecção genital pelo HSV-2, com rigidez de nuca, fotofobia e cefaleia. As características clínicas da meningite ocorrem 3 a 12 dias após o aparecimento das lesões genitais e usualmente duram 4 a 7 dias. Complicações neurológicas ocorrem em cerca de um terço dos pacientes. Episódios recorrentes de meningite por HSV-2 podem ocorrer a intervalos de meses e ou anos em 20% dos pacientes, essa condição também é conhecida como meningite de Mollaret (KUPILA *et al.*, 2004; GOLDMAN e AUSIELLO, 2011; LONGO *et al.*, 2013). Embora a história ou presença de lesões genitais por HSV-1 sejam importante indício diagnóstico, muitos pacientes não tem história nem evidências de herpes genital ativo no momento da apresentação da meningite (LONGO *et al.*, 2013).

Deve-se suspeitar de meningite por VZV na presença de varicela ou herpes zoster concomitante. Contudo, é importante reconhecer que já foram descritos casos de meningite sem a ocorrência de exantema. O EBV também pode causar meningite com ou sem a presença de mononucleose infecciosa (LONGO *et al.*, 2013).

## DIAGNÓSTICO

O diagnóstico da meningite por HHV é idealmente feito por PCR do LCR, já que as culturas podem ser negativas, especialmente nos pacientes com meningite recorrente. A demonstração de síntese intratecal dos anticorpos anti-HHV específicos também pode ser útil no diagnóstico, embora sejam menos sensíveis e específicos do que o PCR, e possam ser negativos antes de decorrida a primeira semana de infecção. A presença de linfócitos atípicos no LCR ou no sangue é sugestivo de infecção pelo EBV, mas pode, no entanto, também estar presente em outras condições (LONGO *et al.*, 2013).

### 2.3 TRÍPLICE EPIDEMIA

Nos países de clima tropical onde mosquitos do gênero *Aedes* são encontrados, epidemias de doenças associadas ao DENV, CHIKV e ZIKV podem ocorrer separadamente ou concomitantemente.

Os DENV tem circulado no Brasil há pelo menos 30 anos, já pode ser considerada uma doença endêmica (OSANAI *et al.*, 1983). Classicamente, está associada a uma doença febril aguda (GOLDMAN e AUSIELLO, 2011), mas diversos trabalhos relataram a detecção do DENV em casos suspeitos de meningite, incluindo casos sem a apresentação da dengue clássica (SOLOMON *et al.*, 2000; BASTOS *et al.*, 2014; Al *et al.*, 2017; DE OLIVEIRA *et al.*, 2017; LOHITHARAJAH *et al.*, 2017)

O primeiro caso de infecção por CHIKV no Brasil foi diagnosticado no Rio de Janeiro em 2010. No final de 2014, os primeiros relatos de transmissão e surto nas cidades de Oiapoque e Feira de Santana surgiram no Brasil (ALBUQUERQUE *et al.*, 2012; AZEVEDO RDO *et al.*, 2015; NUNES *et al.*, 2015). De maneira similar aos outros países da América Latina, a linhagem Asiática foi detectada no Oiapoque, por outro lado, o primeiro relato da linhagem ECSA nas Américas foi em Feira de Santana (ALBUQUERQUE *et al.*, 2012; AZEVEDO RDO *et al.*, 2015; NUNES *et al.*,

2015) As infecções do SNC causadas pelo CHIKV são raras, mas foram relatadas, incluindo meningite, meningoencefalite, encefalite e encefalomieloradiculite (GANESAN *et al.*, 2008; ECONOMOPOULOU *et al.*, 2009; CHUSRI *et al.*, 2011; NELSON *et al.*, 2014; BECKHAM e TYLER, 2015; BRITO *et al.*, 2017; SAMRA *et al.*, 2017).

As doenças exantematosas agudas foram relatadas desde o final de 2014 no Brasil, mas o ZIKV foi identificado pela primeira vez no início de 2015 (CAMPOS *et al.*, 2015; CARDOSO *et al.*, 2015; ZANLUCA *et al.*, 2015), e, desde então, muitos casos foram relatados (CARDOSO *et al.*, 2015; ZANLUCA *et al.*, 2015; HEUKELBACH *et al.*, 2016). Mais tarde, o ZIKV também foi associado à SGB (OEHLER *et al.*, 2014; MUSTAFA e RAMASETHU, 2018) e microcefalia (VARGAS *et al.*, 2016; CABRAL *et al.*, 2017; MUSTAFA e RAMASETHU, 2018; RIBEIRO *et al.*, 2018; SOUZA *et al.*, 2018).

A alta prevalência destes vírus, bem como relatos da sua associação com comprometimento neurológico, os tornam agentes importantes a serem pesquisados no diagnóstico diferencial nos casos suspeitos de meningite viral.

### 2.3.1 Vírus da Dengue (DENV)

#### DESCRIÇÃO VIRAL: CLASSIFICAÇÃO E ORGANIZAÇÃO GENÔMICA

A família *Flaviviridae* compreende os gêneros *Flavivirus*, *Pestivirus*, *Hepacivirus* e *Pegivirus*. O gênero *Flavivirus* inclui um grupo importante de arbovírus, transmitidos por diferentes espécies de mosquitos, os quais são responsáveis por causar encefalites graves, febre hemorrágica e síndromes febris agudas, tais como o vírus da encefalite de Saint-Louis (SLEV, do inglês *St. Louis encephalitis virus*); o vírus do oeste do Nilo (WNV, do inglês *West Nile virus*); e o vírus da dengue (DENV, do inglês *Dengue virus*) (ICTV, 2012).

Os *Flaviviridae* são vírus pequenos, envelopados. Seu genoma é representado por um único segmento de RNA de fita simples, com polaridade positiva, com cerca de 10 Kb de tamanho. Semelhante aos *Picornaviridae*, os *Flaviviridae* apresentam uma única ORF, flanqueada por duas UTRs, 5' e 3' terminais (Figura 4). A poliproteína codificada é clivada em 10 peptídeos com função estrutural e não-estrutural (GUZMAN *et al.*, 2010). Os DENVs possuem quatro

sorotipos, DENV 1, 2, 3 e 4; e não há proteção cruzada entre os sorotipos (GOLDMAN e AUSIELLO, 2011).

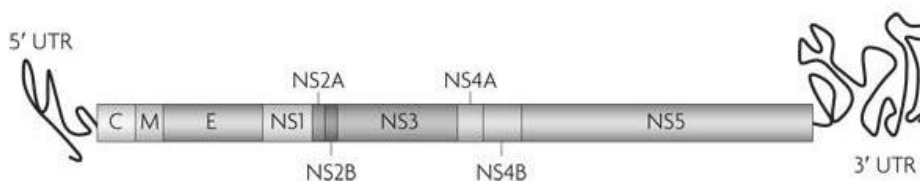


Figura 4. Esquema do genoma do DENV (GUZMAN *et al.*, 2010).

## APRESENTAÇÃO CLÍNICA

A infecção pelo DENV pode ser assintomática ou sintomática. Quando sintomática, causa uma doença sistêmica e dinâmica de amplo espectro clínico, variando desde formas oligossintomáticas até quadros graves, podendo evoluir para o óbito. Três fases clínicas podem ocorrer: febril, crítica e de recuperação.

Durante a fase febril, a primeira manifestação é a febre, de início abrupto, geralmente alta e com duração de 2 a 7 dias, associada à cefaleia, à fraqueza, às mialgias, às artralgias e a dor retroorbitária. O exantema está presente em 50% dos casos e é predominantemente do tipo máculopapular. Anorexia, diarreia, náuseas e vômitos podem estar presentes. Após a fase febril, grande parte dos pacientes recupera-se gradativamente com melhora do estado geral e retorno do apetite.

A fase crítica pode estar presente em alguns pacientes, podendo evoluir para as formas graves, e tem início com o desaparecimento da febre, entre o 3º e o 7º dia do início da doença, acompanhada do surgimento dos sinais de alarme. Esta fase inclui a dengue com sinais de alarme e a dengue grave.

Os sinais de alarme devem ser rotineiramente pesquisados, e, na sua maioria, são resultantes do aumento da permeabilidade vascular, a qual marca o início do deterioramento clínico do paciente e sua possível evolução para o choque por extravasamento de plasma. São considerados sinais de alarme:

- Dor abdominal intensa (referida ou à palpação) e contínua.
- Vômitos persistentes.
- Acúmulo de líquidos (ascite, derrame pleural, derrame pericárdico).
- Hipotensão postural e/ou lipotímia.
- Hepatomegalia maior do que 2 cm abaixo do rebordo costal.
- Sangramento de mucosa.



- Letargia e/ou irritabilidade.
- Aumento progressivo do hematócrito.

A dengue grave pode manifestar-se (1) com extravasamento de plasma, levando ao choque ou acúmulo de líquidos com desconforto respiratório; (2) sangramento grave ou (3) sinais de disfunção orgânica como o coração, os pulmões, os rins, o fígado e o SNC, com o quadro clínico semelhante ao observado no comprometimento desses órgãos por outras causas.

O choque ocorre quando um volume crítico de plasma é perdido através do extravasamento, o que geralmente ocorre entre os dias 4 ou 5 de doença, geralmente precedido por sinais de alarme. Ele é de rápida instalação e tem curta duração. Podendo levar o paciente ao óbito em um intervalo de 12 a 24 horas ou a sua recuperação rápida, após terapia apropriada. O choque prolongado e a consequente hipoperfusão de órgãos resulta na coagulação intravascular disseminada, que, por sua vez, pode levar a hemorragias graves, causando diminuição de hematócrito agravando ainda mais o choque.

Em alguns casos pode ocorrer hemorragia massiva sem choque prolongado e este sangramento massivo é critério de dengue grave. Estes casos não estão obrigatoriamente associados à trombocitopenia e hemoconcentração.

Nos pacientes que passaram pela fase crítica haverá reabsorção gradual do conteúdo extravasado com progressiva melhora clínica, a chamada fase de recuperação. Alguns pacientes podem apresentar um *rash* cutâneo acompanhado ou não de prurido generalizado. Infecções bacterianas podem ser percebidas nesta fase ou ainda no final do curso clínico. Tais infecções em determinados pacientes podem ter um caráter grave, contribuindo para o óbito (BRASIL, 2016; PATTERSON *et al.*, 2016).

### Quadro neurológico

O acometimento grave do sistema nervoso pode ocorrer no período febril ou, mais tardiamente, na convalescença e tem sido relatado com diferentes formas clínicas: meningite linfomonocítica, encefalite, síndrome de Reye, polirradiculoneurite, polineuropatias (como a SGB) e encefalite (BRASIL, 2016).

A frequência do comprometimento neurológico foi relatada entre 1% e 21% dos casos de dengue (THISYAKORN *et al.*, 1999; SOLOMON *et al.*, 2000; CAROD-ARTAL *et al.*, 2013). Apesar de raros, esses eventos estão associados

principalmente aos sorotipos DENV-2 e DENV-3, que são neutrópicos (WHO, 2009). Estes vírus já foram identificados em casos de meningite, mielite, e encefalite (PUCCIONI-SOHLER *et al.*, 2009; WHO, 2009; CAROD-ARTAL *et al.*, 2013). Esta, juntamente com a encefalopatia, são as complicações neurológicas mais comuns (CAROD-ARTAL *et al.*, 2013). Em alguns casos, a doença neurológica pode ser a primeira manifestação da infecção pelo DENV (PUCCIONI-SOHLER *et al.*, 2009; SOARES *et al.*, 2010; PUCCIONI-SOHLER *et al.*, 2017)

## DIAGNÓSTICO

Além da apresentação clínica do paciente, testes sorológicos são úteis na diagnóstico laboratorial. A leucopenia pode ser detectada a partir do segundo dia de febre, chegando a 2.000-4.000 células/mL no quarto ou quinto dia, com granulocitopenia. Em casos de febre hemorrágica, trombocitopenia e tempo de protrombina prolongado são observados (GOLDMAN e AUSIELLO, 2011).

A detecção do anticorpo IgM confirma a infecção recente, mas não especifica o sorotipo. Idealmente, o uso de amostras pareadas permite a detecção da soroconversão. Além disso, pode-se também buscar o antígeno NS1, proteína presente na fase inicial da doença, utilizando-se testes imunológicos. Nos primeiros dias após o início dos sintomas, o diagnóstico molecular pode ser feito utilizando-se o RT-PCR, que, além da detecção, também permite a identificação do sorotipo viral. O isolamento viral também está disponível, mas é uma técnica mais demorada com menor sensibilidade em relação ao PCR.

### 2.3.2 Vírus Chikungunya (CHIKV)

#### DESCRIÇÃO VIRAL: CLASSIFICAÇÃO E ORGANIZAÇÃO GENÔMICA

Segundo o ICTV, o CHIKV foi classificado em 1974 como sendo da família *Togaviridae*, que é composta por dois gêneros, entre eles o *Alphavirus*, no qual, além do CHIKV, ainda estão os vírus Mayaro, O'nyong-nyong, Rio Negro e Ross River (ICTV, 2016).

O CHIKV é um vírus envelopado, RNA de fita simples, cujo genoma apresenta cerca de 12 Kb, contendo duas ORFs, flanqueadas por duas UTRs, 5' e 3', e separadas por uma região de junção não traduzida (Figura 5). A primeira ORF codifica as proteínas não estruturais, de 1 a 4 (nsP1-4) e a segunda ORF codifica as

proteínas estruturais do *core* e do envelope (LI *et al.*, 2012; KNIPE e HOWLEY, 2013; GALÁN-HUERTA *et al.*, 2015).

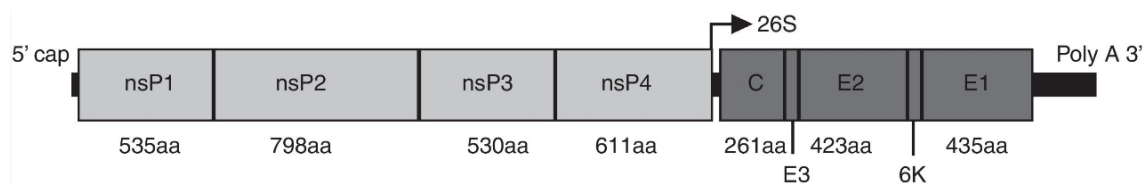


Figura 5. Esquema do genoma do CHIKV (GALÁN-HUERTA *et al.*, 2015).

Originalmente, três linhagens do CHIKV foram identificadas, grupos filogeneticamente distintos, com propriedades antigênicas distintas: Asiática (A), do Oeste Africano (WA), do Leste-Centro-Sul Africano (ECSA). Mais tarde, substituições de aminoácidos da linhagem ECSA deram origem à quarta linhagem: do Oceano Índico (IO) (POWERS *et al.*, 2000; SCHUFFENECKER *et al.*, 2006; ARANKALLE *et al.*, 2007; POWERS e LOGUE, 2007; TSETSARKIN *et al.*, 2007; DE LAMBALLERIE *et al.*, 2008; VOLK *et al.*, 2010; TSETSARKIN *et al.*, 2011; LI *et al.*, 2012; GALÁN-HUERTA *et al.*, 2015).

No Brasil, foi detectada a linhagem Asiática no Oiapoque, similar ao encontrado nos demais países da América Latina, pela primeira vez no continente, foi detectada a linhagem ECSA em Feira de Santana (NUNES *et al.*, 2015; RODRIGUES FARIA *et al.*, 2016).

## APRESENTAÇÃO CLÍNICA

A febre chikungunya é uma condição febril aguda, de início abrupto, caracterizada por poliartralgia severa e debilitante, comumente associada com *rash*, dor muscular, dor de cabeça, náusea e fadiga. A artralgia afeta, principalmente, tornozelos, joelhos, mãos, pulsos, pés, ombros e cotovelos. Os pacientes podem se recuperar de forma completa, mas estima-se que 60% deste podem apresentar artralgia por meses, e até mesmo anos, após a infecção. As infecções também podem ser assintomáticas em cerca de 10% dos casos. (BRIGHTON *et al.*, 1983; BORGHERINI *et al.*, 2007; STAIKOWSKY *et al.*, 2008; STAIKOWSKY *et al.*, 2009; SCHWARTZ e ALBERT, 2010; GERARDIN *et al.*, 2011; APPASSAKIJ *et al.*, 2013; THIBERVILLE *et al.*, 2013; GALÁN-HUERTA *et al.*, 2015; SAHADEO *et al.*, 2017).

## Quadro neurológico

A infecção do SNC pelo CHIKV é rara, mas tem sido relatada, incluindo meningite, meningoencefalite, encefalite, e encefalomieloradiculite (GANESAN *et al.*, 2008; ECONOMOPOULOU *et al.*, 2009; CHUSRI *et al.*, 2011; NELSON *et al.*, 2014; BECKHAM e TYLER, 2015; BRITO *et al.*, 2017; SAMRA *et al.*, 2017).

## DIAGNÓSTICO

Deve ser realizado o diagnóstico diferencial da febre da dengue e do O'nyong-nyong. O antígeno viral pode ser detectado na fase aguda por hemaglutinação e os anticorpos IgM podem ser detectados por seis meses ou mais. Os testes moleculares, incluindo o RT-PCR, deve ser realizado nos primeiros dias após o início dos sintomas e traz vantagens em relação à cultura e à detecção dos anticorpos. O diagnóstico pode ser feito por sorologia, mas é passível de reação cruzada com outros *Alphavirus* (ROBIN *et al.*, 2008; GOLDMAN e AUSIELLO, 2011; KNIPE e HOWLEY, 2013; DAVIDSON *et al.*, 2014).

A Organização Pan-Americana da Saúde recomenda o uso dos protocolos dos Centros de Controle e Prevenção de Doenças (CDC, do inglês *Centers for Disease Control and Prevention*) e do Instituto Pasteur (LANCIOTTI *et al.*, 2007; PANNING *et al.*, 2008; PAHO, 2014; GALÁN-HUERTA *et al.*, 2015).

### 2.3.3 Vírus Zika (ZIKV)

#### DESCRIÇÃO VIRAL: CLASSIFICAÇÃO E ORGANIZAÇÃO GENÔMICA

Segundo o ICTV, o ZIKV foi classificado em 1984 como sendo da família *Flaviviridae*, que é composta quatro gêneros, entre eles o *Flavivirus*, no qual, além do ZIKV, ainda estão outras 52 espécies, tais como os vírus Dengue, Ilhéus, Powassan, da Encefalite de Saint Louis, da Oeste do Nilo e da febre amarela (ICTV, 2016).

O ZIKV é um vírus RNA de fita simples positiva, cujo genoma apresenta cerca de 11 Kb, contendo uma única ORF que codifica uma poliproteína e é flanqueada por duas UTRs, 5' e 3' (Figura 6). A poliproteína é traduzida e processada, e dá origem a três proteínas estruturais: core, precursor da membrana, e envelope; e sete não-estruturais: NS1, NS2a, NS2b, NS3, NS4a, NS4b, e NS5 (CHAMBERS *et al.*, 1990; KUNO e CHANG, 2007; GALÁN-HUERTA *et al.*, 2016).

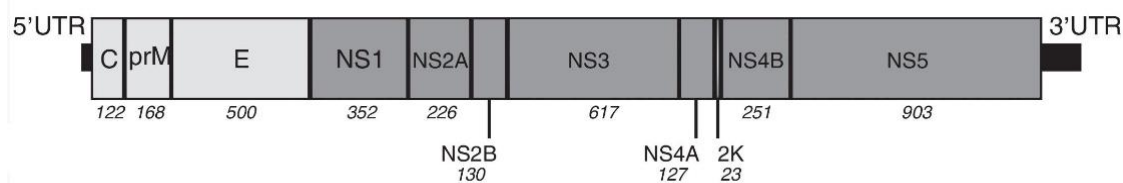


Figura 6. Esquema do genoma do ZIKV (GALÁN-HUERTA *et al.*, 2016).

Análises filogenéticas revelaram que o ZIKV apresenta três diferentes linhagens: do Oeste Africano, do Leste Africano e Asiática, sendo esta última responsável pelo surto nas Américas (LANCIOTTI *et al.*, 2008; FAYE *et al.*, 2014; ENFISSI *et al.*, 2016; GALÁN-HUERTA *et al.*, 2016)

## APRESENTAÇÃO CLÍNICA

Os sintomas da infecção pelo ZIKV são similares aos de outras arboviroses, e incluem febre, *rash* maculopapular, prurido, hiperemia conjuntival, mialgia, artralgia, mal-estar, dor de cabeça, dor retro-orbital e desordens digestivas. Estes sintomas são, normalmente, leves e duram de 2 a 7 dias (DUFFY *et al.*, 2009; GALÁN-HUERTA *et al.*, 2016; WHO, 2016).

## Quadro neurológico

Artigos têm relatado a associação entre a infecção pelo ZIKV e casos de microcefalia, outras malformações congênitas do SNC e abortos (BESNARD *et al.*, 2016; P. BRASIL; PEREIRA; *et al.*, 2016; GALÁN-HUERTA *et al.*, 2016; MEANEY-DELMAN *et al.*, 2016; RASMUSSEN *et al.*, 2016; SARNO *et al.*, 2016; SCHULER-FACCINI *et al.*, 2016; VARGAS *et al.*, 2016; SOUZA *et al.*, 2018). Um estudo em Pernambuco detectou IgM no LCR de crianças com microcefalia, o que confirma a infecção no SNC, visto que este anticorpo não ultrapassa a barreira hematoencefálica. Esse achado evidencia que a microcefalia foi uma consequência da infecção pelo ZIKV (CORDEIRO *et al.*, 2016; GALÁN-HUERTA *et al.*, 2016).

Pouco se sabe em relação às características clínicas dos casos de SGB causados pelo ZIKV. A maioria dos pacientes teve achados eletrofisiológicos compatíveis com a síndrome de neuropatia axonal motora motora (AMAN, do inglês *acute motor axonal neuropathy*) e apresentaram evolução rápida da doença. O resultado clínico foi geralmente favorável, apesar do início rápido e de uma fase curta de platô. Um relato de caso recente mostrou que um paciente que apresentava

características clínicas compatíveis com a síndrome de paraparesia de Guillain-Barré apresentou PCR positivo para ZIKV no soro, LCR, saliva e urina. Este estudo ajuda a confirmar a associação entre ZIKV e GBS (P. BRASIL; SEQUEIRA; *et al.*, 2016; CAO-LORMEAU *et al.*, 2016; GALÁN-HUERTA *et al.*, 2016)

Assim como a SGB, o ZIKV também tem sido detectado no LCR de pacientes com encefalopatia, encefalite, meningite, meningoencefalite, mielite e convulsões (CARTEAUX *et al.*, 2016; GALLIEZ *et al.*, 2016; MECHARLES *et al.*, 2016; ROZE *et al.*, 2016; SOARES *et al.*, 2016; MUNOZ *et al.*, 2017; ROTH *et al.*, 2017).

## DIAGNÓSTICO

A confirmação laboratorial da infecção pelo ZIKV pode ser feita pela detecção de antígenos ou anticorpos IgM anti-ZIKV, pelo teste de neutralização por redução de placas (PRNT, do inglês *plaque reduction neutralization test*) pela detecção do RNA viral. Em regiões nas quais outros *Flavivirus* são endêmicos, o diagnóstico sorológico pode ser complicado devido às reações cruzadas, que podem levar a resultados falso-positivos (GALÁN-HUERTA *et al.*, 2016; MUSSO e GUBLER, 2016; PAHO, 2016).

A depender das condições laboratoriais da região, o diagnóstico pode se basear em testes sorológicos, como a detecção do IgM pelo ensaio imunoabsorção enzimática (ELISA, do inglês *enzyme-linked immunosorbent assay*) ou testes rápidos; ou em testes moleculares, com o RT-PCR sendo o teste de escolha (FRY *et al.*, 2011; GALÁN-HUERTA *et al.*, 2016; MUSSO e GUBLER, 2016).

Em 2016, o órgão regulador norte-americano Administração de Alimentos e Medicamentos (FDA, do inglês *Food and Drug Administration*) autorizou o uso do MAC-ELISA para o ZIKV, do CDC para a detecção presuntiva do IgM anti-ZIKV no soro e no LCR (FDA, 2016; GALÁN-HUERTA *et al.*, 2016).

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Identificar os agentes virais responsáveis por casos de meningite e estabelecer um sistema de diagnóstico molecular para auxiliar na tomada de decisões clínicas e de saúde pública.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Validar o diagnóstico molecular das meningites virais utilizando o PCR convencional, simples e/ou *multiplex*, para identificar os grupos e os agentes individualmente;
- Identificar a frequência dos vírus responsáveis por casos de meningite nos pacientes atendidos no Hospital Couto Maia-BA;
- Descrever o perfil clinicoepidemiológico das meningites virais nos pacientes atendidos no Hospital Couto Maia-BA.

