

**FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO GONÇALO MONIZ**

Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**IDENTIFICAÇÃO DE AGENTES ETIOLÓGICOS VIRAIS DE CASOS DE
ENCEFALITES E OUTRAS SÍNDROMES NEUROLÓGICAS AGUDAS**

MARIA PAULA DE SOUZA SAMPAIO

Salvador – Bahia

2022

**FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO GONÇALO MONIZ**

Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa

**IDENTIFICAÇÃO DE AGENTES ETIOLÓGICOS VIRAIS DE CASOS DE
ENCEFALITES E OUTRAS SÍNDROMES NEUROLÓGICAS AGUDAS**

MARIA PAULA DE SOUZA SAMPAIO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa para obtenção do título de Mestre.

Orientador: Dr. Tiago Gräf
Coorientadora: Dra. Isadora Cristina de Siqueira

Salvador – Bahia

2022

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

S192i Sampaio, Maria Paula de Souza.

Identificação de agentes etiológicos virais de casos de encefalites e outras síndromes neurológicas agudas/ Maria Paula de Souza Sampaio. _ Salvador, 2022.

51 f.: il.: 30 cm

Orientador: Dr. Tiago Gräf

Coorientadora: Dra. Isadora Cristina de Siquiera

Dissertação (Mestrado em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa) – Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, 2022.

1. Encefalites virais. 2 Herpesvírus. 3. Arbovírus. 3. Diagnóstico molecular. 4. Bahia. I. Título.

CDU 616.-022.6

"IDENTIFICAÇÃO DE AGENTES ETIOLÓGICOS VIRAIS DE CASOS DE ENCEFALITES E OUTRAS SÍNDROMES NEUROLÓGICAS AGUDAS".

MARIA PAULA DE SOUZA SAMPAIO

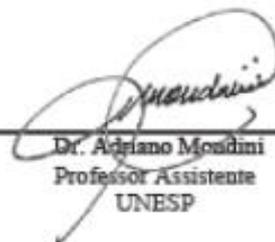
FOLHA DE APROVAÇÃO

Salvador, 29 de agosto de 2022.

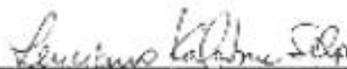
COMISSÃO EXAMINADORA



Dr. William Marciel de Souza
Pesquisador em nível de Pós-Doutorado
UNIVERSITY OF TEXAS



Dr. Adriano Moudini
Professor Assistente
UNESP



Dr. Luciano Kalabric Silva
Pesquisador
IGM/FIOCRUZ/BA

FONTES DE FINANCIAMENTO

"O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

À CAPES pelo fomento, apoio financeiro e consolidação do programa de pós-graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa.

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia (FAPESB).

Programa De Excelência Em Pesquisa PROEP/IGM/2020.

Instituto Serrapilheira.

AGRADECIMENTOS

Aos meus orientadores, Dr. Tiago e Dra. Isadora, pela orientação paciente, por todo aprendizado passado e pelos estímulos dados.

A todos os estudantes do LAPEX, que de alguma forma me ajudaram enquanto eu desenvolvia meu trabalho, seja nos experimentos ou na convivência e amizade.

À Fiocruz Bahia, pela estrutura e oportunidade de desenvolvimento da pesquisa.

À FAPESB, pelo auxílio financeiro.

Aos meus pais e à minha família, que sempre apoiaram as minhas decisões e me deram o privilégio e oportunidade de estudar para alcançar meus objetivos.

A todos meus amigos que me ajudaram emocionalmente durante o período do Mestrado.

SAMPAIO, Maria Paula de Souza. **Identificação de agentes etiológicos virais de casos de encefalites e outras síndromes neurológicas agudas, Brasil**. 2022. 51 f. il. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa) – Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, 2022.