## 4 METODOLOGIA

### 4.1 PADRONIZAÇÃO DAS TÉCNICAS

Três protocolos foram selecionados para padronização e validação para o diagnóstico molecular dos agentes virais selecionados: DENVs, EVs e HHVs. Para o CHIKV e o ZIKV, foram escolhidos protocolos já em uso por membros da equipe e, dessa forma, não foi feita a sua padronização, pois já eram utilizados na rotina em outros projetos.

Para a detecção dos DENVs foi escolhido o protocolo descrito por LANCIOTTI *et al.* (1992), que adota um RT-PCR *semi-nested* e que permite a detecção e tipagem dos quatro sorotipos do DENV.

Para os EVs foi escolhido inicialmente o protocolo utilizado pelo CDC e descrito por NIX *et al.* (2006), que consiste em um RT-PCR *nested* cuja região alvo é a VP1, umas das regiões mais variáveis do genoma. A escolha dessa região foi justificada pela possibilidade da realização posterior do sequenciamento, permitindo, assim, a inferência do sorotipo viral através da filotipagem. No entanto, por problemas na padronização e na qualidade dos resultados obtidos, foi substituído por outro protocolo de RT-PCR convencional *nested* cujo alvo foi a 5'UTR, região conservada do genoma de todos os EVs (SANTOS *et al.*, 2012). Este método foi considerado mais sensível pela análise *in silico*, porém não permitiu a filotipagem.

Para os HHVs foi escolhido o protocolo descrito por MARKOULATOS *et al.* (2001) que consiste em um PCR *multiplex* que permite a detecção dos HHV de 1 a 5 em uma única reação. O alvo genômico varia de acordo com o vírus e as bandas de diferentes tamanhos permitem a discriminação viral.

Foram realizadas análises *in silico* para avaliar a sensibilidade presumida dos *primers* dos protocolos escolhidos e alguns destes foram alterados para melhorar o resultado. Para isso, foram utilizadas todas as sequências de genoma completo dos organismos estudados disponíveis no *Nucleotide database*, do *National Center for Biotechnology Information* (disponível no site <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide>). Um software foi desenvolvido em linguagem de programação Perl para fazer a busca do *primers* no banco de sequências referências. As ambiguidades dos *primers* foram substituídas por expressões regulares permitindo encontrar sequências com mutações nucleotídicas.



Para a extração dos ácidos nucleicos foi utilizado o kit *QIAamp<sup>®</sup> MinElute Virus Spin* (QIAGEN, USA), pois a sua proposta é a extração simultânea do RNA e do DNA. O protocolo é baseado em colunas de sílica e conta com uma etapa inicial de desnaturação utilizando a protease. Após a adsorção do ácido nucleico à coluna, foram realizadas múltiplas lavagens e o material final foi eluído para posterior utilização na RT e/ou diretamente na PCR. O kit *QIAamp<sup>®</sup> Viral RNA Mini* (QIAGEN, USA) já padronizado anteriormente também foi utilizado.

Para os vírus RNA, a etapa da RT foi realizada utilizando o kit *Sensiscript Reverse Transcription* (QIAGEN), que é recomendado especificamente para amostras com baixa concentração de ácido nucleico (até 50 ng). Além disso, também se optou por utilizar *random primers*, pois, desta maneira, o produto da RT pôde ser utilizado para os PCRs tanto para os EVs quanto para os DENVs.

A reação do PCR foi realizada utilizando o kit *TopTaq Master Mix* (QIAGEN) devido a sua praticidade. Num tubo são colocados os *primers*, o DNA (ou cDNA) molde, a mistura de reagentes pronta e água para completar o volume de 50 µL. Os experimentos foram iniciados com esta temperatura de anelamento (Ta) recomendada pelo fabricante de 60°C e ajustadas de acordo com a necessidade.

Para o PCR de DENV, não dispomos de nenhuma amostra previamente quantificada. As amostras-controle foram soros confirmadamente positivos por ELISA IgM, NS1 ou RT-PCR, sem quantificação. Desta maneira, apenas a sensibilidade foi calculada. O protocolo foi seguido usando a Ta descrita no artigo, 55°C (LANCIOTTI *et al.*, 1992). Para detecção dos EVs de SANTOS *et al.* (2012), padronizamos a metodologia utilizando a vacina contra poliomielite que contém o PV1, PV2 e PV3, e a Ta utilizada em ambas as reações da *nested* PCRs foi de 55°C. Da mesma forma, para padronização dos métodos de detecção dos HHVs foi utilizada a vacina contra o VZV e uma Ta de 60°C (MARKOULATOS *et al.*, 2001). Os limites de detecção para EV e HHV foram estimados a partir da detecção dos vírus em amostras com diluição seriada de 10<sup>0</sup> a 10<sup>-10</sup>.

#### 4.2 DESENHO DO ESTUDO, MATERIAIS E MÉTODOS

O desenho, local do estudo, casuística, materiais e métodos encontram-se no manuscrito incluído na seção Resultados da tese.

## 5 RESULTADOS – CAPÍTULO 1: PADRONIZAÇÃO DAS TÉCNICAS MOLECULARES

Os resultados das análises *in silico* estão listados nas tabelas abaixo para os DENVs (Tabela 1), o CHIKV (Tabela 2), o ZIKV (Tabela 3), os EVs (Tabela 4) e os HHVs (Tabela 5). Os métodos para detecção do CHIKV (EDWARDS *et al.*, 2007) e do ZIKV (BALM *et al.*, 2012) foram padronizados por outros membros do LPBM.

O *primer* genérico externo D1, descrito por LANCIOTTI *et al.* (1992), demonstrou boa sensibilidade (97,0%) *in silico* apenas para DENV1, enquanto seu par externo, D2, aparentemente, apresentou baixíssima similaridade para os quatro sorotipos do DENV (0,0% a 0,3%). As modificações propostas elevaram a sensibilidade *in silico* do D2 para 61,0%, 91,9%, 80,7% e 86,5% para o DENV1, DENV2, DENV3 e DENV4, respectivamente. Para a PCR *semi-nested*, o *primer* D1 foi reagido com os *primers* internos TS1, TS2, TS3 e TS4 (depois DEN4). Os *primers* TS1, TS2 e TS3 apresentaram baixa sensibilidade *in silico* (0,0% a 42,8%) e também foram modificados (51,6% a 80,0%). O *primer* DEN4 foi utilizado como descrito originalmente.

Tabela 1. Análise *in silico* da sensibilidade presumida dos *primers* para os DENVs.

Primer	Nº de correspondências							
	DENV1 (N = 1721)		DENV2 (N = 1312)		DENV3 (N = 893)		DENV4 (N = 193)	
	n	%	n	%	n	%	n	%
D1	1721	97,0%	0	0,0%	3	0,3%	0	0,0%
D1_rev	1727	97,4%	1302	99,2%	892	99,9%	192	99,5%
D2	0	0,0%	0	0,0%	3	0,3%	0	0,0%
D2_rev	1083	61,0%	1206	91,9%	721	80,7%	167	86,5%
TS1	12	0,7%	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%
TS1_rev	231	13,0%	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%
TS1_new	1348	76,0%	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%
TS2	0	0,0%	561	42,8%	0	0,0%	0	0,0%
TS2_rev	0	0,0%	677	51,6%	0	0,0%	0	0,0%
TS3	0	0,0%	0	0,0%	163	18,3%	0	0,0%
TS3_rev	0	0,0%	0	0,0%	714	80,0%	0	0,0%
TS4	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%	145	75,1%
DEN4	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%	173	89,6%

Os *primers* originais foram modificados (\_rev), ou substituídos por novos (\_new) e suas validades *in silico* foram analisadas.

Os *primers* para detecção do CHIKV, CHIK1 e CHIK2, apresentaram sensibilidade *in silico* bastante díspares. A baixa sensibilidade *in silico* do *primer* CHIK2 foi relacionado a dois *mismatches* (bases discordantes) em relação às sequências referência (dados não apresentados).

Tabela 2. Análise *in silico* da sensibilidade presumida dos *primers* para o vírus *Chikungunya*.

<i>Primer</i>	Nº de correspondências	
	CHIKV (N = 557)	
	n	%
CHIK1	355	63,7%
CHIK2	0	0,0%

Para os demais grupos, os *primers* descritos na literatura apresentaram sensibilidade *in silico* adequada não havendo necessidade de modificação ou substituição. As sensibilidades encontram-se descritas a seguir.

Tabela 3. Análise *in silico* da sensibilidade presumida dos *primers* para o vírus *Zika*.

<i>Primer</i>	Nº de correspondências	
	ZIKV (N = 284)	
	n	%
9027	262	92,3%
9197c	194	68,3%

Tabela 4. Análise *in silico* da sensibilidade presumida dos *primers* para os *Enterovirus*.

<i>Primer</i>	Nº de correspondências							
	Gênero EV <sup>†</sup> (N = 1196)		EV (N = 870)		Poliovirus (N = 172)		Rhinovirus (N = 154)	
	n	%	n	%	n	%	n	%
EVF1+	1170	97,8%	851	97,8%	172	100,0%	147	95,5%
EVF1-	837	70,0%	687	79,0%	150	87,2%	0	0,0%
EVF2+	1054	88,1%	832	95,6%	156	90,7%	66	42,9%
EVF2-	991	82,9%	819	94,1%	172	100,0%	0	0,0%

<sup>†</sup> O gênero *Enterovirus* foi estratificado entre os *Enterovirus*, *Poliovirus* e *Rhinovirus*. A coluna “Gênero EV” corresponde à soma das demais colunas.

Tabela 5. Análise *in silico* da sensibilidade presumida dos *primers* para os HHVs.

Primer	Nº de correspondências									
	HSV-1 (HHV1) (N = 10)		HSV-2 (HHV2) (N = 4)		VZV (HHV3) (N = 54)		EBV (HHV4) (N = 11)		CMV (HHV5) (N = 54)	
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
H <sub>1</sub> P <sub>32</sub>	9	90,0%	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%
H <sub>1</sub> M <sub>32</sub>	7	70,0%	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%
H <sub>2</sub> M <sub>40</sub>	0	0,0%	4	100,0%	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%
H <sub>2</sub> P <sub>4</sub>	0	0,0%	4	100,0%	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%
VP <sub>22</sub>	0	0,0%	0	0,0%	53	98,1%	0	0,0%	0	0,0%
VM <sub>20</sub>	0	0,0%	0	0,0%	53	98,1%	0	0,0%	0	0,0%
EP <sub>5</sub>	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%	9	81,8%	0	0,0%
EM <sub>3</sub>	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%	11	100,0%	0	0,0%
CP <sub>15</sub>	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%	24	44,4%
CM <sub>3</sub>	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%	42	77,8%

As regiões sombreadas correspondem aos resultados dos *primers* em relação aos vírus para os quais foram desenhados.

A validação das PCR propriamente foi realizada no LPBM. Para DENV, foram utilizados 6 controles para DENV1 e 10 para DENV4. Devido ao período interepidêmico, não haviam controles disponíveis para os DENV2 e DENV3. A sensibilidade por sorotipo foi de 83% (5/6) para o DENV1 e 80% (8/10) para o DENV4. A Figura 7 mostra apenas a capacidade de detecção do protocolo.

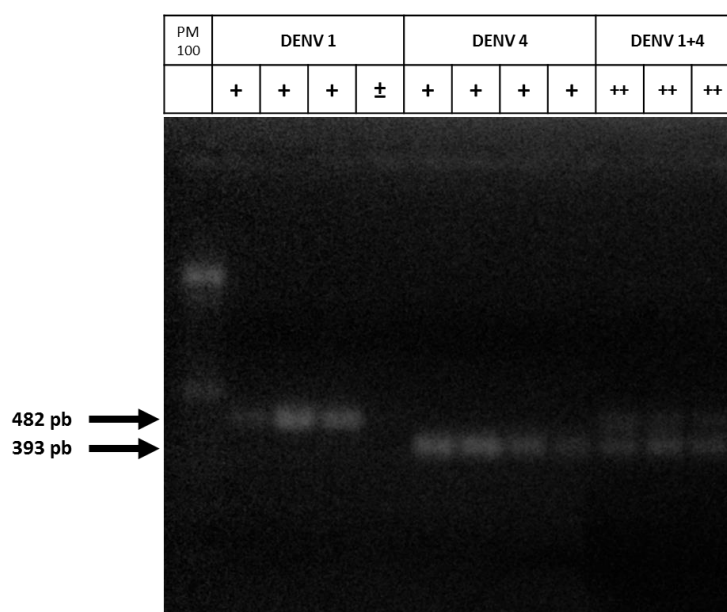


Figura 7. Capacidade de detecção do PCR para os DENVs. Foi utilizado um marcador de peso molecular de 100 pb. As setas indicam os tamanhos esperados da banda para os DENVs (482 pb para o DENV1 e 392 pb para o DENV4).

Para os EVs, o limite de detecção foi de  $10^{-3}$ , considerando que a carga viral presente na vacina é de 1.000.000 DICT<sub>50</sub> (dose infectante em cultura de tecido capaz de infectar 50% as células) para o poliovírus tipo 1, 100.000 DICT<sub>50</sub> para o poliovírus tipo 2 e 600.000 DICT<sub>50</sub> para o poliovírus tipo 3 por dose (duas gotas, que seria o equivalente à aproximadamente 100  $\mu$ L) e que foi utilizado 200  $\mu$ L por experimento, estima-se que o protocolo tem a capacidade de detectar até o mínimo de 2.000 DICT<sub>50</sub> para o poliovírus tipo 1, 200 DICT<sub>50</sub> para o poliovírus tipo 2 e 1.200 DICT<sub>50</sub> para o poliovírus tipo 3. A Figura 8 mostra o limite de detecção do 1º PCR para os EVs.

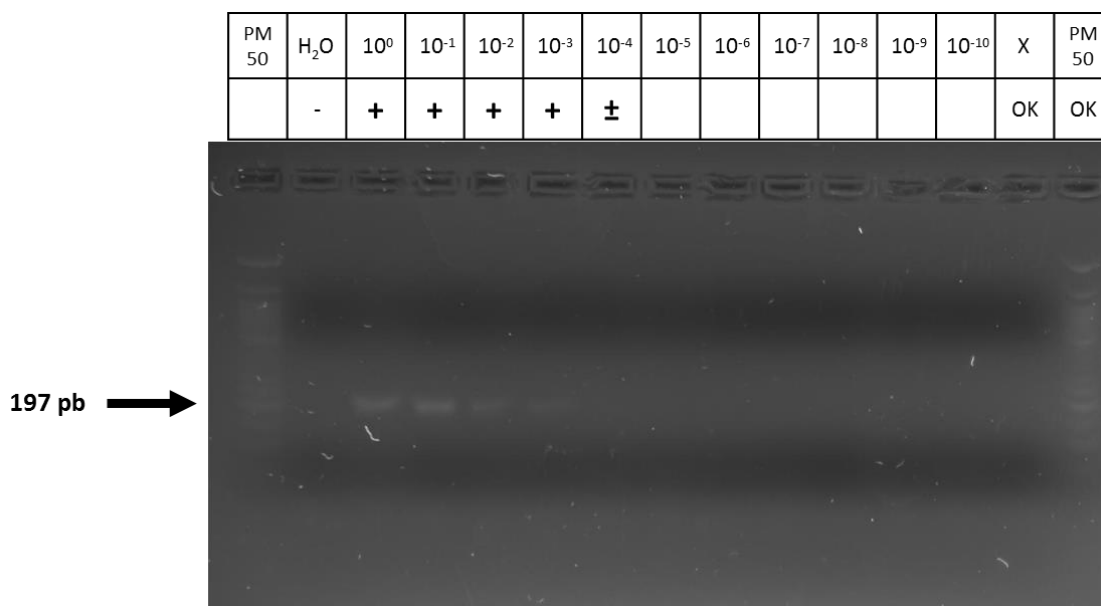


Figura 8. Limite de detecção do PCR para os EVs. Foi utilizado um marcador de peso molecular de 50 pb. A seta indica o tamanho esperado da banda para o 1º PCR dos EVs (197 pb).

Para os HHVs, o limite de detecção foi de pelo menos  $10^{-10}$  (apesar da difícil visualização na figura), considerando que a carga viral presente na vacina é de 1400 PFU do VZV atenuado em 700  $\mu$ L e que foi utilizado 200  $\mu$ L por experimento, estima-se que o protocolo tem a capacidade de detectar até, pelo menos  $4 \times 10^{-9}$  PFU. A Figura 9 mostra o limite de detecção do PCR para o VZV. Apesar da ausência de amostras com concentração conhecida para os demais HHVs. A Figura 10 mostra a capacidade de detecção dos demais *primers* do protocolo. A amostra controle cedida para o projeto de Herpes simples foi identificada como HSV1-2 (logo, sem distinção). Identificamos que se tratava do HSV1, no entanto, não conseguimos uma amostra HSV2

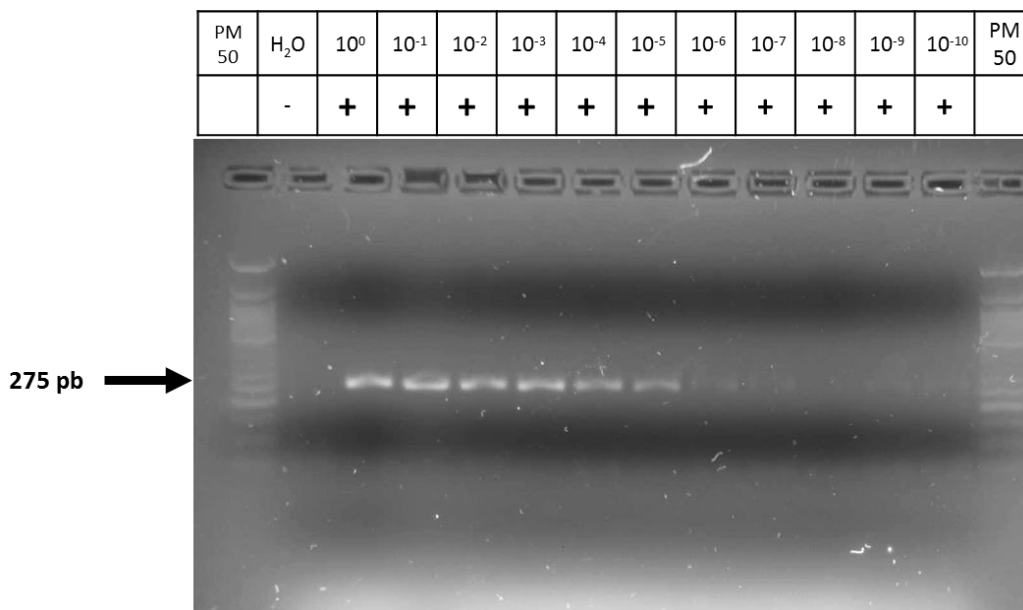


Figura 9. Limite de detecção do PCR para os HHVs. Foi utilizado um marcador de peso molecular de 50 pb. A seta indica o tamanho esperado da banda para os VZV (275 pb).

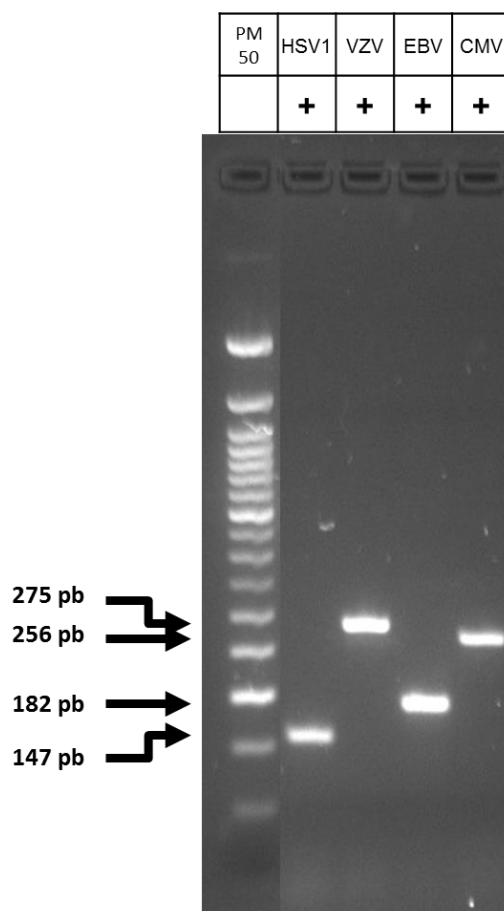


Figura 10. Capacidade de detecção do PCR para os HHVs. Foi utilizado um marcador de peso molecular de 50 pb. As setas indicam os tamanhos esperados da banda para os HHVs (147 pb para o HSV1, 275 pb para o VZV, 182 pb para o EBV, e 256 pb para o CMV).

O limite de detecção dos protocolos para o CHIKV (EDWARDS *et al.*, 2007) e o ZIKV (BALM *et al.*, 2012) foi determinado anteriormente, pois estas técnicas já estavam sendo usadas na rotina por membros da equipe e não mostradas nas Figura 11 (CHIKV) e Figura 12 (ZIKV) abaixo.

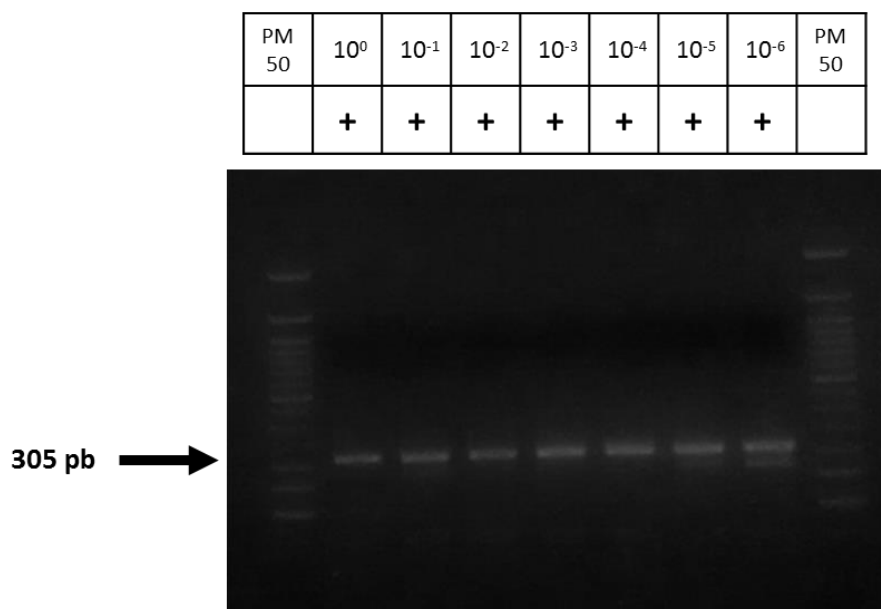


Figura 11. Limite de detecção do PCR para o CHIKV. Foi utilizado um marcador de peso molecular de 50 pb. A seta indica o tamanho esperado da banda para o CHIKV (305 pb).

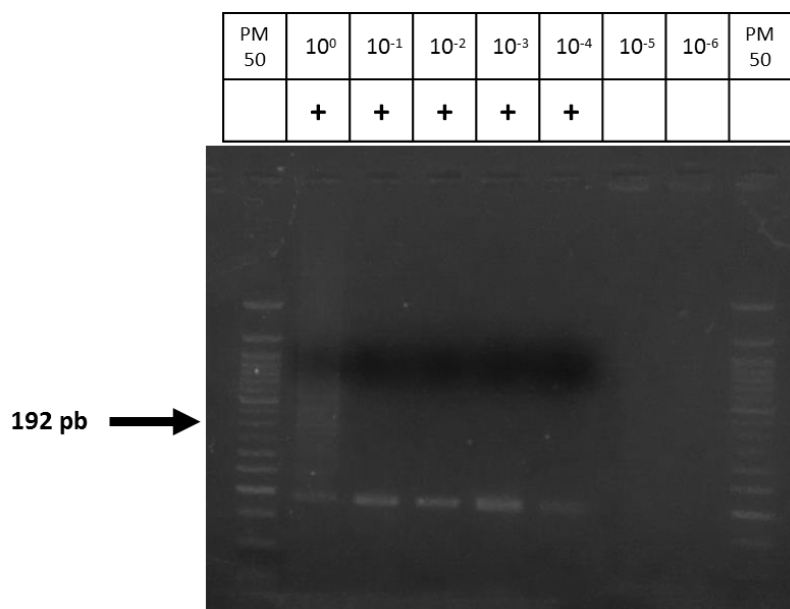


Figura 12. Limite de detecção do PCR para o ZIKV. Foi utilizado um marcador de peso molecular de 50 pb. A seta indica o tamanho esperado da banda para o ZIKV (192 pb).

## 6 RESULTADOS – CAPÍTULO 2: AVALIAÇÃO DOS CASOS

Para atender aos objetivos específicos abaixo, foi elaborado um manuscrito submetido à *Clinical Infectious Diseases* para publicação após correções e incorporação das sugestões dos membros da banca e demais autores do trabalho.

- Identificar a frequência dos vírus responsáveis por casos de meningite nos pacientes atendidos no Hospital Couto Maia-BA;
- Descrever o perfil clinicoepidemiológico das meningites virais nos pacientes atendidos no Hospital Couto Maia-BA.

<VER MANUSCRITO A PARTIR DA PÁGINA SEGUINTE>



## The emergence of arboviruses changes the profile of viral meningitis in Salvador, Bahia

Tamiris T Dias<sup>1,2</sup>

Laura B Tauro<sup>1,#a</sup>

Lara E N Macêdo<sup>1,3</sup>

Liz O Brito<sup>1,3</sup>

Victor H O Ribeiro<sup>4</sup>

Cleiton Santos<sup>5</sup>

Leile C J Nascimento<sup>1</sup>

Letícia S Vilas-Boas<sup>4</sup>

Caio Amado<sup>4</sup>

Paula S Barbosa<sup>1</sup>

Joice N Reis<sup>1,6</sup>

Gúbio S Campos<sup>7</sup>

Guilherme S Ribeiro<sup>1,8</sup>

Isadora C Siqueira<sup>5</sup>

Luciano K Silva<sup>1</sup>

Mitermayer G Reis<sup>1,4,9</sup>

<sup>1</sup> Laboratório de Patologia e Biologia Molecular, Instituto Gonçalo Moniz (Fiocruz-BA), Salvador, Bahia, Brazil

<sup>2</sup> Hospital Universitário Professor Edgard Santos, Salvador, Bahia, Brazil

<sup>3</sup> Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública, Salvador, Bahia, Brazil

<sup>4</sup> Faculdade de Medicina da Bahia, Universidade Federal da Bahia, Salvador, Bahia, Brazil

<sup>5</sup> Laboratório de Patologia Experimental, Instituto Gonçalo Moniz (Fiocruz-BA), Salvador, Bahia, Brazil

<sup>6</sup> Faculdade de Farmácia, Universidade Federal da Bahia, Salvador, Bahia, Brazil

<sup>7</sup> Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia, Salvador, Bahia, Brazil

<sup>8</sup> Instituto de Saúde Coletiva, Universidade Federal da Bahia, Salvador, Bahia, Brazil

<sup>9</sup> Yale School of Public Health, New Haven, Connecticut, USA

<sup>#a</sup> Current address: Instituto Nacional de Medicina Tropical, CONICET, Puerto Iguazu, Misiones, Argentina

Keywords: Viral meningitis, Arboviruses, Molecular Diagnosis, Epidemiological surveillance

\* Corresponding author

Mitermayer G dos Reis

Laboratório de Patologia e Biologia Molecular, Instituto Gonçalo Moniz (Fiocruz-BA), Rua Waldemar Falcão, 121, Candeal, Salvador, Bahia, Brazil (+55-71-3176-2289, +55-71-3176-2205, miter@bahia.fiocruz.br)

## **Abstract**

### **Background**

Classically, the most frequently detected virus in meningitis cases is Enterovirus (EV). Recently, different arboviruses emerged and became endemic in Brazil mostly causing acute febrile illnesses, however neurological manifestations have also been reported. This study aimed to investigate which viruses were involved in the meningitis etiology and the contribution of the circulating arboviruses in Salvador, Bahia, Brazil.

### **Methods**

From June, 2014, to February, 2016, 170 patients with suspected viral meningitis were identified by active day-time surveillance in Couto Maia Hospital (HCM), Salvador-BA, Brazil. Demographical and medical data were collected through interview and medical chart review. Their cerebral spinal fluid (CSF) samples were investigated for possible viral etiology by direct detection of viral nucleic acid: reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) for different arboviruses: dengue virus (DENV), zika virus (ZIKV) and chikungunya virus (CHIKV), and for the EV; and PCR for herpes simplex I/II (HSV I/II), varicella zoster virus (VZV), Epstein-Barr virus (EBV) and cytomegalovirus (CMV). Also, ELISA was carried out for detection of DENV IgM and NS1 antigen, ZIKV IgM and CHIKV IgM.

### **Results**

Demographics include similar gender distribution, mostly African descent, age ranging from 0 to 73 and resident in Greater Salvador. Thirty-four patients were PCR or ELISA positive for at least one of the studied virus (overall prevalence 20.0%), from which arboviruses accounted for 76.5%. DENV was the agent most frequently detected (13 cases; 7.6%). Of them, 8 (4.7%) were DENV1, 2 (1.2%) DENV3, and 3 (1.8%) DENV4.

We also detected 6 (3.5%) cases of CHIKV. Only 98 samples were available for ZIKV testing and 7 (7.1%) were ELISA positive. Four cases (2.4%) of viral co-infection were detected: DENV1 + CHIKV, DENV1 + EV, DENV4 + ZIKV, and CHIKV + ZIKV. Among the non-arboviral meningitis, the most common etiology was the EV (11 cases; 6.5%). Only 107 samples were available for HHV testing and one (0.9%) was PCR positive for VZV. No cases of DENV2, HSV I/II, EBV and CMV were detected. All samples tested by ELISA for DENV IgM and NS1 antigen and for CHIKV IgM were negative. Overall prevalence of viral meningitis was not associated with any medical background, clinical or hospital course characteristics, except neck rigidity and a CSF sample presenting slightly turbid or turbid aspect. Arboviruses, as a group, were associated with neck rigidity only. A CSF sample presenting slightly turbid or turbid aspect and more than 5 cells/mm<sup>3</sup> were statistically significant variables within the ZIKV cases. Being ≤15 years of age, a CSF sample presenting slightly turbid or turbid aspect and more than 100 cells/mm<sup>3</sup> were statistically significant variables within the EV cases. There was no association between the studied characteristics and DENV, CHIKV or VZV.

### **Conclusions**

Arboviruses accounted for the majority of identified viruses among patient with suspected viral meningitis. In areas where they are endemic it is crucial to increase viral surveillance and consider them in the differential diagnosis of meningitis.

## Introduction

After the introduction of vaccines against the causative agents of bacterial meningitis in Brazil between 1999 and 2010, the relative importance of viral meningitis in the country increased. Meningitis is a disease of compulsory notification in Brazil and between 2010 and 2015, there were 109,482 reported cases nationwide, 47,975 (43.8%) of which were considered to have a viral etiology. In Bahia alone, these numbers were 6,835 and 3,571 (52.2%), respectively [1]. Even though, many cases are not reported, the true burden of viral meningitis is probably much greater [2].

Although viral meningitis may cause long-term sequelae (mostly in children), the disease is rarely severe and recovery is usually complete. Case-fatality rates are also generally low. The early detection of epidemics through epidemiological surveillance allows for identification of the causal agent and the institution of targeted control measures and effective case management [3].

Classically viral meningitides are associated to non-polio enterovirus (EV). Viruses from *Herpesviridae* family (HHV) have been reported to cause both meningitis and encephalitis within immunocompromised individuals [4, 5].

Dengue virus (DENV), Chikungunya virus (CHIKV) and Zika virus (ZIKV) are arthropod-borne viruses (arboviruses) that in Brazil are carried by the mosquito *Aedes aegypti*. Despite their well-known relevance in acute febrile illnesses, presenting non-specific signs and symptoms, such as fever, malaise, myalgia and arthralgia, arboviruses have also been associated with neurological manifestations over the last years [6-8]. Therefore, inclusion of arboviruses in the differential diagnosis of central nervous system (CNS) infections has been considered increasingly important, especially in endemic regions.

DENV have been circulating in Brazil for, at least, three decades [9]. Classically, they're responsible for acute febrile illnesses, muscle and joint pain, malaise, exanthema and lymphadenopathy [10]. Neurological manifestations are considered rare, but there are several studies reporting their involvement in the central nervous system (CNS), such as meningitis, encephalitis and myelitis [11, 12].

The first case of CHIKV infection in Brazil was diagnosed in Rio de Janeiro in 2010 [13]. Late 2014, and similar to other Latin America countries, Asian lineage was detected in Oiapoque. On the other hand, but in the same period, ECSA lineage first report in the Americas was in Feira de Santana [14, 15]. CNS infections caused by CHIKV are rare, but they have been reported, including meningitis, meningoencephalitis and encephalitis [16-18].

Although underdetermined exanthematous illnesses have been reported since late 2014 in Brazil, ZIKV was first identified in early 2015 [19, 20], and, ever since, numerous cases have been reported [19, 21]. ZIKV has also associated with Guillain-Barré syndrome, microcephaly and meningoencephalitis [22-24].

This study aimed to investigate which viruses are involved in the meningitis etiology and the contribution of arboviruses as a cause for the illness in Salvador, Bahia, Brazil.

## **Methods**

### **Study design, site and patients**

From June, 2014, to February, 2016, we performed a cross-sectional surveillance study with patients with suspected viral meningitis who attended Couto Maia Hospital (HCM). As a public reference hospital for infectious diseases in the state of Bahia, HCM receives patients referred from other health care units from all over the state and are treated by the Unified Health System (SUS), the Brazilian publicly funded health care system. All patients who underwent lumbar puncture as part of routine care and met the inclusion criteria were invited to join the study. The inclusion criteria consisted of mononuclear leukocyte predominant cell count of any value or  $\leq 100$  cells if polymorphonuclear leukocyte predominant, and negative tests for bacteria in the CSF. This study was approved by the institutional ethics review board (N<sup>o</sup> 613.123). All participants, or their proxy, gave written informed consent.

### **Data collection**

Demographics, medical and epidemiological background, clinical and laboratory data were collected through interviews and medical chart reviews. REDCap database (Vanderbilt University, USA) was used for data handling.

### **Laboratory diagnosis**

*CSF study:* Routine laboratory testing for CSF samples was performed by the hospital laboratory personnel. It included total and differential cell count; glucose and protein level determination; direct microscopy of CSF stained smears with Gram, Ziehl-Neelsen and India-ink; and bacteria, fungi and Mycobacterium tuberculosis cultures.

*Molecular testing:* Samples used in molecular tests were frozen upon collection, transported on dry ice, and kept at -70°C until DNA and RNA extractions. They were not thawed more than twice to ensure genetic material quality. Viral RNA was extracted using QIAamp® Viral RNA Mini (QIAGEN, USA) from 140 µL of CSF; while viral DNA was extracted using QIAamp® MinElute Virus Spin (QIAGEN, USA) from 200 µL of CSF, following the manufacturer's instructions for both kits. RNA templates were reverse transcribed into cDNA with random 6-mer primers (Invitrogen, USA), RNase inhibitor (Qiagen, USA) and the Sensiscript reverse transcriptase (Qiagen, USA) as per manufacturer's directions. DNA and cDNA templates were amplified by PCR, using Top Taq Master Mix (QIAGEN, USA) and viral specific primers taken from Lanciotti, Calisher [25] for DENV detection; Edwards, Welch [26] for CHIKV; Balm, Lee [27] for ZIKV; Santos, Burlandy [28] for EV and Markoulatos, Georgopoulou [29] for HHV. PCR conditions were as described in the references. Results were analyzed by electrophoresis through a 3% agarose gel.

*Immunodiagnostic testing:* Immunodiagnostic tests were performed in 107 CSF samples using ELISA kits from PANBIO (Alere, USA) for DENV IgM and NS1 antigen and EUROIMMUN (Perkin-Elmer, Germany) for CHIKV IgM. Manufacturer's instructions were followed. Ninety-eight samples were also tested for ZIKV IgM, following CDC's protocol.

### **Statistical analysis**

Statistical analyses were performed using the SPSS v.21 [30] and STATA v.10.0 [31]. The events of interest were reported as proportions with 95% confidence interval  $\pm$  standard deviations, means and amplitude. Prevalence ratio (PR) was computed to determine how greater (or smaller) the prevalence of confirmed cases is if they present



a specific characteristic, such as CSF laboratory data, signs and symptoms. To compare proportions, Chi-square test or Fisher's exact test were used, and. P-values < 0.05 were considered significant.

## Results

### Demographics

A total of 170 patients with suspected viral meningitis who met the inclusion criteria were enrolled. Mean patient age was 22.2 years old (median = 18 years old, ranging from 1 month to 73 years old). There was no gender predominance, with female accounting for 50.6% (86/170) and male, 49.4% (84/170). The majority were afro-descendants (self-reported black or brown, 88.0%) and lived in Salvador or its surroundings (Greater Salvador, 83.4%, Table 1). Monthly family income of up to 2 minimum wages was reported by 71.7%. Mean minimum wage through the study period was equivalent to approximately US\$ 250.

### Prevalence of confirmed viral meningitis

Thirty-four patients were PCR or ELISA positive for at least one of the studied virus (overall prevalence 20.0%), from which arboviruses were detected in 26 (15.3%), accounting for 76.5% of those confirmed cases. DENV was the agent most frequently detected (13 cases; 7.6%). Of them, 8 (4.7%) were DENV1, 2 (1.2%) DENV3, and 3 (1.8%) DENV4. We also detected 6 (3.5%) cases of CHIKV. Only 98 samples were available for ZIKV testing and 7 (7.1%) were ELISA positive. Four cases (2.4%) of viral co-infection were detected: one co-infection by DENV1 and CHIKV, one by DENV1 and EV, one by DENV4 and ZIKV, and another by CHIKV and ZIKV. Among the non-arboviral meningitis, the most common etiology was the EV (11 cases; 6.5%). Only 107 samples were available for HHV testing and one (0.9%) was PCR positive for VZV. No cases of DENV2, HSV I/II, EBV and CMV were detected (Table 2). All samples tested by ELISA for DENV IgM and NS1 antigen were negative.

## **Epidemiological surveillance**

Temporal distribution of the number of confirmed and suspected viral meningitis cases is shown in Figure 1. There was no clear seasonal pattern for any of the studied viruses. They were detected throughout the year. First two CHIKV cases were detected in August 2014. ZIKV cases were detected from May through December 2015. Co-infections were detected in July and September 2014 with DENV1 + CHIKV and DENV1 + EV, respectively, and May and August 2015 with DENV4 + ZIKV and CHIKV + ZIKV, respectively. The only VZV case was detected in December 2015.

Most cases were detected in Greater Salvador with few cases in the countryside of the state of Bahia. Arbovirus cases were, mostly, concentrated in Greater Salvador, while EV had wider distribution. CHIKV cases were detected in one patient from Amargosa (city located about 240 km from Salvador and about 150 km from Feira de Santana) and another from Salvador. The only ZIKV case detected outside Greater Salvador was from Itaberaba (city located about 300 km from Salvador). VZV and both co-infections were detected in Greater Salvador.

## **Medical background, clinical and hospital course**

In general, previous medical conditions were infrequently reported such as sinusitis (19.1%), otitis media (9.4%), pneumonia (7.9%) and diabetes mellitus (4.0%). There were seven HIV positive patients and they all were negative cases. History of previous meningitis was reported by 5.8% of patients. Antibiotic therapy was reported both 7 days prior to and during hospitalization by 31.5% and 12.6% of patients, respectively. Antibiotic use was more reported among negative cases (data not shown).

CSF samples from the majority of patients were deemed "normal": colorless (95.2%), limpid (79.0%), presenting a cell count  $\leq 5$  cells/mm<sup>3</sup> (63.1%) with predominance of mononuclear leukocytes (98.2%). CSF glucose and protein were within the normal range, 69.5% and 68.3%, respectively.

Fever (80.5%) and headache (80.4%) were the most frequently reported signs and symptoms upon attendance, followed by vomiting (53.8%), neck pain (52.0%) and neck rigidity (32.0%). Less than 15.0% of patients reported any neurological manifestations, such as somnolence (14.4%), seizures (8.2%) or altered state of consciousness (6.6%). These results are shown on Table 3.

The majority of cases (57.9%) was referred from other health care units and 71.8% of them sought medical attention  $\leq 5$  days after initial symptoms (median = 3 days). Despite clinical presentation and suspicion of viral meningitis, only 36.9% (62/168) of patients were hospitalized for 10.8 days in average (ranging from 1 to 54 days). All confirmed cases were discharged without sequelae, whereas three negative cases presented with sequelae (data not shown).

### **Prevalence ratio analysis and the risk of viral meningitis**

Overall prevalence of viral meningitis was not associated with any medical background, clinical or hospital course characteristics, except neck rigidity and a CSF sample presenting slightly turbid or turbid aspect. Arboviruses, as a group, were associated with neck rigidity only. A CSF sample presenting slightly turbid or turbid aspect and more than 5 cells/mm<sup>3</sup> were statistically significant variables within the ZIKV cases. Being  $\leq 15$  years of age, a CSF sample presenting slightly turbid or turbid aspect and more than 100 cells/mm<sup>3</sup> were statistically significant variables within the

EV cases. There was no association between the studied characteristics and DENV, CHIKV or VZV (Table 4).

## Discussion

This study aimed to investigate which viruses were involved in the meningitis etiology and the contribution of arboviruses as a cause for the illness in Salvador, Bahia, Brazil. Although classically associated with acute febrile illnesses, the inclusion of arboviruses in the differential diagnosis of CNS infections had been considered increasingly important throughout the years, especially in endemic regions, since they have been associated with neurological manifestations [6-8].

Indeed, arboviruses were responsible for 76.5% of all confirmed cases, including DENV, CHIKV and ZIKV. DENV was the most prevalent virus identified, detected in 7.6% of all samples and accounting for 38.2% of the positive cases. DENV-1 was the most frequently reported, which is also a reflection of DENV serotype circulation in Brazil [32]. Similar to our results, Acevedo, Waggoner [6] evaluated adult patients admitted with neurological symptoms, and DENV was responsible for 31.2% of positive cases (5/16). It's been reported that DENV meningitis caused may occur without the signs and symptoms classically assigned to DENV cases [8], and only about one third of our DENV cases presented classical symptoms, such as myalgia, arthralgia and retro-orbital pain (data not shown).

Despite the fact that EV is classically the major virus causing meningitis [4, 5], it was the second most prevalent virus in the present study, being detected in 6.5% of all CSF samples, which accounted for 32.4% of the positive cases. In the literature, it is responsible for 32.6% to 70.1% of viral meningitis cases [7, 33, 34]. In a study carried in the same reference hospital of the present study, Silva, Tanajura [35] had a detection rate of 44.6% (50/112), and EV accounted for 84% of that positivity. In their

study, CSF and/or stool culture were available, as well as PCR, but they did not detect any arbovirus.

de Crom, van Furth [36] analyzed meningitis cases caused by EV in the absence of CSF pleocytosis. The authors concluded that, specially within young children, the absence of pleocytosis does not justify the EV exclusion from the differential diagnosis. This conclusion supports our decision of including patients who presented a CSF cell count of any value in case of mononuclear leukocyte predominance, and it also supports the results presented in this paper, in which 47.1% of CSF from patients with detectable virus presented  $\leq 5$  cells/mm<sup>3</sup>. Viral meningitis should indeed be considered even when CSF cell count is under the established normal range cutoff of 5 cells/mm<sup>3</sup>. CHIKV accounted for 17.6% of the positive cases. It was identified in Bahia in an outbreak in the city of Feira de Santana (about 120 Km from Salvador) in September 2014, but the epidemiologic investigations suggested that the index case-patient went to an emergency health unit in May [14, 37, 38]. In this study, the first two CHIKV cases were detected in August 2014, one from the city of Amargosa (about 150 km from Feira de Santana) and the other from Salvador. These findings suggest that CHIKV could be quickly transmitted to other municipalities farther than 100 Km from Feira de Santana.

We reported 4 cases of co-infection (11.8% among confirmed cases): DENV1 + EV, DENV1 + CHIKV, DENV4 + ZIKV and CHIKV + ZIKV. Taraphdar, Sarkar [39] also reported a co-infection of DENV + CHIKV in acute febrile illnesses. Chahar, Bharaj [40] also showed that in areas where both viruses co-circulate, DENV and CHIKV can be transmitted together, with a co-infection rate of 8.7%, and we showed that different arboviruses can also be transmitted together. Acevedo, Waggoner [6] identified a high rate of co-infections in the CSF, 75.0% (9/12). Reports of DENV + EV co-infection have

not been found up to this moment. There are no data describing the impact of co-infections in the CNS accounting for the severity of the clinical presentation or its outcome.

ZIKV accounted for 20.6% of confirmed cases, and its presence in the CNS have already been described several authors, including cases of meningitis/encephalitis [6, 41-46]. This detection of this virus in the CSF coincides with the same period its identification in Brazil, in early 2015 [19, 20]. The detection in Itaberaba (about 300 km from Salvador) may be related to the high flow of people to and from this touristic area. The detection rate based in the PCR positivity, alone, was low (17.1%), but similar to the rates described elsewhere, which varies from 14.8% to 62.9% [7, 33, 47]. This can be explained, partially, by the patients' timing to seek medical attention and by the narrow window of viral detection for acute illnesses. However, nucleic acid amplification tests (NAATs) allow for the detection of viral pathogens before viral antigens and antibodies are present in sufficient quantities to be detected and do not require viable virus [48].

The majority of cases sought medical attention within 5 days after the onset of symptoms, which is in accordance to the described by Othman, Volle [49]. In their study, the mean symptom duration before lumbar puncture was 2.7 days; surprisingly, Acevedo, Waggoner [6] were able to detect viral RNA as late as 14 days post-symptom onset. Low viral load in the CSF at the moment of the lumbar puncture and the intrinsic sensitivity of the methods used might have influenced the low detection rate.

In spite of the number of cases and the mechanism of transmission, these infections did not show seasonal pattern. In contrast to our findings, EV and DENV infections can show a summer pattern according some authors [33, 50].



Only a few variables were statistically different between the confirmed cases. This suggests that meningitis cases of viral etiology are usually mild, but, nonetheless, should be investigated. Although not statistically significant, antibiotic use was more reported among negative cases, which could suggest those were false-negative cases of bacterial meningitis, undiagnosed due to therapy prior to sample collection. Further tests would be necessary to confirm that hypothesis.

Different viruses, such as DENV, CHIKV, ZIKV, EV, HHV and VZV were associated with viral meningitis and other neurological manifestations. Although EV is, classically, the most common virus causing meningitis, in endemic areas, such as Salvador, it is crucial to increase viral surveillance and consider the arboviruses in the differential diagnosis of meningitis.

Although EV is, classically, the most common virus causing meningitis and it was associated with some cases in this study, arboviruses accounted for more than 60% of the identified viruses. DENV, EV, CHIKV and VZV are associated with widely varied neurological manifestations making diagnosis challenging. In arboviruses endemic areas it is crucial to increase viral surveillance and consider them in the differential diagnosis of meningitis.

## **Funding**

This work was supported by Programa Pesquisa para o SUS [Grant number: SUS0011/2014, edital PPSUS-2013-II-chamada-versão-final-22.11.13] and Programa de Apoio a Núcleos de Excelência [Grant number: PNX0017/2009, edital nº 20/2009 PRONEX].

## **Acknowledgments**

The authors thank Rita de Cassia Palma Cunha Lima and Theomira Mauadie de Azevedo Carmo for their initial contribution to protocol validation of enterovirus detection. Special thank you to Dr. Ronald Blanton for reviewing the paper and for all the suggestions.

## References

1. SINAN. Available at: <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/deftohtm.exe?sinannet/cnv/meninbr.def>. Accessed Nov 9th, 2017.
2. Emmerick ICM, Campos MR, Schramm JMda, Silva RSd, Costa MdFdS. Estimativas corrigidas de casos de meningite, Brasil 2008-2009. *Epidemiologia e Serviços de Saúde* **2014**; 23: 215-26.
3. PAHO. Epidemiological Bulletin. Vol. 22, No. 4. Case Definitions: Meningococcal Disease and Viral Meningitis. Available at: [http://www1.paho.org/english/sha/be\\_v22n4-casedef.htm#2](http://www1.paho.org/english/sha/be_v22n4-casedef.htm#2). Accessed Nov 5th, 2017.
4. Logan SA, MacMahon E. Viral meningitis. *Bmj* **2008**; 336(7634): 36-40.
5. Ramachandran TS. Aseptic Meningitis. Available at: <https://emedicine.medscape.com/article/1169489-overview?pa=CeEy3i5yW%2F8VyxMdu%2F%2FWH9AKBqE0wML%2FSvpORkUvHRCYYRW1x7XvmO99VZL7cFtqDX4FKQtzrkK9DRbGCq38P1aycSibeA0Q%2FJsWK%2BpGHzs%3D>. Accessed Nov 5th, 2017.
6. Acevedo N, Waggoner J, Rodriguez M, et al. Zika Virus, Chikungunya Virus, and Dengue Virus in Cerebrospinal Fluid from Adults with Neurological Manifestations, Guayaquil, Ecuador. *Frontiers in microbiology* **2017**; 8: 42.
7. de Oliveira DB, Candiani TM, Franco-Luiz AP, et al. Etiological agents of viral meningitis in children from a dengue-endemic area, Southeast region of Brazil. *Journal of the neurological sciences* **2017**; 375: 390-4.
8. Marinho PE, Bretas de Oliveira D, Candiani TM, et al. Meningitis Associated with Simultaneous Infection by Multiple Dengue Virus Serotypes in Children, Brazil. *Emerging infectious diseases* **2017**; 23(1): 115-8.
9. Osanai CH, Travassos da Rosa AP, Tang AT, do Amaral RS, Passos AD, Tauil PL. [Dengue outbreak in Boa Vista, Roraima. Preliminary report]. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo* **1983**; 25(1): 53-4.
10. Goldman L, Ausiello D. *Cecil Medicina*. 23 ed. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, **2011**.
11. Carod-Artal FJ, Wichmann O, Farrar J, Gascon J. Neurological complications of dengue virus infection. *The Lancet Neurology* **2013**; 12(9): 906-19.
12. Puccioni-Sohler M, Soares CN, Papaiz-Alvarenga R, Castro MJ, Faria LC, Peralta JM. Neurologic dengue manifestations associated with intrathecal specific immune response. *Neurology* **2009**; 73(17): 1413-7.
13. Albuquerque IG, Marandino R, Mendonca AP, et al. Chikungunya virus infection: report of the first case diagnosed in Rio de Janeiro, Brazil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* **2012**; 45(1): 128-9.
14. Nunes MR, Faria NR, de Vasconcelos JM, et al. Emergence and potential for spread of Chikungunya virus in Brazil. *BMC medicine* **2015**; 13: 102.
15. Rodrigues Faria N, Lourenco J, Marques de Cerqueira E, Maia de Lima M, Pybus O, Carlos Junior Alcantara L. Epidemiology of Chikungunya Virus in Bahia, Brazil, 2014-2015. *PLoS currents* **2016**; 8.
16. Economopoulou A, Dominguez M, Helynck B, et al. Atypical Chikungunya virus infections: clinical manifestations, mortality and risk factors for severe disease during the 2005-2006 outbreak on Reunion. *Epidemiology and infection* **2009**; 137(4): 534-41.
17. Ganesan K, Diwan A, Shankar SK, Desai SB, Sainani GS, Katrak SM. Chikungunya encephalomyelorradiculitis: report of 2 cases with neuroimaging and 1 case with autopsy findings. *AJNR American journal of neuroradiology* **2008**; 29(9): 1636-7.

18. Samra JA, Hagood NL, Summer A, Medina MT, Holden KR. Clinical Features and Neurologic Complications of Children Hospitalized With Chikungunya Virus in Honduras. *Journal of child neurology* **2017**; 32(8): 712-6.
19. Cardoso CW, Paploski IA, Kikuti M, et al. Outbreak of Exanthematous Illness Associated with Zika, Chikungunya, and Dengue Viruses, Salvador, Brazil. *Emerging infectious diseases* **2015**; 21(12): 2274-6.
20. Campos GS, Bandeira AC, Sardi SI. Zika Virus Outbreak, Bahia, Brazil. *Emerging infectious diseases* **2015**; 21(10): 1885-6.
21. Heukelbach J, Alencar CH, Kelvin AA, de Oliveira WK, Pamplona de Goes Cavalcanti L. Zika virus outbreak in Brazil. *Journal of Infectious in Developing Countries* **2016**; 10(2): 116-20.
22. Mustafa MS, Ramasethu R. Zika: An enormous public health challenge for a miniscule virus. *Medical Journal Armed Forces India* **2018**; 74(1): 61-4.
23. Carreaux G, Maquart M, Bedet A, et al. Zika Virus Associated with Meningoencephalitis. *The New England journal of medicine* **2016**; 374(16): 1595-6.
24. Mecharles S, Herrmann C, Poullain P, et al. Acute myelitis due to Zika virus infection. *Lancet* **2016**; 387(10026): 1481.
25. Lanciotti RS, Calisher CH, Gubler DJ, Chang GJ, Vorndam AV. Rapid detection and typing of dengue viruses from clinical samples by using reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *Journal of clinical microbiology* **1992**; 30(3): 545-51.
26. Edwards CJ, Welch SR, Chamberlain J, et al. Molecular diagnosis and analysis of Chikungunya virus. *Journal of Clinical Virology* **2007**; 39(4): 271-5.
27. Balm MN, Lee CK, Lee HK, Chiu L, Koay ES, Tang JW. A diagnostic polymerase chain reaction assay for Zika virus. *Journal of medical virology* **2012**; 84(9): 1501-5.
28. Santos GPLd, Burlandy FM, Costa EVd, Silva EEd. Direct detection of enterovirus genome in cell-culture negative cerebrospinal fluid from aseptic meningitis cases in Brazil. *Virus Reviews and Research* **2012**; 17(1-2): 39-43.
29. Markoulatos P, Georgopoulou A, Siafakas N, Plakokefalos E, Tzanakaki G, Kourea-Kremastinou J. Laboratory diagnosis of common herpesvirus infections of the central nervous system by a multiplex PCR assay. *Journal of clinical microbiology* **2001**; 39(12): 4426-32.
30. IBM Corp. IBM SPSS Statistics for Windows, Version 21.0. Armonk, NY: IBM Corp, **2012**.
31. StataCorp. Stata Statistical Software: Release 10. College Station, TX: StataCorp LP, **2007**.
32. SVS. Secretaria de Vigilância em Saúde. Monitoramento dos casos de dengue e febre de chikungunya até a Semana Epidemiológica 20, 2015. Available at: <http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2015/junho/30/Monitoramento-dos-casos-de-dengue-e-febre-de-chikungunya-20.pdf>. Accessed 05/28/2018.
33. Ai J, Xie Z, Liu G, et al. Etiology and prognosis of acute viral encephalitis and meningitis in Chinese children: a multicentre prospective study. *BMC infectious diseases* **2017**; 17(1): 494.
34. Bastos MS, Lessa N, Naveca FG, et al. Detection of Herpesvirus, Enterovirus, and Arbovirus infection in patients with suspected central nervous system viral infection in the Western Brazilian Amazon. *Journal of medical virology* **2014**; 86(9): 1522-7.
35. Silva HR, Tanajura GM, Tavares-Neto J, et al. Síndrome da meningite asséptica por enterovírus e *Leptospira* sp em crianças de Salvador, Bahia. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* **2002**; 35: 159-65.
36. de Crom SC, van Furth MA, Peeters MF, Rossen JW, Obihara CC. Characteristics of pediatric patients with enterovirus meningitis and no cerebral fluid pleocytosis. *European journal of pediatrics* **2012**; 171(5): 795-800.
37. Azevedo Rdo S, Oliveira CS, Vasconcelos PF. Chikungunya risk for Brazil. *Revista de Saúde Pública* **2015**; 49: 58.
38. Teixeira MG, Andrade AM, Costa Mda C, et al. East/Central/South African genotype chikungunya virus, Brazil, 2014. *Emerging infectious diseases* **2015**; 21(5): 906-7.

39. Taraphdar D, Sarkar A, Mukhopadhyay BB, Chatterjee S. A comparative study of clinical features between monotypic and dual infection cases with Chikungunya virus and dengue virus in West Bengal, India. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* **2012**; 86(4): 720-3.
40. Chahar HS, Bharaj P, Dar L, Guleria R, Kabra SK, Broor S. Co-infections with chikungunya virus and dengue virus in Delhi, India. *Emerging infectious diseases* **2009**; 15(7): 1077-80.
41. da Silva IRF, Frontera JA, Bispo de Filippis AM, Nascimento O, Group R-G-ZR. Neurologic Complications Associated With the Zika Virus in Brazilian Adults. *JAMA neurology* **2017**; 74(10): 1190-8.
42. Nicastri E, Castilletti C, Balestra P, Galgani S, Ippolito G. Zika Virus Infection in the Central Nervous System and Female Genital Tract. *Emerging infectious diseases* **2016**; 22(12): 2228-30.
43. Pardigon N. Pathophysiological mechanisms of Flavivirus infection of the central nervous system. *Transfusion clinique et biologique : journal de la Societe francaise de transfusion sanguine* **2017**; 24(3): 96-100.
44. De Broucker T, Mailles A, Stahl JP. Neurological Presentation of Zika Virus Infection Beyond the Perinatal Period. *Current infectious disease reports* **2017**; 19(10): 35.
45. Schwartzmann PV, Ramalho LN, Neder L, et al. Zika Virus Meningoencephalitis in an Immunocompromised Patient. *Mayo Clinic proceedings* **2017**; 92(3): 460-6.
46. Carteaux G, Maquart M, Bedet A, et al. Zika Virus Associated with Meningoencephalitis. *The New England journal of medicine* **2016**; 374(16): 1595-6.
47. Dupuis M, Hull R, Wang H, et al. Molecular detection of viral causes of encephalitis and meningitis in New York State. *Journal of medical virology* **2011**; 83(12): 2172-81.
48. Leland DS, Ginocchio CC. Role of cell culture for virus detection in the age of technology. *Clinical microbiology reviews* **2007**; 20(1): 49-78.
49. Othman I, Volle R, Elargoubi A, et al. Enterovirus meningitis in Tunisia (Monastir, Mahdia, 2011-2013): identification of virus variants cocirculating in France. *Diagnostic Microbiology and Infectious Diseases* **2016**; 84(2): 116-22.
50. Xavier DR, Magalhaes MA, Gracie R, Reis IC, Matos VP, Barcellos C. Spatial-temporal diffusion of dengue in the municipality of Rio de Janeiro, Brazil, 2000-2013. *Cadernos de saude publica* **2017**; 33(2): e00186615.

## Tables

**Table 1. Demographic baseline data from patients with suspected viral meningitis attended Couto Maia Hospital, between July 2014 and February 2016, Salvador (BA), Brazil.**

Demographic baseline data	Total		
	N*	n	%
Gender	170		
Male		84	49.4
Female		86	50.6
Skin color/Ethnicity	167		
White		16	9.6
Brown		104	62.3
Black		43	25.7
Asian		1	0.6
Indigenous		3	1.8
Years of age	170		
≤ 5		41	24.1
6-10		17	10.0
11-15		20	11.8
16-20		15	8.8
21-30		24	14.1
31-40		22	12.9
41-50		16	9.4
> 50		15	8.8

Place of residence	169		
Greater Salvador	141	83.4	
Other cities	28	16.6	

---

\* Total varies according to data availability.



**Table 2. Viral diagnosis from patients with suspected viral meningitis who attended Couto Maia Hospital, between July 2014 and February 2016, Salvador (BA), Brazil.**

Viral diagnosis	Total (N = 170)	
	n	%
Overall	34	20.0
Arboviruses	26	15.3
Dengue vírus (DENV) <sup>*1</sup>	13	7.6
DENV1 <sup>*1</sup>	8	4.7
DENV2	0	0.0
DENV3	2	1.2
DENV4 <sup>*1</sup>	3	1.8
Chikungunya virus <sup>*1</sup>	6	3.5
Zika virus <sup>*1, *2</sup>	7	7.1
Co-infections	4	2.4
DENV1 + EV	1	0.6
DENV1 + CHIKV	1	0.6
DENV4 + ZIKV	1	0.6
CHIKV + ZIKV	1	0.6
Enterovirus <sup>*1</sup>	11	6.5
Human herpes virus <sup>*4</sup>	1	0.9
Herpes simplex virus 1	0	0.0
Herpes simplex virus 2	0	0.0
Varicela zoster virus	1	0.9

Epstein-Barr virus	0	0.0
Cytomegalovirus	0	0.0

---

<sup>\*1</sup> Total includes co-infection. <sup>\*2</sup> Zika virus detection was performed by ELISA. All the other positive cases were through molecular testing. <sup>\*3</sup> ZIKV positivity was based on 98 available samples for testing. <sup>\*4</sup> HHV PCR positivity was based on 107 available samples for testing. PCR: polymerase chain reaction; DENV: dengue virus; EV: Enterovirus; CHIKV: Chikungunya virus.

**Table 3. Clinical data stratified by PCR positivity from patients with suspected viral meningitis who attended Couto Maia Hospital, between July 2014 and February 2016, Salvador (BA), Brazil.**

Clinical data	Total			PCR+			PCR-		
	N*	n	%	N	n	%	N	n	%
Signs and symptoms of meningitis									
Fever	159	128	80.5	33	28	84.8	126	100	79.4
Headache	153	123	80.4	32	29	90.6	121	94	77.7
Vomiting	156	94	60.3	33	31	93.9	123	63	51.2
Neck pain	146	73	50.0	30	12	40.0	116	61	52.6
Neck rigidity	147	47	32.0	31	15	48.4	116	32	27.6
Nausea	137	50	36.5	26	11	42.3	111	39	35.1
Photophobia / photosensitivity	134	23	17.2	28	7	25.0	106	16	15.1
Neurological signs									
Somnolence	125	18	14.4	27	3	11.1	98	15	15.3
Altered state of consciousness	137	9	6.6	28	2	7.1	109	7	6.4
Seizures	134	11	8.2	27	4	14.8	107	7	6.5
Others									
Myalgia	130	33	25.4	27	9	33.3	103	24	23.3
Arthralgia	136	33	24.3	26	7	26.9	110	26	23.6
Retro-orbital pain	133	28	21.1	25	6	24.0	108	22	20.4
Diarrhea	148	24	16.2	29	3	10.3	119	21	17.6
Exanthema	130	7	5.4	28	1	3.6	102	6	5.9
Skin rash	128	3	2.3	26	1	3.8	102	2	2.0

\* Total varies according to data availability.

---

PCR+: patients who tested PCR positive for any of the studied viruses. PCR-: all the others. N: total number of responses; n: number of patients that responded “yes”.

**Table 4. Statistically significant prevalence ratios (PR) stratified by etiological agent from patients with suspected viral meningitis who attended Couto Maia Hospital, between July 2014 and February 2016, Salvador (BA), Brazil.**

Characteristics	Overall			Arbovirus			Zika vírus			Enterovirus		
	PR	IC 95%	p-value*	PR	IC 95%	p-value*	PR	IC 95%	p-value*	PR	IC 95%	p-value*
Years of age ≤ 15	1,33	0,73-2,42	ns	0,76	0,35-1,66	ns	1,57	0,36-6,81	ns	5,31	1,18-23,9	0,02
CSF aspect: slightly turbid or turbid	2,06	1,13-3,74	0,02	1,33	0,57-3,12	ns	9,83	1,91-46,56	0,005	3,14	1,02-9,70	0,04
CSF cell count > 5 cell/mm <sup>3</sup>	1,82	1,00-3,32	ns	1,32	0,62-2,81	ns	-	-	0,0007	2,57	0,76-8,73	ns
CSF cell count > 100 cell/mm <sup>3</sup>	1,88	1,01-3,53	ns	0,91	0,33-2,49	ns	3,25	0,77-13,76	ns	4,33	1,34-14,02	0,01
Neck rigidity	1,99	1,08-3,68	0,03	2,34	1,07-5,12	0,03	4,25	0,81-22,42	ns	1,42	0,42-4,79	Ns

\* p-value was calculated using Chi<sup>2</sup> or 2-sided Fisher's exact test when appropriate.

PR: prevalence ratio.

Dengue virus, chikungunya virus and varicella zoster virus did not present any statistically significant prevalence ratio and, therefore, were suppressed from the table

## Figure legend

**Figure 1. Number of suspected viral meningitis cases included in the study among patients who attended Couto Maia Hospital, between July 2014 and February 2016, Salvador (BA), Brazil.**

Figure

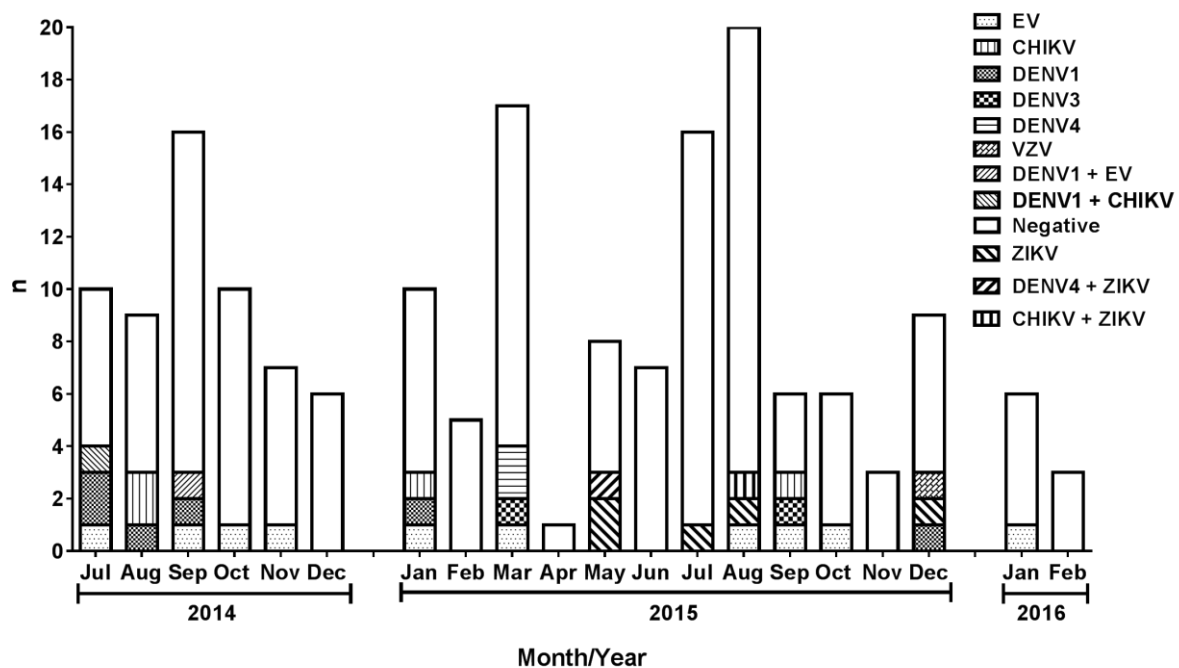


Figure 1.

## 7 DISCUSSÃO

Apesar de classicamente associados as doenças febris agudas, a inclusão dos arbovírus no diagnóstico diferencial de infecções do SNC tem sido considerada cada vez mais importante ao longo dos anos, especialmente em regiões endêmicas, visto que eles têm sido cada vez mais associados a manifestações neurológicas (SOLOMON et al., 2000; ACEVEDO et al., 2017; DE OLIVEIRA et al., 2017; MARINHO et al., 2017; PRADHAN et al., 2017).

A principal ferramenta para diagnóstico molecular é a PCR. Em síntese, a PCR permite amplificar um ácido nucléico alvo reconhecido por um par de *primers*. A escolha do alvo (conhecimento do genoma do organismo) e o desenho dos *primers* é a primeira etapa para o sucesso da técnica. A segunda, sem dúvidas, é a padronização e realização de experimentos de laboratório para determinar os melhores parâmetros da reação ( $T_a$ ,  $Mg^{++}$ , concentração dos *primers*, ciclos de reação, etc). Na maioria dos estudos que visam diagnosticar agentes infecciosos, o pesquisador utiliza *primers* e protocolos descritos na literatura sem criticar seu desempenho. Entretanto, esta abordagem pode ser considerada ingênua, sobretudo quando necessitamos detectar vírus de genoma RNA ou com uma fase intermediária RNA, pois estes agentes apresentam uma alta taxa de evolução intra-hospedeiro (quasiespécies virais), poucas regiões subgenômicas conservadas e, portanto, genomas heterogêneos (SAIKI et al., 1988; VAN BELKUM e NIESTERS, 1995; RATCLIFF et al., 2007; HUIZING et al., 2011).

Em outras palavras, mesmo que os protocolos disponíveis na literatura sejam bem referenciados, seria recomendável seguir um ritual de realizar a validação *in silico* dos *primers*, bem como, padronizar e validar os protocolos através de experimentos de laboratório localmente. A validação *in silico* dos *primers* consiste em determinar a sensibilidade dos mesmos frente a sequências referências disponíveis no Genbank, ou seja, a sensibilidade teórica presumida. Conforme a diversidade na região de hibridação de *primer*, pode-se incluir ambiguidades em sua sequência para torná-lo mais “universal”; no entanto, deve-se usar as ambiguidades com parcimônia, uma vez que o seu excesso pode comprometer a especificidade do *primer* (A. KUMAR e CHORDIA, 2015).

O protocolo de detecção e tipagem dos DENVs descritos por LANCIOTTI et al. (1992) já é amplamente utilizado na literatura, no entanto, os *primers* descritos



apresentaram, no geral, péssimo desempenho teórico e amplificação preferencial para o DENV1. Uma metodologia com desempenho inadequado pode comprometer a determinação de prevalência do agente pesquisado, e, dessa forma, levar a um subdimensionamento do problema estudado. Dessa maneira, foram desenvolvidos, e também testados *in silico*, *primers* com bases degeneradas, a fim de melhorar os valores previamente obtidos. Por fim, alcançamos uma sensibilidade presumida de pelo menos 75% para quase a totalidade das reações. Não são esperadas reações cruzadas entre os vírus e os pares de *primers* para os quais eles não se destinam.

Para situações nas quais apenas um dos *primers* propostos pelas publicações tem um bom desempenho, existem duas alternativas. A primeira é propor alterações nos *primers* originais e refazer a sua avaliação, para verificar se houve melhora, tal como foi feito para os *primers* dos DENVs neste trabalho. Além disso, existem ferramentas cuja proposta é desenhar *primers* novos, tais como o Primer3web (<http://bioinfo.ut.ee/primer3/>). Esta ferramenta toma como base uma sequência referência, além de também poder usar o *primer* com bom desempenho, e propõe um *primer* novo no sentido contrário (A. KUMAR e CHORDIA, 2015).

Curiosamente, a sensibilidade *in silico* dos *primers* para CHIKV e ZIKV apresentaram sensibilidade diferencial que poderia representar falha no diagnóstico. No entanto, estes protocolos tem sido utilizados com sucesso por diversos autores e pelos colaboradores deste estudo. Isto ocorre porque o anelamento dos *primers* é dependente não somente da complementaridade entre as sequências, mas também dos parâmetros da PCR. Além disso, *mismatches* na extremidade 3' do *primer* tendem ser críticos para o anelamento, e aqueles encontrados no *primers* para CHIKV e ZIKV foram localizados no região 5' ou no meio no meio da sequência, como visto para o CHIK2 (SIMSEK e ADNAN, 2000).

A análise do protocolo para os EVs teve bons resultados, para eles foram puxados um pouco para baixo devido aos *Rhinovirus*, grupo que não é de interesse neste estudo, mas que pertence ao mesmo gênero. Especificamente para o grupo dos EVs, os valores ultrapassaram os 90,0% em três do quatro *primers*, e o quarto ficou acima dos 70,0%. Entre os HHVs, os *primers* para o CMV foram os que tiveram o pior desempenho (44,4% e 77,8%). Assim como para os DENVs, não é esperada nenhuma reação cruzada entre os HHVs.

A realização da avaliação teórica, *in silico*, dos *primers* é uma etapa preliminar importante, pois permite analisar a qualidade de anelamento destes frente a

sequências de amostras já depositadas no GenBank, e desta formar, estimar de que maneira eles se comportarão em relação às amostras do estudo em questão.

No entanto, muitas vezes esta etapa é negligenciada, e isso causa impactos na execução dos experimentos, visto que os *primers* podem ter um desempenho ruim ou ainda ser inapropriados para atender ao objetivo do estudo.

Em conclusão, a padronização dos testes moleculares requer conhecimento sobre o genoma viral e os alvos mais conservados para o desenho dos *primers*. Conforme o grupo pesquisado pode não ser possível padronizar um Pan-PCR e a solução deverá ser múltiplos PCR, um para cada membro do grupo, ou uma PCR multiplex. A validação dos métodos laboratoriais é crucial o diagnóstico acurado dos agentes etiológicos que serão encontrados na pesquisa epidemiológica, em última análise, possibilitando a estimativa da prevalência dos agravos de interesse.

Este trabalho também teve como objetivos identificar a frequência dos vírus responsáveis por casos de meningite nos pacientes atendidos no Hospital Couto Maia-BA e descrever o seu perfil clinicoepidemiológico.

A taxa de detecção deste estudo foi baixa (20,0%), mas dentro do intervalo encontrado na literatura (TAN *et al.*, 2010; DUPUIS *et al.*, 2011; AI *et al.*, 2017; DE OLIVEIRA *et al.*, 2017; SHUKLA *et al.*, 2017). Isso pode ter sido um reflexo do comportamento viral em doenças agudas, nas quais a janela para detecção do vírus é de apenas alguns dias. Por outro lado, os pacientes deste estudo apresentaram sintomas por uma mediana de 3 dias antes de procurar atendimento médico. ACEVEDO *et al.* (2017) conseguiram detectar RNA viral até 14 dias após o início dos sintomas.

Na literatura, as taxas de detecção dos vírus incluídos neste estudo são bastante variáveis, no entanto, os achados apresentados aqui não diferem dos dados já previamente relatados. É importante chamar a atenção para os casos de meningite por DENV, mesmo na ausência dos sinais clássicos da doença febril aguda (SOLOMON *et al.*, 2000; MARINHO *et al.*, 2017), bem como para os casos de meningite por EV mesmo na ausência de pleocitose bem como outros achados normais (DE CROM *et al.*, 2012; DAWOOD *et al.*, 2014).

Em concordância com relatos de meningite e encefalite causadas pelo ZIKV (CARTEAUX *et al.*, 2016; DA SILVA *et al.*, 2017; PRADHAN *et al.*, 2017; SCHWARTZMANN *et al.*, 2017), tivemos 7 (7,1%) amostras positivas para este vírus.

A identificação dos dois primeiros casos de CHIKV em agosto de 2014, um em Amargosa e o outro em Salvador, mostra que a dispersão do vírus, considerando que o caso-índice procurou atendimento médico em maio em Feira de Santana (AZEVEDO RDO *et al.*, 2015; NUNES *et al.*, 2015; TEIXEIRA *et al.*, 2015).

Coinfecções envolvendo diferentes arbovírus não são raras (CHAHAR *et al.*, 2009; TARAPHDAR *et al.*, 2012; ACEVEDO *et al.*, 2017), mas esta é o primeiro relato de uma coinfecção com o DENV e o EV. Além disso, não está claro qual o impacto dessas coinfecções, e de que maneira elas podem contribuir com a severidade da doença ou o seu desfecho.

Poucas variáveis tiveram relevância estatística, isso pode ser em decorrência do nosso pequeno número de casos, mas também reflete o fato das meningites virais serem normalmente mais leves do que as bacterianas, e os pacientes terem um quadro leve, muito próximo de um indivíduo sadio.

## **8 CONCLUSÕES**

Assegurada a qualidade dos métodos de laboratório, foi possível reconhecer que os arbovírus são os principais agentes etiológicos das meningites virais em uma unidade de saúde de referência em Salvador-BA.

## 9 RISCOS E DIFICULDADES

O principal problema para a execução deste estudo está na obtenção de amostras com um padrão de qualidade para o diagnóstico. Por esta razão, realizaremos reuniões com a equipe médica para providenciar o congelamento das amostras em até 1 h a partir da coleta. Amostras que não preencherem este padrão serão excluídas do estudo.

Outros aspectos dizem respeito à validação dos métodos moleculares e ao sigilo e proteção dos dados. A validação dos métodos moleculares pode demorar e não apresentar a qualidade desejada. Para minimizar esta possibilidade, utilizamos métodos já descritos na literatura ou baseados em experiências de colaboradores em outras unidades da FIOCRUZ. Quanto à garantia de sigilo e proteção dos dados, após a coleta e identificação da amostra, o material foi encaminhado diretamente ao laboratório. Os dados pessoais dos participantes, bem como os resultados laboratoriais, foram lançados em um sistema de banco de dados protegido por senha e com acesso restrito.

## 10 LIMITAÇÕES DO ESTUDO

Este estudo apresenta algumas limitações. Devido à sintomatologia leve classicamente associada aos casos de meningite viral, pacientes com esta condição podem ter se apresentado com um quadro subclínico ou apenas uma sintomatologia leve. Na ausência dos indícios associados à meningite, eles podem até mesmo não procurar atendimento médico, o que gera subnotificação deste agravo, além de ter gerado perdas no tamanho amostral.

Também comprometeu o nosso tamanho amostral o fato das coletas serem feitas apenas no período diurno, diante da não autorização do estudantes a estarem no hospital durante as noites.

Metodologicamente, embora os sistema de isolamento viral tenha uma taxa de detecção menor do que a PCR, a combinação de ambas as técnicas poderia ter aumentado o número de casos, especialmente nas situações com baixa carga viral. No entanto, esta ferramenta diagnóstica estava indisponível.

## REFERÊNCIAS

- ACEVEDO, N. et al. Zika Virus, Chikungunya Virus, and Dengue Virus in Cerebrospinal Fluid from Adults with Neurological Manifestations, Guayaquil, Ecuador. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, p. 42, 2017.
- AI, J. et al. Etiology and prognosis of acute viral encephalitis and meningitis in Chinese children: a multicentre prospective study. **BMC Infectious Diseases**, v. 17, n. 1, p. 494, 2017.
- ALBUQUERQUE, I. G. et al. Chikungunya virus infection: report of the first case diagnosed in Rio de Janeiro, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 45, n. 1, p. 128-129, 2012.
- APPASSAKIJ, H. et al. Viremic profiles in asymptomatic and symptomatic chikungunya fever: a blood transfusion threat? **Transfusion**, v. 53, n. 10 Pt 2, p. 2567-2574, 2013.
- ARANKALLE, V. A. et al. Genetic divergence of Chikungunya viruses in India (1963-2006) with special reference to the 2005-2006 explosive epidemic. **The Journal of General Virology**, v. 88, n. Pt 7, p. 1967-1976, 2007.
- AZEVEDO RDO, S.; OLIVEIRA, C. S.; VASCONCELOS, P. F. Chikungunya risk for Brazil. **Revista de Saúde Pública**, v. 49, n., p. 58, 2015.
- BALM, M. N. et al. A diagnostic polymerase chain reaction assay for Zika virus. **Journal of Medical Virology**, v. 84, n. 9, p. 1501-1505, 2012.
- BANNIETTIS, N. et al. Diagnostic Practices for Suspected Community-Acquired Central Nervous System Infection in the Post-Conjugate Vaccine Era. **Pediatric Emergency Care**, v., n., p., 2017.
- BASTOS, M. S. et al. Detection of Herpesvirus, Enterovirus, and Arbovirus infection in patients with suspected central nervous system viral infection in the Western Brazilian Amazon. **Journal of Medical Virology**, v. 86, n. 9, p. 1522-1527, 2014.
- BECKHAM, J. D.; TYLER, K. L. Arbovirus Infections. **Continuum (Minneap. Minn.)**, v. 21, n. 6 Neuroinfectious Disease, p. 1599-1611, 2015.
- BELOGUROV, A. A., JR. et al. Mediators and Biomarkers of Inflammation in Meningitis: Cytokine and Peptidome Profiling of Cerebrospinal Fluid. **Biochemistry (Mosc.)**, v. 81, n. 11, p. 1293-1302, 2016.
- BESNARD, M. et al. Congenital cerebral malformations and dysfunction in fetuses and newborns following the 2013 to 2014 Zika virus epidemic in French Polynesia. **Euro. Surveill.**, v. 21, n. 13, p., 2016.

- BORGHERINI, G. et al. Outbreak of chikungunya on Reunion Island: early clinical and laboratory features in 157 adult patients. **Clinical Infectious Diseases**, v. 44, n. 11, p. 1401-1407, 2007.
- BRASIL. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. **Dengue: diagnóstico e manejo clínico. Adulto e criança**. Brasília: Ministério da Saúde, 2016.
- BRASIL, P. et al. Zika Virus Infection in Pregnant Women in Rio de Janeiro. **The New England Journal of Medicine**, v. 375, n. 24, p. 2321-2334, 2016.
- BRASIL, P. et al. Guillain-Barre syndrome associated with Zika virus infection. **Lancet**, v. 387, n. 10026, p. 1482, 2016.
- BRIGHTON, S. W.; PROZESKY, O. W.; DE LA HARPE, A. L. Chikungunya virus infection. A retrospective study of 107 cases. **South African Medical Journal**, v. 63, n. 9, p. 313-315, 1983.
- BRITO, C. A. A. et al. Central and peripheral nervous system involvement caused by Zika and chikungunya coinfection. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 11, n. 7, p. e0005583, 2017.
- CABRAL, C. M. et al. Clinical-epidemiological description of live births with microcephaly in the state of Sergipe, Brazil, 2015. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 26, n. 2, p. 245-254, 2017.
- CAMPOS, G. S.; BANDEIRA, A. C.; SARDI, S. I. Zika Virus Outbreak, Bahia, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 21, n. 10, p. 1885-1886, 2015.
- CAO-LORMEAU, V. M. et al. Guillain-Barre Syndrome outbreak associated with Zika virus infection in French Polynesia: a case-control study. **Lancet**, v. 387, n. 10027, p. 1531-1539, 2016.
- CARDOSO, C. W. et al. Outbreak of Exanthematous Illness Associated with Zika, Chikungunya, and Dengue Viruses, Salvador, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 21, n. 12, p. 2274-2276, 2015.
- CAROD-ARTAL, F. J. et al. Neurological complications of dengue virus infection. **The Lancet. Neurology**, v. 12, n. 9, p. 906-919, 2013.
- CARTEAUX, G. et al. Zika Virus Associated with Meningoencephalitis. **The New England Journal of Medicine**, v. 374, n. 16, p. 1595-1596, 2016.
- CHAHAR, H. S. et al. Co-infections with chikungunya virus and dengue virus in Delhi, India. **Emerging Infectious Diseases**, v. 15, n. 7, p. 1077-1080, 2009.
- CHAMBERS, T. J. et al. Flavivirus genome organization, expression, and replication. **Annual Review of Microbiology**, v. 44, p. 649-688, 1990.



- CHEN, P. et al. A coxsackievirus B5-associated aseptic meningitis outbreak in Shandong Province, China in 2009. **Journal of Medical Virology**, v. 85, n. 3, p. 483-489, 2013.
- CHOI, Y. J. et al. Molecular characterization of echovirus 30-associated outbreak of aseptic meningitis in Korea in 2008. **Journal of Microbiology Biotechnology**, v. 20, n. 3, p. 643-649, 2010.
- CHUSRI, S. et al. Case reports of neuro-Chikungunya in southern Thailand. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 85, n. 2, p. 386-389, 2011.
- CORDEIRO, M. T. et al. Positive IgM for Zika virus in the cerebrospinal fluid of 30 neonates with microcephaly in Brazil. **Lancet**, v. 387, n. 10030, p. 1811-1812, 2016.
- DA SILVA, I. R. F. et al. Neurologic Complications Associated With the Zika Virus in Brazilian Adults. **JAMA Neurology**, v. 74, n. 10, p. 1190-1198, 2017.
- DAMIANI, D.; FURLAN, M. C.; DAMIANI, D. Meningite asséptica. **Revista Brasileira de Clínica Médica**, v. 10, n. 1, p. 46-50, 2012.
- DAVIDSON, S. et al. **Davidson's Principles and Practices of Medicine**. Edinburgh: Churchill Livingstone/Elsevier, 2014
- DAWOOD, N. et al. Confirmed viral meningitis with normal CSF findings. **BMJ Case Reports**, 2014.
- DE BROUCKER, T.; MAILLES, A.; STAHL, J. P. Neurological Presentation of Zika Virus Infection Beyond the Perinatal Period. **Current Infectious Disease Reports**, v. 19, n. 10, p. 35, 2017.
- DE CROM, S. C. et al. Characteristics of pediatric patients with enterovirus meningitis and no cerebral fluid pleocytosis. **European Journal of Pediatrics**, v. 171, n. 5, p. 795-800, 2012.
- DE LAMBALLERIE, X. et al. Chikungunya virus adapts to tiger mosquito via evolutionary convergence: a sign of things to come? **Virology Journal**, v. 5, p. 33, 2008.
- DE OLIVEIRA, D. B. et al. Etiological agents of viral meningitis in children from a dengue-endemic area, Southeast region of Brazil. **Journal of the Neurological Sciences**, v. 375, p. 390-394, 2017.
- DOHERTY, C. M.; FORBES, R. B. Diagnostic Lumbar Puncture. **The Ulster Medical Journal**, v. 83, n. 2, p. 93-102, 2014.
- DUBOS, F. et al. [Distinction between bacterial and aseptic meningitis in children: refinement of a clinical decision rule]. **Archives de Pédiatrie**, v. 14, n. 5, p. 434-438, 2007.

- DUFFY, M. R. et al. Zika virus outbreak on Yap Island, Federated States of Micronesia. **The New England Journal of Medicine**, v. 360, n. 24, p. 2536-2543, 2009.
- DUPUIS, M. et al. Molecular detection of viral causes of encephalitis and meningitis in New York State. **Journal of Medical Virology**, v. 83, n. 12, p. 2172-2181, 2011.
- ECONOMOPOULOU, A. et al. Atypical Chikungunya virus infections: clinical manifestations, mortality and risk factors for severe disease during the 2005-2006 outbreak on Reunion. **Epidemiology and Infection**, v. 137, n. 4, p. 534-541, 2009.
- EDWARDS, C. J. et al. Molecular diagnosis and analysis of Chikungunya virus. **Journal of Clinical Virology**, v. 39, n. 4, p. 271-275, 2007.
- ENFISSI, A. et al. Zika virus genome from the Americas. **Lancet**, v. 387, n. 10015, p. 227-228, 2016.
- FARIAS, A. et al. Molecular identification of human enteroviruses in children with neurological infections from the central region of Argentina. **Archives of Virology**, v. 156, n. 1, p. 129-133, 2011.
- FAYE, O. et al. Molecular evolution of Zika virus during its emergence in the 20(th) century. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 1, p. e2636, 2014.
- FDA. **Zika MAC-ELISA (CDC) Emergency Use Authorization Letter**. Department of Health and Human Services. 2016. Disponível em: <https://www.fda.gov/downloads/MedicalDevices/Safety/EmergencySituations/UCM488040.pdf>. Acesso em: 18 fev 2018.
- FRY, S. R. et al. The diagnostic sensitivity of dengue rapid test assays is significantly enhanced by using a combined antigen and antibody testing approach. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 5, n. 6, p. e1199, 2011.
- GALÁN-HUERTA, K. A. et al. Chikungunya virus: A general overview. **Medicina Universitaria**, v. 17, n. 68, p. 175-183, 2015.
- GALÁN-HUERTA, K. A. et al. The Zika virus disease: An overview. **Medicina Universitaria**, v. 18, n. 71, p. 115-124, 2016.
- GALLIEZ, R. M. et al. Zika Virus Causing Encephalomyelitis Associated With Immunoactivation. **Open Forum Infectious Diseases**, v. 3, n. 4, p. ofw203, 2016.
- GANESAN, K. et al. Chikungunya encephalomyeloradiculitis: report of 2 cases with neuroimaging and 1 case with autopsy findings. **AJNR. American Journal of Neuroradiology**, v. 29, n. 9, p. 1636-1637, 2008.
- GARCIA-HERNANDEZ, P. et al. Interleukin-6 in cerebrospinal fluid as a biomarker of acute meningitis. **Annals of Clinical Biochemistry**, v. 53, n. Pt 1, p. 155-163, 2016.

GERARDIN, P. et al. Perceived morbidity and community burden after a Chikungunya outbreak: the TELECHIK survey, a population-based cohort study. **BMC Medicine**, v. 9, n., p. 5, 2011.

GOLDMAN, L.; AUSIELLO, D. **Cecil Medicina**. Rio de Janeiro: Elsevier. 2011

GUZMAN, M. G. et al. Dengue: a continuing global threat. **Nature Reviews. Microbiology**, v. 8, n. 12 Suppl, p. S7-16, 2010.

HASBUN, R. et al. Epidemiology of Meningitis and Encephalitis in the United States, 2011-2014. **Clinical Infectious Diseases**, v. 65, n. 3, p. 359-363, 2017.

HENRY, B. M. et al. Procalcitonin as a Serum Biomarker for Differentiation of Bacterial Meningitis From Viral Meningitis in Children: Evidence From a Meta-Analysis. **Clinical Pediatrics**, v. 55, n. 8, p. 749-764, 2016.

HEUKELBACH, J. et al. Zika virus outbreak in Brazil. **Journal of Infectious in Developing Countries**, v. 10, n. 2, p. 116-120, 2016.

HUIZING, K. M. et al. Rapid enterovirus molecular testing in cerebrospinal fluid reduces length of hospitalization and duration of antibiotic therapy in children with aseptic meningitis. **The Pediatric Infectious Disease Journal**, v. 30, n. 12, p. 1107-1109, 2011.

ICTV. **Virus Taxonomy: 2012 Release**. Leuven, Belgium: International Committee on Taxonomy of Viruses. 2012. Disponível em: <http://ictvonline.org/virusTaxonomy.asp>. Acesso em: 11 set 2013.

\_\_\_\_\_. **Virus Taxonomy: 2016 Release**. Leuven, Belgium: International Committee on Taxonomy of Viruses. 2016. Disponível em: <https://talk.ictvonline.org/taxonomy/>. Acesso em: 12 fev 2018.

JACKSON, S. T. et al. Dengue infection in patients presenting with neurological manifestations in a dengue endemic population. **The West Indian Medical Journal**, v. 57, n. 4, p. 373-376, 2008.

KAMINSKI, M. et al. The spectrum of aseptic central nervous system infections in southern Germany - demographic, clinical and laboratory findings. **European Journal of Neurology**, v. 24, n. 8, p. 1062-1070, 2017.

KIM, H. J. et al. Epidemics of viral meningitis caused by echovirus 6 and 30 in Korea in 2008. **Virology Journal**, v. 9, p. 38, 2012.

KNIPE, D. M.; HOWLEY, P. M. **Fields Virology**. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2013.

KUMAR, A.; CHORDIA, N. In silico PCR primer designing and validation. **Methods in Molecular Biology**, v. 1275, n., p. 143-151, 2015.

KUMAR, R. Aseptic meningitis: diagnosis and management. **Indian Journal of Pediatrics**, v. 72, n. 1, p. 57-63, 2005.

- KUNO, G.; CHANG, G. J. Full-length sequencing and genomic characterization of Bagaza, Kedougou, and Zika viruses. **Archives of Virology**, v. 152, n. 4, p. 687-696, 2007.
- KUPILA, L. et al. Recurrent lymphocytic meningitis: the role of herpesviruses. **Archives of Neurology**, v. 61, n. 10, p. 1553-1557, 2004.
- LANCIOTTI, R. S. et al. Rapid detection and typing of dengue viruses from clinical samples by using reverse transcriptase-polymerase chain reaction. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 30, n. 3, p. 545-551, 1992.
- LANCIOTTI, R. S. et al. Chikungunya virus in US travelers returning from India, 2006. **Emerging Infectious Diseases**, v. 13, n. 5, p. 764-767, 2007.
- LANCIOTTI, R. S. et al. Genetic and serologic properties of Zika virus associated with an epidemic, Yap State, Micronesia, 2007. **Emerging Infectious Diseases**, v. 14, n. 8, p. 1232-1239, 2008.
- LEWTHWAITE, P. et al. Chikungunya virus and central nervous system infections in children, India. **Emerging Infectious Diseases**, v. 15, n. 2, p. 329-331, 2009.
- LI, X.-F. et al. Complete Genome Sequence of a Chikungunya Virus Isolated in Guangdong, China. **Journal of Virology**, v. 86, n. 16, p. 8904-8905, 2012.
- LIN, J. Y. et al. Viral and host proteins involved in picornavirus life cycle. **Journal of Biomedical Science**, v. 16, p. 103, 2009.
- LOGAN, S. A.; MACMAHON, E. Viral meningitis. **BMJ**, v. 336, n. 7634, p. 36-40, 2008.
- LOHITHARAJAH, J. et al. Viral aetiologies of acute encephalitis in a hospital-based South Asian population. **BMC Infectious Diseases**, v. 17, n. 1, p. 303, 2017.
- LONGO et al. **Medicina Interna de Harrison**. Porto Alegre: AMGH, 2013. v.1
- MACHADO, B. C. et al. Aseptic meningitis by echovirus 30 in Sao Paulo State, Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 38, n. 1, p. 97-103, 2007.
- MARINHO, P. E. et al. Meningitis Associated with Simultaneous Infection by Multiple Dengue Virus Serotypes in Children, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 23, n. 1, p. 115-118, 2017.
- MARKOULATOS, P. et al. Laboratory diagnosis of common herpesvirus infections of the central nervous system by a multiplex PCR assay. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, n. 12, p. 4426-4432, 2001.
- MARTINEZ, A. A. et al. Molecular diagnosis of echovirus 30 as the etiological agent in an outbreak of aseptic meningitis in Panama: May-June 2008. **Journal of Infectious in Developing Countries**, v. 6, n. 12, p. 836-841, 2012.

- MEANEY-DELMAN, D. et al. Zika Virus Infection Among U.S. Pregnant Travelers - August 2015-February 2016. **MMWR. Morbidity and Mortality Weekly Report**, v. 65, n. 8, p. 211-214, 2016.
- MECHARLES, S. et al. Acute myelitis due to Zika virus infection. **Lancet**, v. 387, n. 10026, p. 1481, 2016.
- MIYOSHI, M. et al. Genomic characterization of echovirus 6 causing aseptic meningitis in Hokkaido, Japan: a novel cluster in the nonstructural protein coding region of human enterovirus B. **Archives of Virology**, v. 158, n. 4, p. 775-784, 2013.
- MUNOZ, L. S. et al. Neurological Implications of Zika Virus Infection in Adults. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 216, n. suppl 10, p. S897-S905, 2017.
- MUSSO, D.; GUBLER, D. J. Zika Virus. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 29, n. 3, p. 487-524, 2016.
- MUSTAFA, M. S.; RAMASETHU, R. Zika: An enormous public health challenge for a miniscule virus. **Medical Journal Armed Forces India**, v. 74, n. 1, p. 61-64, 2018.
- NAZIR, M. et al. Cerebrospinal fluid lactate: a differential biomarker for bacterial and viral meningitis in children. **Jornal de Pediatria**, v. 94, n. 1, p. 88-92, 2018.
- NELSON, J. et al. Encephalitis caused by Chikungunya virus in a traveler from the Kingdom of Tonga. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 52, n. 9, p. 3459-3461, 2014.
- NICASTRI, E. et al. Zika Virus Infection in the Central Nervous System and Female Genital Tract. **Emerging Infectious Diseases**, v. 22, n. 12, p. 2228-2230, 2016.
- NINOVE, L. et al. Comparative detection of enterovirus RNA in cerebrospinal fluid: GeneXpert system vs. real-time RT-PCR assay. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 17, n. 12, p. 1890-1894, 2011.
- NIX, W. A.; OBERSTE, M. S.; PALLANSCH, M. A. Sensitive, seminested PCR amplification of VP1 sequences for direct identification of all enterovirus serotypes from original clinical specimens. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, n. 8, p. 2698-2704, 2006.
- NOLTE, F. S. et al. Evaluation of a rapid and completely automated real-time reverse transcriptase PCR assay for diagnosis of enteroviral meningitis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 49, n. 2, p. 528-533, 2011.
- NUNES, M. R. et al. Emergence and potential for spread of Chikungunya virus in Brazil. **BMC Medicine**, v. 13, p. 102, 2015.
- OEHLER, E. et al. Zika virus infection complicated by Guillain-Barre syndrome--case report, French Polynesia, December 2013. **Euro. Surveill.**, v. 19, n. 9, p., 2014.

OSANAI, C. H. et al. Dengue outbreak in Boa Vista, Roraima. Preliminary report. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 25, n. 1, p. 53-54, 1983.

OTHMAN, I. et al. Enterovirus meningitis in Tunisia (Monastir, Mahdia, 2011-2013): identification of virus variants cocirculating in France. **Diagnostic Microbiology and Infectious Diseases**, v. 84, n. 2, p. 116-122, 2016.

PAHO. **CHIKV Surveillance in The Americas: Detection and laboratory diagnosis**. 2014. Disponível em: [http://www.paho.org/hq/index.php?option=com\\_docman&task=doc\\_download&Itemid=270&gid=23978&lang=en](http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_docman&task=doc_download&Itemid=270&gid=23978&lang=en). Acesso em: 12 fev 2018.

\_\_\_\_\_. **Zika Resources: Case Definitions**. Pan American Health Organization. 2016. Disponível em: [http://www.paho.org/hq/index.php?option=com\\_content&view=article&id=11117%3Azika-resources-case-definitions-&catid=8424%3Acontents&Itemid=41532&lang=en](http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=11117%3Azika-resources-case-definitions-&catid=8424%3Acontents&Itemid=41532&lang=en). Acesso em: 18 fev 2018.

PANNING, M. et al. Chikungunya fever in travelers returning to Europe from the Indian Ocean region, 2006. **Emerging Infectious Diseases**, v. 14, n. 3, p. 416-422, 2008.

PARDIGON, N. Pathophysiological mechanisms of Flavivirus infection of the central nervous system. **Transfus Clin Biol**, v. 24, n. 3, p. 96-100, 2017.

PATTERSON, J.; SAMMON, M.; GARG, M. Dengue, Zika and Chikungunya: Emerging Arboviruses in the New World. **The Western Journal of Emergency Medicine**, v. 17, n. 6, p. 671-679, 2016.

POWERS, A. M. et al. Re-emergence of Chikungunya and O'nyong-nyong viruses: evidence for distinct geographical lineages and distant evolutionary relationships. **The Journal of General Virology**, v. 81, n. Pt 2, p. 471-479, 2000.

POWERS, A. M.; LOGUE, C. H. Changing patterns of chikungunya virus: re-emergence of a zoonotic arbovirus. **The Journal of General Virology**, v. 88, n. Pt 9, p. 2363-2377, 2007.

PRADHAN, F. et al. Case Report: Zika Virus Meningoencephalitis and Myelitis and Associated Magnetic Resonance Imaging Findings. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 97, n. 2, p. 340-343, 2017.

PUCCIONI-SOHLER, M. et al. Dengue infection in the nervous system: lessons learned for Zika and Chikungunya. **Arquivos de Neuropsiquiatria**, v. 75, n. 2, p. 123-126, 2017.

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

- PUTZ, K.; HAYANI, K.; ZAR, F. A. Meningitis. **Primary Care**, v. 40, n. 3, p. 707-726, 2013.
- RACANIELLO, V. R. Picornaviridae: The viruses and their replication. In: KNIPE, D. M., et al. (Ed.). **Field's Virology**. 5th ed., Philadelphia, PA: Lippincott Williams and Wilkins, 2007. p. 795-838.
- RAMERS, C. et al. Impact of a diagnostic cerebrospinal fluid enterovirus polymerase chain reaction test on patient management. **JAMA - Journal of the American Medical Association**, v. 283, n. 20, p. 2680-2685, 2000.
- RASMUSSEN, S. A. et al. Zika Virus and Birth Defects--Reviewing the Evidence for Causality. **The New England Journal of Medicine**, v. 374, n. 20, p. 1981-1987, 2016.
- RATCLIFF, R. M. et al. Molecular diagnosis of medical viruses. **Current Issues in Molecular Biology**, v. 9, n. 2, p. 87-102, 2007.
- REDZIC, Z. B. et al. The choroid plexus-cerebrospinal fluid system: from development to aging. **Current Topics in Developmental Biology**, v. 71, p. 1-52, 2005.
- RIBEIRO, I. G. et al. Microcephaly in Piauí, Brazil: descriptive study during the Zika virus epidemic, 2015-2016. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 27, n. 1, p. e20163692, 2018.
- ROBIN, S. et al. Neurologic manifestations of pediatric chikungunya infection. **Journal of Child Neurology**, v. 23, n. 9, p. 1028-1035, 2008.
- RODRIGUES FARIA, N. et al. Epidemiology of Chikungunya Virus in Bahia, Brazil, 2014-2015. **PLoS Currents**, v. 8, p., 2016.
- ROTH, W. et al. Encephalomyelitis Following Definitive Zika Virus Infection. **Neurology Neuroimmunology & Neuroinflammation**, v. 4, n. 4, p. e349, 2017.
- ROZE, B. et al. Zika virus detection in cerebrospinal fluid from two patients with encephalopathy, Martinique, February 2016. **Euro. Surveill.**, v. 21, n. 16, 2016.
- SADEGHI, F. et al. Human enteroviruses in cerebrospinal fluid of children with suspected aseptic meningitis: A study in northern Iran. **Caspian Journal of Internal Medicine**, v. 8, n. 2, p. 112-115, 2017.
- SAHADEO, N. S. D. et al. Understanding the evolution and spread of chikungunya virus in the Americas using complete genome sequences. **Virus Evolution**, v. 3, n. 1, p. vex010, 2017.
- SAIKI, R. K. et al. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. **Science**, v. 239, n. 4839, p. 487-491, 1988.

- SAMRA, J. A. et al. Clinical Features and Neurologic Complications of Children Hospitalized With Chikungunya Virus in Honduras. **Journal of Child Neurology**, v. 32, n. 8, p. 712-716, 2017.
- SANTOS, G. P. L. D. et al. Direct detection of enterovirus genome in cell-culture negative cerebrospinal fluid from aseptic meningitis cases in Brazil. **Virus Reviews and Research**, v. 17, n. 1-2, p. 39-43, 2012.
- SARNO, M. et al. Zika Virus Infection and Stillbirths: A Case of Hydrops Fetalis, Hydranencephaly and Fetal Demise. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 2, p. e0004517, 2016.
- SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE DE SÃO PAULO. Divisão de Doenças de Transmissão Respiratória do Centro de Vigilância Epidemiológica "Professor Alexandre Vranjac". Meningites virais. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v. 40, n. 4, p. 748-750, 2006.
- SCHUFFENECKER, I. et al. Genome microevolution of chikungunya viruses causing the Indian Ocean outbreak. **PLoS Medicine**, v. 3, n. 7, p. e263, 2006.
- SCHULER-FACCINI, L. et al. Possible Association Between Zika Virus Infection and Microcephaly - Brazil, 2015. **MMWR. Morbidity and Mortality Weekly Report**, v. 65, n. 3, p. 59-62, 2016.
- SCHWARTZ, O.; ALBERT, M. L. Biology and pathogenesis of chikungunya virus. **Nature Reviews. Microbiology**, v. 8, n. 7, p. 491-500, 2010.
- SCHWARTZMANN, P. V. et al. Zika Virus Meningoencephalitis in an Immunocompromised Patient. **Mayo Clinic Proceedings**, v. 92, n. 3, p. 460-466, 2017.
- SHUKLA, B. et al. Aseptic meningitis in adults and children: Diagnostic and management challenges. **Journal of Clinical Virology**, v. 94, n., p. 110-114, 2017.
- SILVA, H. R. et al. Síndrome da meningite asséptica por enterovírus e *Leptospira* sp em crianças de Salvador, Bahia. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 35, n., p. 159-165, 2002.
- SIMSEK, M.; ADNAN, H. Effect of single mismatches at 3'-end of primers on polymerase chain reaction. **Journal for Scientific Research. Medical Sciences**, v. 2, n. 1, p. 11-14, 2000.
- SINAN. Doenças e Agravos de Notificação - De 2007 em diante. Meningite. Brazilian Health Ministry: Disponível em: <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/deftohtm.exe?sinannet/cnv/meninbr.def>. Acesso em: nov 2017.
- SOARES, C. N. et al. Fatal encephalitis associated with Zika virus infection in an adult. **Journal of Clinical Virology**, v. 83, p. 63-65, 2016.



- SOARES, C. N. et al. Review of the etiologies of viral meningitis and encephalitis in a dengue endemic region. **Journal of the Neurological Sciences**, v. 303, n. 1-2, p. 75-79, 2011.
- SOARES, C. N. et al. Meningitis determined by oligosymptomatic dengue virus type 3 infection: report of a case. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 14, n. 2, p. e150-152, 2010.
- SOLOMON, T. et al. Neurological manifestations of dengue infection. **Lancet**, v. 355, n. 9209, p. 1053-1059, 2000.
- SOUZA, W. V. et al. Microcephaly epidemic related to the Zika virus and living conditions in Recife, Northeast Brazil. **BMC Public Health**, v. 18, n. 1, p. 130, 2018.
- STAIKOWSKY, F. et al. Retrospective survey of Chikungunya disease in Reunion Island hospital staff. **Epidemiology and Infection**, v. 136, n. 2, p. 196-206, 2008.
- STAIKOWSKY, F. et al. Prospective study of Chikungunya virus acute infection in the Island of La Reunion during the 2005-2006 outbreak. **PLoS One**, v. 4, n. 10, p. e7603, 2009.
- TAN, L. V. et al. Viral etiology of encephalitis in children in southern Vietnam: results of a one-year prospective descriptive study. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 4, n. 10, p. e854, 2010.
- TARAPHDAR, D. et al. A comparative study of clinical features between monotypic and dual infection cases with Chikungunya virus and dengue virus in West Bengal, India. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 86, n. 4, p. 720-723, 2012.
- TEIXEIRA, M. G. et al. East/Central/South African genotype chikungunya virus, Brazil, 2014. **Emerging Infectious Diseases**, v. 21, n. 5, p. 906-907, 2015.
- THIBERVILLE, S. D. et al. Chikungunya fever: a clinical and virological investigation of outpatients on Reunion Island, South-West Indian Ocean. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 7, n. 1, p. e2004, 2013.
- THISYAKORN, U. et al. Dengue infection with central nervous system manifestations. **The Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health**, v. 30, n. 3, p. 504-506, 1999.
- TSAI, H. P. et al. An echovirus 18-associated outbreak of aseptic meningitis in Taiwan: epidemiology and diagnostic and genetic aspects. **Journal of Medical Microbiology**, v. 60, n. Pt 9, p. 1360-1365, 2011.
- TSETSARKIN, K. A. et al. Chikungunya virus emergence is constrained in Asia by lineage-specific adaptive landscapes. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v. 108, n. 19, p. 7872-7877, 2011.

TSETSARKIN, K. A. et al. A single mutation in chikungunya virus affects vector specificity and epidemic potential. **PLoS Pathogens**, v. 3, n. 12, p. e201, 2007.

VAN BELKUM, A.; NIESTERS, H. G. Nucleic acid amplification and related techniques in microbiological diagnostics and epidemiology. **Cellular and Molecular Biology (Noisy-le-grand)**, v. 41, n. 5, p. 615-623, 1995.

VARGAS, A. et al. Characteristics of the first cases of microcephaly possibly related to Zika virus reported in the Metropolitan Region of Recife, Pernambuco State, Brazil. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 25, n. 4, p. 691-700, 2016.

VIALLO, A. et al. Meningitis in adult patients with a negative direct cerebrospinal fluid examination: value of cytochemical markers for differential diagnosis. **Critical Care**, v. 15, n. 3, p. R136, 2011.

VOLK, S. M. et al. Genome-scale phylogenetic analyses of chikungunya virus reveal independent emergences of recent epidemics and various evolutionary rates. **Journal of Virology**, v. 84, n. 13, p. 6497-6504, 2010.

VOLLE, R. et al. Quantitative real-time RT-PCR assay for research studies on enterovirus infections in the central nervous system. **Journal of Virological Methods**, v. 185, n. 1, p. 142-148, 2012.

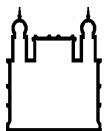
WHO. **Dengue: Guidelines for Diagnosis, Treatment, Prevention and Control: New Edition**. Geneva: World Health Organization, 2009.

\_\_\_\_\_. Fact sheet on Zika virus disease (updated on 2 June 2016). **Wkly. Epidemiol. Rec.**, v. 91, n. 24, p. 314-316, 2016.

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

ZEYTINOGLU, A. et al. Evaluation of viral etiology in central nervous system infections from a university hospital point of view in Izmir based on seven years data. **Mikrobiyol. Bul.**, v. 51, n. 2, p. 127-135, 2017.

**APÊNDICE I – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)  
PARA O PARTICIPANTE ADULTO**



## **Termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) para o participante adulto**

*As informações que se seguem descrevem o estudo e seu papel como participante. O entrevistador responderá todas as perguntas que você tiver sobre este questionário ou sobre o estudo. Por favor, ouça com atenção e não hesite em perguntar sobre a informação que está sendo fornecida.*

Você está sendo convidado a participar do estudo intitulado, “IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DOS AGENTES VIRAIS CAUSADORES DA MENINGITE ASSÉPTICA NO ESTADO DA BAHIA”. O objetivo deste estudo é identificar os agentes virais responsáveis por casos de meningite asséptica e estabelecer um sistema de vigilância epidemiológica para este agravo.

Para participar, você deve (1) assinar duas vias deste termo de consentimento (uma via fica com você e a outra com o pesquisador); (2) autorizar a revisão do seu prontuário para obtermos informações sobre o seu quadro clínico, antecedentes médicos, evolução clínica e resultados laboratoriais; e (3) permitir que obtenhamos uma pequena quantidade do seu líquido, já coletados previamente para a rotina do Hospital Couto Maia (HCM). Além disso, também utilizaremos para pesquisa dos vírus uma pequena quantidade das suas amostras de fezes e soro/plasma coletadas para exames de rotina, caso estas estejam disponíveis.

Não existem riscos aparentes diretamente relacionados ao estudo. As amostras necessárias já foram coletadas pela equipe do hospital.

Caso seja identificado o agente causador da meningite, a equipe médica do HCM será informada para adequar a conduta terapêutica à infecção viral. Não haverá, de imediato, outros benefícios diretos para o participante. Indiretamente, eles estarão contribuindo com informações muito importantes no estudo das meningites que poderão melhorar o controle da doença e aumentar o conhecimento científico.

É importante destacar que seu nome e identificação serão mantidos em sigilo. As suas respostas durante a entrevista e os resultados dos exames serão confidenciais. Apenas você, os investigadores do grupo de estudo, o Comitê de Ética em Pesquisas do HCM e Centro de Pesquisas Gonçalo Muniz terão acesso a estas informações. Você não será identificado em qualquer relatório ou publicação resultante deste estudo.

*Participação voluntária: Sua participação neste estudo é voluntária, você pode se recusar a participar. Durante a entrevista, o entrevistador pode perguntar questões que você ache que não são propícias e não queira responder. Se quiser, você tem o direito de recusar a respondê-las. Além disso, sua participação ou não neste projeto não causará nenhuma diferença ou perda no atendimento de seus problemas de saúde neste ou em outros hospitais. Você não será responsável por nenhuma despesa, incluindo as análises laboratoriais de amostras, associadas com este estudo. Você não receberá compensação financeira para participar do estudo. Você receberá uma cópia deste termo de consentimento.*

Pelo presente Termo de Consentimento Livre e Esclarecido:

( ) concordo em participar deste projeto de pesquisa, pois fui informado, de forma clara e detalhada, livre de qualquer forma de constrangimento e coerção, dos objetivos, da justificativa, dos riscos, desconfortos e benefícios todos acima descritos;

( ) autorizo, também, que o material biológico e os dados coletados através da entrevista e revisão de meus registros médicos (prontuário) sejam armazenados para pesquisas futuras e/ou ( ) descartados sem aviso prévio.

Salvador-BA, \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

Nome do voluntário: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
Assinatura do voluntário



Impressão datiloscopia do voluntário

Testemunhas:

\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
Assinatura do pesquisador responsável

Contatos:

Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, FIOCRUZ-BA  
R. Waldemar Falcão, 121, Candeal de Brotas

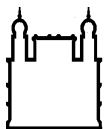
Pesquisador responsável:

Dr. Luciano Kalabric Silva  
Tel.: 71-3176-2265  
E-mail: [kalabric@bahia.fiocruz.br](mailto:kalabric@bahia.fiocruz.br)

Comitê de Ética em Pesquisa (CEP):

Tel.: 71-3176-2285  
E-mail: [cep@bahia.fiocruz.br](mailto:cep@bahia.fiocruz.br)

**APÊNDICE II – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)  
PARA O RESPONSÁVEL DO PARTICIPANTE MENOR**



## **Termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) para o responsável do participante menor**

*As informações que se seguem descrevem o estudo e seu papel como responsável do(a) participante. O entrevistador responderá todas as perguntas que o(a) senhor(a) tiver sobre este questionário ou sobre o estudo. Por favor, ouça com atenção e não hesite em perguntar sobre a informação que está sendo fornecida.*

Seu(Sua) filho(a) está sendo convidado a participar do estudo intitulado, "IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DOS AGENTES VIRAIS CAUSADORES DA MENINGITE ASSÉPTICA NO ESTADO DA BAHIA". O objetivo deste estudo é identificar os agentes virais responsáveis por casos de meningite asséptica e estabelecer um sistema de vigilância epidemiológica para este agravo.

Para participar, o(a) senhor(a) deve (1) assinar duas vias deste termo de consentimento (uma via fica com o(a) senhor(a) e a outra com o pesquisador); (2) autorizar a revisão do prontuário do(a) seu(sua) filho(a) para obtermos informações sobre o quadro clínico, antecedentes médicos, evolução clínica e resultados laboratoriais; e (3) permitir que obtenhamos uma pequena quantidade do líquido e soro do(a) seu(sua) filho(a), já coletados previamente para a rotina do Hospital Couto Maia (HCM). Além disso, também utilizaremos para pesquisa dos vírus uma pequena quantidade das suas amostras de fezes e soro/plasma do(a) seu(sua) filho(a) coletadas para exames de rotina, caso estas estejam disponíveis.

Não existem riscos aparentes diretamente relacionados ao estudo. As amostras necessárias já foram coletadas pela equipe do hospital.

Caso seja identificado o agente causador da meningite, a equipe médica do HCM será informada para adequar a conduta terapêutica à infecção viral. Não haverá, de imediato, outros benefícios diretos para o participante. Indiretamente, eles estarão contribuindo com informações muito importantes no estudo das meningites que poderão melhorar o controle da doença e aumentar o conhecimento científico.

É importante destacar que o nome e identificação do(a) seu(sua) filho(a) serão mantidos em sigilo. As respostas durante a entrevista e os resultados dos exames serão confidenciais. Apenas o(a) senhor(a), os investigadores do grupo de estudo, o Comitê de Ética em Pesquisas do HCM e Centro de Pesquisas Gonçalo Muniz terão acesso a estas informações. O(A) seu(sua) filho(a) não será identificado em qualquer relatório ou publicação resultante deste estudo.

Participação voluntária: A participação do(a) seu(sua) filho(a) neste estudo é voluntária, o(a) senhor(a) pode se recusar a participar. Durante a entrevista, o entrevistador pode perguntar questões que você ache que não são propícias e não queira responder. Se quiser, o(a) senhor(a) tem o direito de recusar a respondê-las. Além disso, a participação ou não neste projeto não causará nenhuma diferença ou perda no atendimento dos problemas de saúde do(a) seu(sua) filho(a) neste ou em outros hospitais. O(A) senhor(a) não será responsável por nenhuma despesa, incluindo as análises laboratoriais de amostras, associadas com este estudo. O(A) senhor(a) não receberá compensação financeira para participar do estudo. O(A) senhor(a) receberá uma cópia deste termo de consentimento.

Pelo presente Termo de Consentimento Livre e Esclarecido:

( ) autorizo a participação do(a) meu(minha) filho(a) neste projeto de pesquisa, pois fui informado, de forma clara e detalhada, livre de qualquer forma de constrangimento e coerção, dos objetivos, da justificativa, dos riscos, desconfortos e benefícios todos acima descritos;

( ) autorizo, também, que o material biológico e os dados coletados através da entrevista e revisão de meus registros médicos (prontuário) do(a) meu(minha) filho(a) sejam armazenados para pesquisas futuras e/ou ( ) descartados sem aviso prévio.

Salvador-BA, \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

Nome do menor: \_\_\_\_\_

Nome do responsável: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
Assinatura do responsável

\_\_\_\_\_  
Impressão datiloscopia do responsável

Testemunhas:

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
Assinatura do pesquisador responsável

Contatos:

Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, FIOCRUZ-BA  
R. Waldemar Falcão, 121, Candeal de Brotas

Pesquisador responsável:

Dr. Luciano Kalabric Silva

Tel.: 71-3176-2265

E-mail: [kalabric@bahia.fiocruz.br](mailto:kalabric@bahia.fiocruz.br)

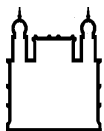
Comitê de Ética em Pesquisa (CEP):

Tel.: 71-3176-2285

E-mail: [cep@bahia.fiocruz.br](mailto:cep@bahia.fiocruz.br)



**APÊNDICE III – TERMO DE ASSENTIMENTO PARA O PARTICIPANTE MENOR**



## Termo de assentimento para o participante menor

*As informações que se seguem descrevem o estudo e seu papel como participante. O entrevistador responderá todas as perguntas que você tiver sobre este questionário ou sobre o estudo. Por favor, ouça com atenção e não hesite em perguntar sobre a informação que está sendo fornecida.*

Você está sendo convidado a participar do estudo intitulado, “IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DOS AGENTES VIRAIS CAUSADORES DA MENINGITE ASSÉPTICA NO ESTADO DA BAHIA”. O objetivo deste estudo é identificar os agentes virais responsáveis por casos de meningite asséptica e estabelecer um sistema de vigilância epidemiológica para este agravo.

Para participar deste estudo, o responsável por você deverá autorizar e assinar um termo de consentimento. Você não terá nenhum custo, nem receberá qualquer vantagem financeira. Você será esclarecido(a) em qualquer aspecto que desejar e estará livre para participar ou recusar-se. O responsável por você poderá retirar o consentimento ou interromper a sua participação a qualquer momento. A sua participação é voluntária e a recusa em participar não acarretará qualquer penalidade ou modificação na forma em que é atendido pelo Hospital Couto Maia. O pesquisador irá tratar a sua identidade com padrões profissionais de sigilo. Você não será identificado em nenhuma publicação.

Não existem riscos aparentes diretamente relacionados ao estudo. As amostras necessárias já foram coletadas pela equipe do hospital.

Caso seja identificado o agente causador da meningite, a equipe médica do HCM será informada para adequar a conduta terapêutica à infecção viral. Não haverá, de imediato, outros benefícios diretos para o participante. Indiretamente, eles estarão contribuindo com informações muito importantes no estudo das meningites que poderão melhorar o controle da doença e aumentar o conhecimento científico.

Pelo presente Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, declaro que fui informado(a) dos objetivos do presente estudo de maneira clara e detalhada e esclareci minhas dúvidas. Sei que a qualquer momento poderei solicitar novas informações, e o meu responsável poderá modificar a decisão de participar se assim o desejar. Tendo o consentimento do meu responsável já assinado, declaro que:

( ) concordo em participar desse estudo. Recebi uma cópia deste termo assentimento e me foi dada a oportunidade de ler e esclarecer as minhas dúvidas;

( ) concordo, também, que o material biológico e os dados coletados através da entrevista e revisão de meus registros médicos (prontuário) sejam armazenados para pesquisas futuras e/ou ( ) descartados sem aviso prévio.

Salvador-BA, \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

Nome do menor: \_\_\_\_\_

Nome do responsável: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
Assinatura do menor



Impressão datiloscopia  
do menor

Testemunhas:

\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
Assinatura do pesquisador responsável

Contatos:

Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, FIOCRUZ-BA  
R. Waldemar Falcão, 121, Candeal de Brotas

Pesquisador responsável:

Dr. Luciano Kalabric Silva

Tel.: 71-3176-2265

E-mail: [kalabric@bahia.fiocruz.br](mailto:kalabric@bahia.fiocruz.br)

Comitê de Ética em Pesquisa (CEP):

Tel.: 71-3176-2285

E-mail: [cep@bahia.fiocruz.br](mailto:cep@bahia.fiocruz.br)

**APÊNDICE IV – QUESTIONÁRIO CLÍNICOEPIDEMIOLÓGICO**





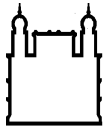




3.4.15	Anestesia espinhal (ANESP):	<input type="checkbox"/> 1 Na última semana	<input type="checkbox"/> 2 Nos últimos seis meses	<input type="checkbox"/> 3 Não	<input type="checkbox"/> 9 NSI
3.4.16	Injeção intratecal (ITEC)	<input type="checkbox"/> 1 Na última semana	<input type="checkbox"/> 2 Nos últimos seis meses	<input type="checkbox"/> 3 Não	<input type="checkbox"/> 9 NSI
3.4.17	Injeção de quimopapaína (IQP):	<input type="checkbox"/> 1 Na última semana	<input type="checkbox"/> 2 Nos últimos seis meses	<input type="checkbox"/> 3 Não	<input type="checkbox"/> 9 NSI
<b>3.5 Histórico medicamentoso (HISTMED):</b>					
Fez uso de algum dos medicamentos abaixo:					
3.5.1	Azatioprina (AZA)	<input type="checkbox"/> 1 Na última semana	<input type="checkbox"/> 2 Nos últimos seis meses	<input type="checkbox"/> 3 Nos últimos dois anos	<input type="checkbox"/> 4 Não <input type="checkbox"/> 9 NSI
3.5.2	Carbamazepina (CARB)	<input type="checkbox"/> 1 Na última semana	<input type="checkbox"/> 2 Nos últimos seis meses	<input type="checkbox"/> 3 Nos últimos dois anos	<input type="checkbox"/> 4 Não <input type="checkbox"/> 9 NSI
3.5.3	Cefalosporinas (CEFAL)	<input type="checkbox"/> 1 Na última semana	<input type="checkbox"/> 2 Nos últimos seis meses	<input type="checkbox"/> 3 Nos últimos dois anos	<input type="checkbox"/> 4 Não <input type="checkbox"/> 9 NSI
3.5.4	Cetoprofeno (CETO)	<input type="checkbox"/> 1 Na última semana	<input type="checkbox"/> 2 Nos últimos seis meses	<input type="checkbox"/> 3 Nos últimos dois anos	<input type="checkbox"/> 4 Não <input type="checkbox"/> 9 NSI
3.5.5	Ciprofloxacina (CIPRO)	<input type="checkbox"/> 1 Na última semana	<input type="checkbox"/> 2 Nos últimos seis meses	<input type="checkbox"/> 3 Nos últimos dois anos	<input type="checkbox"/> 4 Não <input type="checkbox"/> 9 NSI
3.5.6	Citosina-arabinosídeo (CITO)	<input type="checkbox"/> 1 Na última semana	<input type="checkbox"/> 2 Nos últimos seis meses	<input type="checkbox"/> 3 Nos últimos dois anos	<input type="checkbox"/> 4 Não <input type="checkbox"/> 9 NSI
3.5.7	Diclofenaco (DICL)	<input type="checkbox"/> 1 Na última semana	<input type="checkbox"/> 2 Nos últimos seis meses	<input type="checkbox"/> 3 Nos últimos dois anos	<input type="checkbox"/> 4 Não <input type="checkbox"/> 9 NSI
3.5.8	Fenazopiridina (FENAZ)	<input type="checkbox"/> 1 Na última semana	<input type="checkbox"/> 2 Nos últimos seis meses	<input type="checkbox"/> 3 Nos últimos dois anos	<input type="checkbox"/> 4 Não <input type="checkbox"/> 9 NSI
3.5.9	Ibuprofeno (IBUPR)	<input type="checkbox"/> 1 Na última semana	<input type="checkbox"/> 2 Nos últimos seis meses	<input type="checkbox"/> 3 Nos últimos dois anos	<input type="checkbox"/> 4 Não <input type="checkbox"/> 9 NSI
3.5.10	Imunoglobulina (IMUN)	<input type="checkbox"/> 1 Na última semana	<input type="checkbox"/> 2 Nos últimos seis meses	<input type="checkbox"/> 3 Nos últimos dois anos	<input type="checkbox"/> 4 Não <input type="checkbox"/> 9 NSI
3.5.11	Isoniazida (ISO)	<input type="checkbox"/> 1 Na última semana	<input type="checkbox"/> 2 Nos últimos seis meses	<input type="checkbox"/> 3 Nos últimos dois anos	<input type="checkbox"/> 4 Não <input type="checkbox"/> 9 NSI
3.5.12	Metronidazol (METR)	<input type="checkbox"/> 1 Na última semana	<input type="checkbox"/> 2 Nos últimos seis meses	<input type="checkbox"/> 3 Nos últimos dois anos	<input type="checkbox"/> 4 Não <input type="checkbox"/> 9 NSI
3.5.13	Muromonab-CD3 (OKT3)	<input type="checkbox"/> 1 Na última semana	<input type="checkbox"/> 2 Nos últimos seis meses	<input type="checkbox"/> 3 Nos últimos dois anos	<input type="checkbox"/> 4 Não <input type="checkbox"/> 9 NSI
3.5.14	Naproxeno (NAPR)	<input type="checkbox"/> 1 Na última semana	<input type="checkbox"/> 2 Nos últimos seis meses	<input type="checkbox"/> 3 Nos últimos dois anos	<input type="checkbox"/> 4 Não <input type="checkbox"/> 9 NSI
3.5.15	Penicilina (PEN)	<input type="checkbox"/> 1 Na última semana	<input type="checkbox"/> 2 Nos últimos seis meses	<input type="checkbox"/> 3 Nos últimos dois anos	<input type="checkbox"/> 4 Não <input type="checkbox"/> 9 NSI
3.5.16	Pirazinamida (PIRA)	<input type="checkbox"/> 1 Na última semana	<input type="checkbox"/> 2 Nos últimos seis meses	<input type="checkbox"/> 3 Nos últimos dois anos	<input type="checkbox"/> 4 Não <input type="checkbox"/> 9 NSI
3.5.17	Ranitidina (RANIT)	<input type="checkbox"/> 1 Na última semana	<input type="checkbox"/> 2 Nos últimos seis meses	<input type="checkbox"/> 3 Nos últimos dois anos	<input type="checkbox"/> 4 Não <input type="checkbox"/> 9 NSI
3.5.18	Sulfametoxazol (SMZ)	<input type="checkbox"/> 1 Na última semana	<input type="checkbox"/> 2 Nos últimos seis meses	<input type="checkbox"/> 3 Nos últimos dois anos	<input type="checkbox"/> 4 Não <input type="checkbox"/> 9 NSI
3.5.19	Sulfametoxazol-trimetoprima (TSMZ)	<input type="checkbox"/> 1 Na última semana	<input type="checkbox"/> 2 Nos últimos seis meses	<input type="checkbox"/> 3 Nos últimos dois anos	<input type="checkbox"/> 4 Não <input type="checkbox"/> 9 NSI
3.5.20	Sulindac (SUL)	<input type="checkbox"/> 1 Na última semana	<input type="checkbox"/> 2 Nos últimos seis meses	<input type="checkbox"/> 3 Nos últimos dois anos	<input type="checkbox"/> 4 Não <input type="checkbox"/> 9 NSI
3.5.21	Tolmetina (TOLM)	<input type="checkbox"/> 1 Na última semana	<input type="checkbox"/> 2 Nos últimos seis meses	<input type="checkbox"/> 3 Nos últimos dois anos	<input type="checkbox"/> 4 Não <input type="checkbox"/> 9 NSI
3.5.22	Trimetoprima (TMP)	<input type="checkbox"/> 1 Na última semana	<input type="checkbox"/> 2 Nos últimos seis meses	<input type="checkbox"/> 3 Nos últimos dois anos	<input type="checkbox"/> 4 Não <input type="checkbox"/> 9 NSI
3.5.23	Usou antibiótico nos últimos 7 dias antes do internamento (ATBST)?	<input type="checkbox"/> 1 Sim	<input type="checkbox"/> 2 Não	<input type="checkbox"/> 9 NSI	







### Identificação Molecular dos Agentes Virais Causadores da Meningite Asséptica no Estado da Bahia.

#### Revisão do Prontuário

Etiqueta	<table border="1"> <tr> <td style="text-align: center;">Digitação</td> </tr> <tr> <td style="display: flex; justify-content: space-around;"> <div style="border: 1px solid black; width: 40px; height: 40px; text-align: center;">INDGRP</div> <div style="border: 1px solid black; width: 40px; height: 40px; text-align: center;">DTDGRP</div> </td> </tr> </table>	Digitação	<div style="border: 1px solid black; width: 40px; height: 40px; text-align: center;">INDGRP</div> <div style="border: 1px solid black; width: 40px; height: 40px; text-align: center;">DTDGRP</div>	<table border="1"> <tr> <td style="text-align: center;">Revisão</td> </tr> <tr> <td style="display: flex; justify-content: space-around;"> <div style="border: 1px solid black; width: 40px; height: 40px; text-align: center;">INRRP</div> <div style="border: 1px solid black; width: 40px; height: 40px; text-align: center;">DTRRP</div> </td> </tr> </table>	Revisão	<div style="border: 1px solid black; width: 40px; height: 40px; text-align: center;">INRRP</div> <div style="border: 1px solid black; width: 40px; height: 40px; text-align: center;">DTRRP</div>
Digitação						
<div style="border: 1px solid black; width: 40px; height: 40px; text-align: center;">INDGRP</div> <div style="border: 1px solid black; width: 40px; height: 40px; text-align: center;">DTDGRP</div>						
Revisão						
<div style="border: 1px solid black; width: 40px; height: 40px; text-align: center;">INRRP</div> <div style="border: 1px solid black; width: 40px; height: 40px; text-align: center;">DTRRP</div>						

Data da Revisão (DTRP): <input type="text"/> / <input type="text"/> / <input type="text"/>	Iniciais do Revisor (INRP): <input type="text"/>
Nº de Identificação (MVID): <input type="text"/>	Nº de Registro PA (IDR): <input type="text"/> <small>Obs.: 9 999 999 (não sabe ou PA) e 8 888 888 (outro hospital)</small>
Termo de consentimento assinado (TCLE): <input type="checkbox"/> 1 Sim <input type="checkbox"/> 2 Não	LCR armazenado (LCRA): <input type="checkbox"/> 1 Sim <input type="checkbox"/> 2 Não

#### 6. DADOS HOSPITALARES:

6.1	O paciente ficou internado (INT): <input type="checkbox"/> 1 Sim <input type="checkbox"/> 2 Não <input type="checkbox"/> 9 NSI
6.2	Data da admissão (DTADM): <input type="text"/> / <input type="text"/> / <input type="text"/>
6.3	Diagnóstico inicial (DI): <input type="text"/> <small>Obs.: se não sabe informar (NSI), preencher 99, se não se aplica (NSA), preencher 88</small>
6.4	Reinternamento (REINT): <input type="checkbox"/> 1 Sim <input type="checkbox"/> 2 Não <input type="checkbox"/> 9 NSI
6.4.1	Se sim, qual motivo do internamento anterior (REINT1): <input type="text"/> <small>Obs.: se não sabe informar (NSI), preencher 99; se não se aplica (NSA), preencher 88</small>
6.5	O paciente de outro hospital (OUTROH): <input type="checkbox"/> 1 Sim <input type="checkbox"/> 2 Não <input type="checkbox"/> 9 NSI
6.5.1	Se sim, qual (OUTROH1): <input type="text"/> <small>Obs.: se não sabe informar (NSI), preencher 99; se não se aplica (NSA), preencher 88</small>
6.6	Nº de dias com sintomas ao internar (QNTDSINT): <input type="text"/> <small>Obs.: se não sabe informar (NSI), preencher 999; se não se aplica (NSA), preencher 888</small>
6.7	Quadro neurológico na admissão (QNADM): <input type="checkbox"/> 1 Normal <input type="checkbox"/> 2 Alterado <input type="checkbox"/> 3 Coma <input type="checkbox"/> 9 NSI

#### 7. QUADRO CLÍNICO:

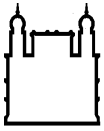
Obs.: se não sabe informar (NSI), preencher 99, se não se aplica (NSA), preencher 88

	Sintomas na admissão	Presente?	Se sim, há quantos dias:
7.1	Abaulamento da fontanela anterior (ABAUFON):	<input type="checkbox"/> 1 Sim <input type="checkbox"/> 2 Não <input type="checkbox"/> 9 NSI/A	(ABAUFON1): <input type="text"/>
7.2	Alucinações (ALUC):	<input type="checkbox"/> 1 Sim <input type="checkbox"/> 2 Não <input type="checkbox"/> 9 NSI/A	(ALUC1): <input type="text"/>
7.3	Anorexia (ANOR):	<input type="checkbox"/> 1 Sim <input type="checkbox"/> 2 Não <input type="checkbox"/> 9 NSI/A	(ANOR1): <input type="text"/>
7.4	Artralgia (ARTR):	<input type="checkbox"/> 1 Sim <input type="checkbox"/> 2 Não <input type="checkbox"/> 9 NSI/A	(ARTR1): <input type="text"/>
7.5	Choro persistente (CHOR):	<input type="checkbox"/> 1 Sim <input type="checkbox"/> 2 Não <input type="checkbox"/> 9 NSI/A	(CHOR1): <input type="text"/>
7.6	Coagulação intravascular disseminada (CIVD):	<input type="checkbox"/> 1 Sim <input type="checkbox"/> 2 Não <input type="checkbox"/> 9 NSI/A	(CIVD1): <input type="text"/>
7.7	Colapso cardiovascular (COLCAR):	<input type="checkbox"/> 1 Sim <input type="checkbox"/> 2 Não <input type="checkbox"/> 9 NSI/A	(COLCAR1): <input type="text"/>
7.8	Coma (COMA):	<input type="checkbox"/> 1 Sim <input type="checkbox"/> 2 Não <input type="checkbox"/> 9 NSI/A	(COMA1): <input type="text"/>
7.9	Conjuntivite (CONJ):	<input type="checkbox"/> 1 Sim <input type="checkbox"/> 2 Não <input type="checkbox"/> 9 NSI/A	(CONJ1): <input type="text"/>
7.10	Convulsões (CONV):	<input type="checkbox"/> 1 Sim <input type="checkbox"/> 2 Não <input type="checkbox"/> 9 NSI/A	(CONV1): <input type="text"/>



7.11	Coriza (CORIZA):	<input type="checkbox"/> 1	Sim	<input type="checkbox"/> 2	Não	<input type="checkbox"/> 9	NSI/A	(CORISA1):	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
7.12	<b>Diarreia (DIAR):</b>	<input type="checkbox"/> 1	Sim	<input type="checkbox"/> 2	Não	<input type="checkbox"/> 9	NSI/A	(DIAR1):	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
7.13	Dificuldade para despertar (DIFDES):	<input type="checkbox"/> 1	Sim	<input type="checkbox"/> 2	Não	<input type="checkbox"/> 9	NSI/A	(DIFDES1):	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
7.14	Diplopia (DIPL):	<input type="checkbox"/> 1	Sim	<input type="checkbox"/> 2	Não	<input type="checkbox"/> 9	NSI/A	(DIPL1):	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
7.15	Dispneia (DISP):	<input type="checkbox"/> 1	Sim	<input type="checkbox"/> 2	Não	<input type="checkbox"/> 9	NSI/A	(DISP1):	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
7.16	Dor de cabeça/Cefaleia (CEFA):	<input type="checkbox"/> 1	Sim	<input type="checkbox"/> 2	Não	<input type="checkbox"/> 9	NSI/A	(CEFA1):	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
7.17	<b>Dor na nuca (DORNUC):</b>	<input type="checkbox"/> 1	Sim	<input type="checkbox"/> 2	Não	<input type="checkbox"/> 9	NSI/A	(DORNUC1):	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
7.18	Dor retroorbitária (DORRET):	<input type="checkbox"/> 1	Sim	<input type="checkbox"/> 2	Não	<input type="checkbox"/> 9	NSI/A	(DORRET1):	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
7.19	Enterocolite necrosante (ENTNEC):	<input type="checkbox"/> 1	Sim	<input type="checkbox"/> 2	Não	<input type="checkbox"/> 9	NSI/A	(ENTNEC1):	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
7.20	Espirros (ESPIRROS):	<input type="checkbox"/> 1	Sim	<input type="checkbox"/> 2	Não	<input type="checkbox"/> 9	NSI/A	(ESPIRROS1):	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
7.21	Esplenomegalia (ESPL):	<input type="checkbox"/> 1	Sim	<input type="checkbox"/> 2	Não	<input type="checkbox"/> 9	NSI/A	(ESPL1):	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
7.22	Estado alterado de consciência (EACONS):	<input type="checkbox"/> 1	Sim	<input type="checkbox"/> 2	Não	<input type="checkbox"/> 9	NSI/A	(EACONS1):	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
7.23	Exantemas (EXAN):	<input type="checkbox"/> 1	Sim	<input type="checkbox"/> 2	Não	<input type="checkbox"/> 9	NSI/A	(EXAN1):	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
7.24	Falta de apetite (FALTAAP):	<input type="checkbox"/> 1	Sim	<input type="checkbox"/> 2	Não	<input type="checkbox"/> 9	NSI/A	(FALTAAP1):	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
7.25	Faringite (FARIN):	<input type="checkbox"/> 1	Sim	<input type="checkbox"/> 2	Não	<input type="checkbox"/> 9	NSI/A	(FARIN1):	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
7.26	<b>Febre (FEBR):</b>	<input type="checkbox"/> 1	Sim	<input type="checkbox"/> 2	Não	<input type="checkbox"/> 9	NSI/A	(FEBR1):	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
7.27	Fotofobia/Fotosensibilidade (FOTOF):	<input type="checkbox"/> 1	Sim	<input type="checkbox"/> 2	Não	<input type="checkbox"/> 9	NSI/A	(FOTOF1):	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
7.28	Herpangina (HERPAN):	<input type="checkbox"/> 1	Sim	<input type="checkbox"/> 2	Não	<input type="checkbox"/> 9	NSI/A	(HERPAN1):	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
7.29	Irritabilidade (IRRIT):	<input type="checkbox"/> 1	Sim	<input type="checkbox"/> 2	Não	<input type="checkbox"/> 9	NSI/A	(IRRIT1):	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
7.30	Linfoadenopatia (LINFOAD):	<input type="checkbox"/> 1	Sim	<input type="checkbox"/> 2	Não	<input type="checkbox"/> 9	NSI/A	(LINFOAD1):	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
7.31	Meningismo (MENING):	<input type="checkbox"/> 1	Sim	<input type="checkbox"/> 2	Não	<input type="checkbox"/> 9	NSI/A	(MENING1):	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
7.32	Mialgia (MIALG):	<input type="checkbox"/> 1	Sim	<input type="checkbox"/> 2	Não	<input type="checkbox"/> 9	NSI/A	(MIALG1):	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
7.33	Miocardite (MIOCAR):	<input type="checkbox"/> 1	Sim	<input type="checkbox"/> 2	Não	<input type="checkbox"/> 9	NSI/A	(MIOCAR1):	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
7.34	Miopericardite (MIOPER):	<input type="checkbox"/> 1	Sim	<input type="checkbox"/> 2	Não	<input type="checkbox"/> 9	NSI/A	(MIOPER1):	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
7.35	Náusea (NAUS):	<input type="checkbox"/> 1	Sim	<input type="checkbox"/> 2	Não	<input type="checkbox"/> 9	NSI/A	(NAUS1):	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
7.36	Necrose hepática (NECRHEP):	<input type="checkbox"/> 1	Sim	<input type="checkbox"/> 2	Não	<input type="checkbox"/> 9	NSI/A	(NECRHEP1):	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
7.37	Obstrução nasal (OBSTNAS):	<input type="checkbox"/> 1	Sim	<input type="checkbox"/> 2	Não	<input type="checkbox"/> 9	NSI/A	(OBSTNAS1):	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
7.38	Odinofagia (ODINO):	<input type="checkbox"/> 1	Sim	<input type="checkbox"/> 2	Não	<input type="checkbox"/> 9	NSI/A	(ODINO1):	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
7.39	Paralisia de nervos cranianos (PARALNC):	<input type="checkbox"/> 1	Sim	<input type="checkbox"/> 2	Não	<input type="checkbox"/> 9	NSI/A	(PARALNC1):	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
7.40	Pericardite (PERIOC):	<input type="checkbox"/> 1	Sim	<input type="checkbox"/> 2	Não	<input type="checkbox"/> 9	NSI/A	(PERIOC1):	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
7.41	Petéquias (PETEQUIA):	<input type="checkbox"/> 1	Sim	<input type="checkbox"/> 2	Não	<input type="checkbox"/> 9	NSI/A	(PETEQUIA1):	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
7.42	Pleurisia (PLEURIS):	<input type="checkbox"/> 1	Sim	<input type="checkbox"/> 2	Não	<input type="checkbox"/> 9	NSI/A	(PLEURIS1):	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>





# Revisão do Prontuário

## Projeto: Meningites Virais












**APÊNDICE V – REGULAMENTO PARA BIORREPOSITÓRIO**

## Modelo de Regulamento para Biorrepositórios

(Segundo Portaria MS 2.201/2011, *biorrepositório* é uma coleção de material biológico humano, coletado e armazenado ao longo da execução de um projeto de pesquisa específico, conforme regulamento ou normas técnicas, éticas e operacionais pré-definidas, sob responsabilidade institucional e sob gerenciamento do pesquisador, sem fins comerciais.)

### Dados Gerais

<b>Projeto:</b> IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DOS AGENTES VIRAIS CAUSADORES DA MENINGITE ASSÉPTICA NO ESTADO DA BAHIA
<b>Vigência:</b> Dois anos a partir da data de aprovação no CEP
<b>Instituição responsável/depositária:</b> FIOCRUZ-BA
<b>Pesquisador gestor:</b> Luciano Kalabric Silva
<b>Instituição proponente:</b> FIOCRUZ-BA
<b>Instituição co-participante*</b>  ( ) Não ( X ) Sim Qual(is)? Hospital Couto Maia, Salvador-BA
<b>Participação estrangeira</b>  ( X ) Não ( ) Sim Qual(is)?

### Do armazenamento de amostras biológicas humanas

AMOSTRA No. 1
Tipo: Líquor
Número previsto: 500
Forma de acondicionamento/ armazenamento: A amostra de líquido coletada pelo serviço será alíquotada em dois tubos de criopreservação (500 µL). Estes serão armazenados em N <sub>2</sub> líquido e transportados semanalmente à FIOCRUZ-BA. Uma vez na FIOCRUZ-BA, as alíquotas serão armazenadas em freezer -70°C até o uso. Cada alíquota não será descongelada mais de duas vezes.
Período do armazenamento: até o final do estudo.

AMOSTRA No. 2
Tipo: Fezes
Número previsto: 500
Forma de acondicionamento/ armazenamento: A amostra de fezes será coletada em frasco coletor e fracionada em quatro tubos de criopreservação (180–220 mg). Estes serão armazenados em N <sub>2</sub> líquido e transportados à FIOCRUZ-BA semanalmente. Uma vez na FIOCRUZ-BA, os tubos serão armazenadas em freezer -70°C até o uso. Cada tubo será descongelado apenas uma vez e utilizado para a extração de DNA/RNA conforme as orientações do QIAamp DNA Stool Mini Kit.
Período do armazenamento: até o final do estudo.

AMOSTRA No. 3
Tipo: Soro/Plasma
Número previsto: 500
Forma de acondicionamento/ armazenamento: A amostra de soro/plasma coletada pelo serviço será aliqüotada em dois tubos de criopreservação (500 µL). Estes serão armazenados em N <sub>2</sub> líquido e transportados semanalmente à FIOCRUZ-BA. Uma vez na FIOCRUZ-BA, as alíquotas serão armazenadas em freezer -70°C até o uso. Cada alíquota não será descongelada mais de duas vezes.
Período do armazenamento: até o final do estudo.

### **Informações associadas às amostras**

As amostras apresentam cadastro? ( ) Não (X) Sim - Anexar formulário padrão a este documento
Em caso afirmativo, há dissociação completa dos dados do paciente? (X) Sim ( ) Não
Têm acesso restrito? ( ) Não (X) Sim. Como ocorre? Após a coleta e identificação da amostra, o material será encaminhado diretamente ao laboratório. Os dados pessoais dos participantes, bem como os resultados laboratoriais, serão lançados em um sistema de banco de dados protegido por senha e com acesso restrito. Os dados completos do participante somente serão acessíveis apenas para o coordenador do projeto.

### **Do Consentimento do paciente**

Apresenta Termo de Consentimento assinado pelo paciente/sujeito da pesquisa para armazenamento e utilização das amostras? ( ) Não (X) Sim Existe autorização para uso em pesquisas futuras? (X) Sim ( ) Não Apresenta autorização para descarte do material? (X) Sim ( ) Não
--

### **Sobre o descarte das amostras biológicas humanas**

Ao final do projeto, qual será o destino das amostras biológicas humanas armazenadas? ( ) Previsão de transferência a outro biorrepositório ( ) Previsão de transferência para um biobanco ( ) Descarte das amostras, respeitando a legislação vigente (X) Permanecer armazenado se em conformidade com as normas do CNS vigentes
---

**Das responsabilidades (segurança, sigilo, conservação etc)**

Do pesquisador:

- Treinar a equipe de laboratório para manipular as amostras de forma segura;
- Gerenciar a utilização das amostras;
- Garantir a sigilo dos dados.

Da Instituição responsável/depositária:

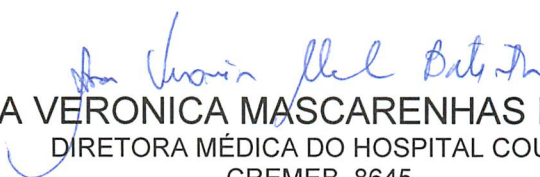
Prover a infraestrutura ideal para armazenamento, conservação e descarte das amostras.

**ANEXO I – CARTA DE ACEITE DO HCM**

## DECLARAÇÃO DE ANUÊNCIA DO ESTUDO

Declaramos para os devidos fins, que o Hospital Couto Maia - Secretaria de Saúde do Estado da Bahia (HCM-SESAB) está ciente e de acordo em colaborar com a realização do Projeto: Ações Estratégicas para melhoria e Capacitação do Diagnóstico Laboratorial da Meningite na Bahia, sob a coordenação da Professora Joice Neves Reis Pedreira. Nestes termos, o HCM-SESAB se compromete a oferecer sua estrutura, caso indicado e a disponibilização de acesso aos prontuários médicos dos pacientes do estudo, o laboratório para processamento de amostras, e a sala do SAME para revisão dos prontuários, desde que não haja prejuízo às demais atividades e serviços em andamento na instituição.

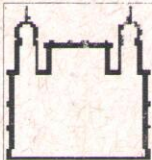
Salvador, 19 de abril 2013.



ANA VERONICA MASCARENHAS BATISTA  
DIRETORA MÉDICA DO HOSPITAL COUTO  
CREMEB 8645

**ANEXO II – TERMO DE COMPROMISSO DA FIOCRUZ-BA**





Ministério da Saúde  
**FIOCRUZ**  
Fundação Oswaldo Cruz  
Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz

Diretoria do CPqGM/Fiocruz

## Declaração

Declaro para os devidos fins que a instituição Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz – Fiocruz concorda que o projeto intitulado ***“Identificação Molecular dos Agentes Virais causadores da Meningite Asséptica no Estado da Bahia”***, coordenado por **Dr. Luciano Kalabric Silva**, submetido ao **Edital Fapesb Nº 030/2013**, Programa de Pesquisa para O SUS: Gestão compartilhada em Saúde – PPSUS-BA FAPESB/SESAB, seja desenvolvido no **Laboratório de Patologia e Biologia Molecular – LPBM**, desta instituição e assegura a disponibilidade de instalações e equipamentos para sua execução.

**Manoel Barral Netto**

Diretor do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz – FIOCRUZ  
Salvador – Bahia – Brasil

Marilda de Souza Gonçalves  
Vice-Diretora de Pesquisa, Laboratórios de  
Referência e Inovação  
CPqGM/Fiocruz  
Mat. SIAPE 628517-9

SUPERINTENDÊNCIA REGIONAL SUDESTE II  
EM BELO HORIZONTE  
GERÊNCIA EXECUTIVA - A - BELO HORIZONTE

## PORTARIA Nº 1, DE 17 DE JANEIRO DE 2014

O GERENTE-EXECUTIVO DO INSS EM BELO HORIZONTE/MG, no uso das atribuições conferidas pelo Regimento Interno aprovado pela PORTARIA MPS/296/2009, Art. 167, e com base na competência conferida pela PORTARIA INSS/PR/Nº 800, de 06 de setembro de 2011, Art. 3º, Inc. 1, resolve:

Dispensar, a pedido, a contar de 10/01/2014, a servidora ISLEY APARECIDA DINIZ, matrícula 0891964, CPF nº 455.254.476-49, da função de Chefe de Seção de Benefícios, código FG - 1, da Agência da Previdência Social Belo Horizonte/Floresta, Tipo B, da estrutura organizacional desta Gerência-Executiva.

HAROLD VANN HALLEN FONTES

## GERÊNCIA EXECUTIVA - B - TEÓFILO OTONI

## PORTARIAS DE 24 DE JANEIRO DE 2014

O GERENTE-EXECUTIVO DO INSS EM TEÓFILO OTONI/MG, no uso das atribuições conferidas pelo inciso XXII do artigo 167 do Regimento Interno do INSS aprovado pela Portaria MPS/GM nº 296 de 09 de novembro de 2009, publicada no DOU nº 214, de 10 de novembro de 2009, e considerando a subdelegação de competência estabelecida pelo Art. 3º, inciso I da PT/INSS/PRES nº 800 de 6 de setembro de 2011, publicada no DOU nº 173, de 8 de setembro de 2011, resolve:

Nº 4 - Dispensar a servidora GUACIRA PEREIRA AMARAL, Matrícula SIAPE 1633891, Técnico do Seguro Social, CPF nº 053.038.456-64, da Função Gratificada de Chefe da Seção de Reconhecimento de Direitos - SRD, código FGR-1, da estrutura da Gerência Executiva Teófilo Otoni - MG.

Nº 5 - Designar a servidora MÍRLEI APARECIDA DE SOUZA, Matrícula SIAPE 1636348, Técnico do Seguro Social, CPF nº 024.835.656-97, para exercer a Função Gratificada de Chefe da Seção de Reconhecimento de Direitos - SRD, código FGR-1, da estrutura da Gerência Executiva Teófilo Otoni - MG.

VALÉRIO JOSÉ DE ALMEIDA FILHO

SUPERINTENDÊNCIA REGIONAL SUL  
EM FLORIANÓPOLIS

## RETIFICAÇÕES

Na Portaria INSS/SR-III nº 374, de 23 de dezembro de 2013, publicada em DOU nº 249, na Seção II, folha 33 de 24/12/2013, onde se lê: "substituto eventual de Gerente da Agência da Previdência Social Porto Alegre/RS", leia-se: "substituto eventual de Gerente da Agência da Previdência Social Porto Alegre - Atendimento Demandas Judiciais/RS".

Na Portaria INSS/SR-III nº 375, de 23 de dezembro de 2013, publicada em DOU nº 249, na Seção II, folha 33 de 24/12/2013, onde se lê: "substituto eventual de Gerente da Agência da Previdência Social Porto Alegre/RS", leia-se: "substituto eventual de Gerente da Agência da Previdência Social Porto Alegre - Atendimento Demandas Judiciais/RS".

## GERÊNCIA EXECUTIVA - A - EM CURITIBA

## PORTARIA Nº 9, DE 24 DE JANEIRO DE 2014

A Gerente-Executiva do INSS em Curitiba - Paraná, no uso das atribuições que lhe foram conferidas pelo Decreto nº 7.556, de 24 de agosto de 2011 e considerando o contido no inciso I, do artigo 3º, da Portaria/INSS/PRES nº 800, de 06 de setembro de 2011, publicada no DOU nº 173, de 08 de setembro de 2011, resolve:

Art. 1º - Dispensar o servidor Sebastian Rafael Ferreira dos Santos, matrícula nº 1375458, CPF nº 035.955.489-06, Técnico do Seguro Social, da função de Chefe da Seção de Benefícios - FG-1, da Agência da Previdência Social Curitiba - Hauer - 14.001.02.0, desta Gerência Executiva, nomeado pela PT/EXECTB nº 115, de 30/11/2012, publicada no DOU nº 232, de 03/12/2012.

MARA REGINA SFIER

## PORTARIA Nº 10, DE 24 DE JANEIRO DE 2014

A Gerente Executiva do INSS em Curitiba - Paraná, no uso das atribuições que lhe foram conferidas pelo Decreto nº 7.556, de 25 de agosto de 2011 e considerando o contido no inciso I, do artigo 3º, da Portaria/INSS/PRES nº 800, de 06 de setembro de 2011, publicada no DOU nº 173, de 08 de setembro de 2011, resolve:

Art. 1º - Designar o servidor João Marcelino Soares, matrícula nº 1957469, CPF nº 008.625.199-69, Técnico do Seguro Social, para exercer a função de Chefe de Seção de Benefícios - FG-1, da Agência da Previdência Social Curitiba - Hauer - 14.001.02.0, desta Gerência Executiva.

MARA REGINA SFIER

Este documento pode ser verificado no endereço eletrônico <http://www.in.gov.br/autenticidade.html>, pelo código 00022014012700041

## Ministério da Saúde

## GABINETE DO MINISTRO

## PORTARIA Nº 136, DE 24 DE JANEIRO DE 2014

A CHEFE DE GABINETE DO MINISTRO DE ESTADO DA SAÚDE, no uso da competência que lhe foi delegada pela Portaria nº 761/GM/MS, de 13 de abril de 2011, resolve:

Dispensar, a partir de 15 de janeiro de 2014, LUCAS MONTEIRO DOS SANTOS, da Função Comissionada Técnica de Auxiliar de Serviços em Saúde V, código FCT-15, nº 05F.0566, do Núcleo Estadual do Ministério da Saúde em Sergipe, da Secretaria-Executiva, em virtude de posse em outro cargo inacumulável.

ELIANE APARECIDA DA CRUZ

## PORTARIA Nº 138, DE 24 DE JANEIRO DE 2014

O MINISTRO DE ESTADO DA SAÚDE, no uso da competência que lhe foi delegada pelo artigo 2º do Decreto nº 1.387, de 7 de fevereiro de 1995, autoriza o afastamento do país do servidor:

CARLOS AUGUSTO GRABOIS GADELHA, Secretário de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos, com a finalidade de assessorá-lo na Reunião Bilateral Brasil-Cuba para Fortalecimento dos Laços de Cooperação Técnica na Área da Saúde, no contexto da viagem da Presidente à República de Cuba para participar de agenda bilateral e da II Reunião de Cúpula da Comunidade dos Estados Latino-Americanos e Caribenhos - CELAC, em Havana - Cuba, no período de 26 a 30 de janeiro de 2014, inclusive trânsito, com ônus para o MS (Processo nº 25000.010557/2014-93).

ALEXANDRE ROCHA SANTOS PADILHA

## PORTARIA Nº 139, DE 24 DE JANEIRO DE 2014

O MINISTRO DE ESTADO DA SAÚDE, no uso da competência que lhe foi delegada pelo artigo 2º do Decreto nº 1.387, de 7 de fevereiro de 1995, autoriza o afastamento do país do servidor:

DIRCEU BRÁS APARECIDO BARBANO, Diretor-Presidente da Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA, com a finalidade de assessorá-lo na Reunião Bilateral Brasil-Cuba para Fortalecimento dos Laços de Cooperação Técnica na Área da Saúde, no contexto da viagem da Presidente à República de Cuba para participar de agenda bilateral e da II Reunião de Cúpula da Comunidade dos Estados Latino-Americanos e Caribenhos - CELAC, em Havana - Cuba, no período de 26 a 30 de janeiro de 2014, inclusive trânsito, com ônus para a ANVISA (Processo nº 25351.024606/2014-65).

ALEXANDRE ROCHA SANTOS PADILHA

## PORTARIA Nº 140, DE 24 DE JANEIRO DE 2014

O MINISTRO DE ESTADO DA SAÚDE, no uso da competência que lhe foi delegada pelo artigo 2º do Decreto nº 1.387, de 7 de fevereiro de 1995, autoriza o afastamento do país do servidor:

LUÍZ ODORICO MONTEIRO DE ANDRADE, Secretário de Gestão Estratégica e Participativa, com a finalidade de assessorá-lo na Reunião Bilateral Brasil-Cuba para Fortalecimento dos Laços de Cooperação Técnica na Área da Saúde, no contexto da viagem da Presidente à República de Cuba para participar de agenda bilateral e da Reunião de Cúpula da Comunidade dos Estados Latino-Americanos e Caribenhos - CELAC, em Havana - Cuba, no período de 26 a 30 de janeiro de 2014, inclusive trânsito, com ônus para o MS (Processo nº 25000.011297/2014-73).

ALEXANDRE ROCHA SANTOS PADILHA

## PORTARIA Nº 141, DE 24 DE JANEIRO DE 2014

O MINISTRO DE ESTADO DA SAÚDE, no uso da competência que lhe foi delegada pelo artigo 2º do Decreto nº 1.387, de 7 de fevereiro de 1995, autoriza o afastamento do país do servidor:

MOZART JULIO TABOSA SALES, Secretário de Gestão do Trabalho e da Educação na Saúde, com a finalidade de assessorá-lo na Reunião Bilateral Brasil-Cuba para Fortalecimento dos Laços de Cooperação Técnica na Área da Saúde, no contexto da viagem da Presidente à República de Cuba para participar de agenda bilateral e da Reunião de Cúpula da Comunidade dos Estados Latino-Americanos e Caribenhos - CELAC, em Havana - Cuba, no período de 26 a 30 de janeiro de 2014, inclusive trânsito, com ônus para o MS (Processo nº 25000.010245/2014-80).

ALEXANDRE ROCHA SANTOS PADILHA

## SECRETARIA EXECUTIVA

## PORTARIA Nº 56, DE 24 DE JANEIRO DE 2014

A SECRETÁRIA-EXECUTIVA DO MINISTÉRIO DA SAÚDE, no uso da competência que lhe foi delegada pelo Ministro de Estado da Saúde, por meio da Portaria nº 474, publicada no Diário Oficial da União de 17 de março de 2011, resolve:

Designar DANIELA BUOSI ROHLFS para exercer o encargo de substituta eventual do Diretor do Departamento de Vigilância em Saúde Ambiental e Saúde do Trabalhador, DAS-101.5, código nº 38.0059, da Secretaria de Vigilância em Saúde, ficando dispensada THENILLE FÁRIA MACHADO DO CARMO.

MÁRCIA APARECIDA DO AMARAL

## PORTARIA Nº 58, DE 24 DE JANEIRO DE 2014

A SECRETÁRIA-EXECUTIVA DO MINISTÉRIO DA SAÚDE, no uso da competência que lhe foi subdelegada pela Portaria nº 1.339, publicada no Diário Oficial da União nº 125, de 29 de junho de 2012, e na forma do disposto no Decreto nº 1.387, de 7 de fevereiro de 1995, resolve:

Autorizar o afastamento do país do servidor FELIPE COSTA DO AMARAL, Assessor do Ministro de Estado da Saúde, com a finalidade de assessorá-lo na Reunião Bilateral Brasil-Cuba na Área da Saúde, no contexto da viagem da Presidente à República de Cuba para participar de agenda bilateral e da Reunião de Cúpula da Comunidade dos Estados Latino-Americanos e Caribenhos - CELAC, em Havana - Cuba, no período de 26 a 30 de janeiro de 2014, inclusive trânsito, com ônus para o MS (Processo nº 25000.011435/2014-14).

MÁRCIA APARECIDA DO AMARAL

## PORTARIA Nº 59, DE 24 DE JANEIRO DE 2014

A SECRETÁRIA-EXECUTIVA DO MINISTÉRIO DA SAÚDE, no uso da competência que lhe foi subdelegada pela Portaria nº 1.339, publicada no Diário Oficial da União nº 125, de 29 de junho de 2012, e na forma do disposto no Decreto nº 1.387, de 7 de fevereiro de 1995, resolve:

Autorizar o afastamento do país do servidor IGOR NOGUEIRA CALVET, Assessor Técnico da Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos, com a finalidade de participar de Reunião Bilateral Brasil-Cuba para Fortalecimento dos Laços de Cooperação Técnica na Área da Saúde, no contexto da viagem da Presidente à República de Cuba por ocasião da II Reunião de Cúpula da Comunidade dos Estados Latino-Americanos e Caribenhos - CELAC, em Havana - Cuba, no período de 26 a 30 de janeiro de 2014, inclusive trânsito, com ônus para o MS (Processo nº 25000.010549/2014-47).

MÁRCIA APARECIDA DO AMARAL

SUBSECRETARIA DE ASSUNTOS  
ADMINISTRATIVOS

## PORTARIAS DE 20 DE JANEIRO DE 2014

O SUBSECRETÁRIO DE ASSUNTOS ADMINISTRATIVOS DO MINISTÉRIO DA SAÚDE, no uso da competência que lhe foi subdelegada pela Portaria/SE nº 328, de 30 de março de 2011, publicada no Diário Oficial da União de 31 de março de 2011, resolve:

Nº 47 - Designar ELAINE CONCEIÇÃO DOS SANTOS para substituir no período de 02/10 a 13/11/2013, o Chefe do Serviço de Gestão Administrativa, DAS-101.1, código 05.0562, do Núcleo Estadual do Ministério da Saúde em Sergipe, da Secretaria Executiva, em virtude de vacância do cargo.

Nº 48 - Designar FLAVIO SPONHOLF OLIVEIRA para exercer o encargo de substituto eventual do Chefe da Divisão de Convênios, DAS-101.2, código 05.0583, do Núcleo Estadual do Ministério da Saúde em Tocantins, da Secretaria Executiva, ficando dispensado a contar de 27/12/2013, LUSCLEIDE NAZARENO MOTA.

Nº 49 - Designar LÉA APARECIDA RIBEIRO para exercer o encargo de substituto eventual do Coordenador de Orçamento, DAS-101.3, código 05.0302, da Coordenação-Geral de Execução Orçamentária, Financeira e Contábil, da Diretoria-Executiva do Fundo Nacional de Saúde, da Secretaria Executiva.

Nº 50 - Designar GILMAR RITTER para responder no período de 31/12/2013 a 19/01/2014, pelo Serviço de Auditoria, DAS-101.1, código 05.0440, do Núcleo Estadual do Ministério da Saúde no Espírito Santo, da Secretaria Executiva.

Nº 51 - Designar LUCIENE CORREIA DA SILVA DIAS para substituir no período de 31/12/2013 a 14/01/2014, o Chefe de Gabinete, DAS-101.4, código 32.0006, da Secretaria de Gestão do Trabalho e da Educação na Saúde, em virtude de afastamento do titular e do substituto eventual.


Nº 52 - Designar HELIO COELHO SILVEIRA DA ROSA para exercer o encargo de substituto eventual do Diretor da Diretoria de Administração do Campus, DAS-101.4, código 45.0140, da Fundação Oswaldo Cruz.

Nº 53 - Designar MARILDA DE SOUZA GONÇALVES para exercer o encargo de substituto eventual do Diretor do Centro de Pesquisa Gonçalo Muniz, DAS-101.4, código 45.0408, da Fundação Oswaldo Cruz.

MARCOS JOSÉ PEREIRA DAMASCENO

Documento assinado digitalmente conforme MP nº 2.200-2 de 24/08/2001, que institui a Infraestrutura de Chaves Públicas Brasileira - ICP-Brasil.

Ministério da Saúde



**iGMnet**  
Facilitando serviços  
Hoje é terça, 16 de julho de 2013

Buscar



Olá, **Luciano!**  
 Bem vindo(a) a Intranet da FIOCRUZ-BA!

acessar meu lattes  
 alterar meus dados

Sair da Intranet

Guia Rápido de Serviços



**Proposta de Projeto**

**Acompanhamento de Propostas**

Mostrar todas (inclusive as propostas aprovadas, negadas e canceladas).

Ocorrências: 6 proposta(s)

ID	Título	Data Início / Submissão	Situação
1113	IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DOS AGENTES VIRAI CAUSADORES DA MENINGITE ASSÉPTICA NO ESTADO DA BAHIA	19/06/2013 (submissão)	Aprovada

**Dados do Coordenador no CPqGM**

Nome: Luciano Kalabric Silva  
 Lotação: LPBM  
 Ramal: 301  
 Subcoordenador: Luciano Kalabric Silva

**Coord. Pesquisa**

Aprovada

**Motivo:**  
 [20/06/2013 10:14:26 - Aprovada] Bethânia: sem observações.

**Dados do Projeto**

Título: IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DOS AGENTES VIRAI CAUSADORES DA MENINGITE ASSÉPTICA NO ESTADO DA BAHIA

Inst. Gestora: Fundação Oswaldo Cruz

Duração Prevista: 36 meses

Editais para financiamento: CNPq - (30/06/2013);

Área de Conhecimento: Ciências da Saúde

Sub-área de Conhecimento: Epidemiologia

Ação (SAGE): 8315 - Pesquisa e Desenvolvimento Tecnológico em Saúde

Finalidade (SAGE): 089 - Geração de conhecimento sobre viroses e rickettsioses humanas

× Pesquisa envolve humanos.  
 × NÃO envolve animais.

**Planejamento**

Aprovada

**Motivo:**  
 [21/06/2013 09:49:05 - Aprovada] Ângela: sem observações.

**Diretoria**

Aprovada

**Motivo:**  
 [25/06/2013 11:39:23 - Aprovada] Manoel: sem observações.


**Contrapartida CPqGM**

- × Informática
- × Infra-estrutura
- × Sequenciamento DNA

**Fonte de Recursos**

Previsão Detalhada de Aporte de Recursos pelo CPqGM

**Cancelar Proposta**



**PLANEJAMENTO CPqGM - 2013**

ADM de conteúdo

**Você administra:**

**Dados da Lotação:**  
 » LPBM

**Serviços:**

**Projetos de Pesquisa (8):**

- » Em Execução
- » A serem iniciados
- » Finalizados

**Projetos P.A. (2):**

- » 2011
- » 2012

**Acompanhe suas solicitações:**

- » AEMs Emitidas pela Lotação (**NOVO**)
- » Informática (116/167)
- » Manutenção - SMN (2/30)
- » Manutenção - OS (1/10)
- » RCO (1)
- » Propostas de Projeto

**ANEXO III – CARTA DE APROVAÇÃO DO CEP-FIOCRUZ-BA**

**PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP**

**DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

**Título da Pesquisa:** IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DOS AGENTES VIRAIS CAUSADORES DA MENINGITE ASSÉPTICA NO ESTADO DA BAHIA

**Pesquisador:** LUCIANO KALABRIC SILVA

**Área Temática:**

**Versão:** 4

**CAAE:** 18858613.3.0000.0040

**Instituição Proponente:** Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz - CPqGM/ FIOCRUZ/ BA

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

**DADOS DO PARECER**

**Número do Parecer:** 613.123

**Data da Relatoria:** 27/03/2014

**Apresentação do Projeto:**

Meningites assépticas são definidas como uma síndrome aguda de inflamação das meninges, nas quais não são detectados microrganismos por testes microbiológicos. O objetivo deste trabalho é a identificação molecular dos agentes virais causadores da meningite asséptica no Estado da Bahia. O desenvolvimento desta pesquisa irá contribuir primariamente na validação de métodos moleculares para o diagnóstico laboratorial dos principais agentes virais causadores da meningite asséptica e a criação de um sistema de vigilância epidemiológica molecular no estado da Bahia.

**Objetivo da Pesquisa:**

Objetivo Primário:

- Identificar os agentes virais responsáveis por casos de meningite asséptica e estabelecer um sistema de vigilância epidemiológica para este agravo.

Objetivo Secundário:

- Validar o diagnóstico molecular das meningites virais utilizando o PCR convencional, multiplex convencional e/ou PCR em tempo real, quando possível, para identificar os grupos e os agentes separadamente;- Descrever o perfil epidemiológico das meningites virais nos pacientes atendidos no Hospital Couto Maia-BA;- Criar um sistema de vigilância epidemiológica molecular para monitoramento dos diferentes agentes identificados.

**Endereço:** Rua Waldemar Falcão, 121

**Bairro:** Candeal

**CEP:** 40.296-710

**UF:** BA

**Município:** SALVADOR

**Telefone:** (71)3176-2327

**Fax:** (71)3176-2285

**E-mail:** cep@bahia.fiocruz.br

**CENTRO DE PESQUISAS  
GONÇALO MONIZ -  
FIOCRUZ/BA**



Continuação do Parecer: 613.123

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

Riscos:

Os riscos são mínimos e estão associados à coleta de dados de prontuários. Entretanto, asseguramos o sigilo e confidencialidade dos dados através de um sistema de banco de dados de pesquisa protegido por senha. Em relação à coleta de amostras, não há riscos adicionais, pois pretendemos analisar amostras biológicas já coletadas pelo hospital para o diagnóstico.

Benefícios:

Há benefício ao sujeito da pesquisa pela identificação do agente causador da meningite durante o acompanhamento médico (diagnóstico). Além disso, o conhecimento obtido da pesquisa poderá permitir ao sistema de saúde planejar ações para prevenir ou minimizar os risco de transmissão e avaliação de vacinas.

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

A pesquisa atende aos princípios científicos. Informa os riscos e benefícios e tem relevancia para a saúde pública.

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Todos apresentados.

**Recomendações:**

Sem recomendações.

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Aprovado.

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

**Considerações Finais a critério do CEP:**

**Endereço:** Rua Waldemar Falcão, 121

**Bairro:** Candeal

**CEP:** 40.296-710

**UF:** BA

**Município:** SALVADOR

**Telefone:** (71)3176-2327

**Fax:** (71)3176-2285

**E-mail:** cep@bahia.fiocruz.br

CENTRO DE PESQUISAS  
GONÇALO MONIZ -  
FIOCRUZ/BA



Continuação do Parecer: 613.123

SALVADOR, 11 de Abril de 2014

---

**Assinador por:**  
**Adriana Lanfredi Rangel**  
**(Coordenador)**

**Endereço:** Rua Waldemar Falcão, 121

**Bairro:** Candeal

**CEP:** 40.296-710

**UF:** BA

**Município:** SALVADOR

**Telefone:** (71)3176-2327

**Fax:** (71)3176-2285

**E-mail:** cep@bahia.fiocruz.br

**ANEXO IV – CARTA DE APROVAÇÃO DO CEP-HCM**



Salvador, 03 de junho de 2014.

Ofício CEP nº 01/2014

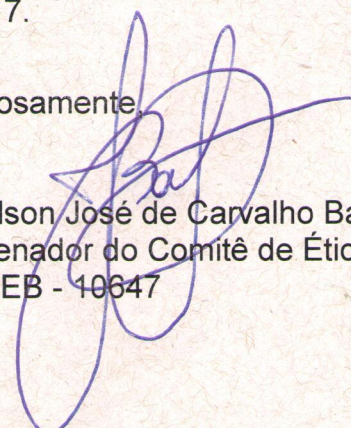
Ilmo. Sr.  
LUCIANO KALABRIC SILVA

Prezado Senhor,

Com base no Parecer Consubstanciado emitido pelo Comitê de Ética em Pesquisa da FIOCRUZ, número 401.706, datado de 20/09/2013, referente relativo o projeto de pesquisa **Identificação Molecular dos Agentes Virais Causadores da Meningite Asséptica no Estado da Bahia**, CAAE nº 18858613.3.0000.0040, comunicamos nossa concordância com o desenvolvimento da pesquisa no Hospital Couto Maia

Informamos ao pesquisador a necessidade de apresentar também a este Comitê relatórios parciais anualmente (09/2014; 09/2015; 09/2016) e final em 01/2017.

Atenciosamente,

  
Claudilson José de Carvalho Bastos  
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa - HCM  
CREMEB - 10647