RESUMO

INTRODUÇÃO: A encefalite é uma síndrome neurológica grave. O termo se refere a um processo inflamatório no parênquima cerebral que pode estar relacionado à autoimunidade ou outras etiologias, mas pode ser devido a uma infecção por agentes virais. Dentre os vírus causadores de encefalites, a família *Herpesviridae* é a causa mais comum, seguido pelos enterovírus. Os vírus transmitidos por artrópodes (arbovírus) são o terceiro e mais diverso grupo de patógenos com uma importante associação epidemiológica com as encefalites. No Brasil, pouco se conhece a respeito dos agentes causadores de encefalites e outras síndromes neurológicas agudas. Isso se deve, em parte, à dificuldade de se identificar os agentes etiológicos desta doença, devido à dificuldade de acesso ao sistema nervoso central e à baixa viremia nesse compartimento corporal. **OBJETIVO:** Neste trabalho pretende-se identificar os agentes virais associados a casos de encefalites através de diversos métodos laboratoriais. **MATERIAIS E MÉTODOS:** Foram realizadas técnicas de diagnóstico molecular (PCR, RT-PCR e qPCR) e sorológico (detecção de IgM vírus específico e antígenos virais) com amostras de LCR e soro de pacientes com suspeitas de encefalites e outras síndromes neurológicas agudas. **RESULTADOS:** Foram incluídos 43 pacientes internados nos hospitais participantes. Dentre as comorbidades apresentadas pelos pacientes, hipertensão arterial sistêmica foi a mais frequente. Antes dos sintomas neurológicos, 32,5% dos indivíduos referiram a presença de sintomas de infecção viral. Os sintomas virais mais frequentes que antecederam os sintomas neurológicos foram febre (71,4%) e artralgia (50%). Os principais sintomas neurológicos na admissão hospitalar foram confusão mental (32,5%) e sonolência (30,2%). Todos os exames do LCR foram considerados alterados e com aumento de celularidade. Nove pacientes (20,9%) testaram positivo na sorologia antivírus chikungunya (CHIKV) IgM. Através do qPCR Multiplex foi detectado CHIKV em duas amostras de soro e em uma amostra de LCR e todas as amostras tiveram resultado negativo para os vírus Zika e dengue. Na sorologia IgM anti-DENV houve um resultado positivo (3%) e na pesquisa do antígeno NS1 DENV obtivemos dois resultados positivos (6%). O qPCR Neuro 9 detectou três resultados positivos para o vírus Epstein-Barr (7,5%), dois para o adenovírus humano (5%), um para enterovírus (2,5%) e um para o vírus varicela-zoster (2,5%). **CONCLUSÕES:** Estes resultados sugerem um importante papel do CHIKV como eventual causador de encefalites e contribuem com novas informações sobre a epidemiologia de encefalites no Brasil.

Palavras-Chave: Encefalites virais. Herpesvírus. Arbovírus. Diagnóstico molecular. Bahia.

SAMPAIO, Maria Paula de Souza. **Identification of viral etiologic agents in cases of encephalitis and other acute neurological syndromes, Brazil.** 2022. 51 f. il. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa) – Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, 2022.

ABSTRACT

INTRODUCTION: Encephalitis is a serious neurological syndrome. The term refers to an inflammatory process in the brain parenchyma that may be related to autoimmunity or other etiologies, but may be due to infection with viral agents. Among the viruses that cause encephalitis, the Herpesviridae family is the most common cause, followed by enteroviruses. Arthropod-borne viruses (arboviruses) are the third and most diverse group of pathogens with an important epidemiological association with encephalitis. In Brazil, little is known about the causative agents of encephalitis and other acute neurological syndromes. This is partly due to the difficulty in identifying the etiological agents of this disease, due to the difficulty of access to the central nervous system and the low viremia in this body compartment. **OBJECTIVE:** The aim of this work is to identify the viral agents associated with cases of encephalitis through different laboratory methods. **MATERIALS AND METHODS:** Molecular (PCR, RT-PCR and qPCR) and serological (detection of virus-specific IgM and viral antigens) diagnostic techniques were performed with CSF and serum samples from patients with suspected encephalitis and other acute neurological syndromes. **RESULTS:** 43 patients admitted to participating hospitals were included. Among the comorbidities presented by the patients, systemic arterial hypertension was the most frequent. Before the neurological symptoms, 32.5% of the individuals reported the presence of symptoms of viral infection. The most frequent viral symptoms that preceded the neurological symptoms were fever (71.4%) and arthralgia (50%). The main neurological symptoms at hospital admission were mental confusion (32.5%) and drowsiness (30.2%). All CSF exams were considered altered and with increased cellularity. Nine patients (20.9%) tested positive for chikungunya antiviral (CHIKV) IgM serology. Through qPCR Multiplex, CHIKV was detected in two serum samples and in one CSF sample, and all samples were negative for Zika and dengue viruses. In the anti-DENV IgM serology there was a positive result (3%) and in the search for the NS1 DENV antigen we obtained two positive results (6%). The Neuro 9 qPCR detected three positive results for Epstein-Barr virus (7.5%), two for human adenovirus (5%), one for enterovirus (2.5%) and one for varicella-zoster virus (2.5%). **CONCLUSIONS:** These results suggest an important role of CHIKV as an eventual cause of encephalitis and contribute with new information on the epidemiology of encephalitis in Brazil.

Keywords: viral encephalitis. Herpesvirus. Enterovirus. Arbovirus. Molecular diagnosis.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	10
2	REVISÃO DE LITERATURA	12
2.1	ENCEFALITES VIRAIS	12
2.2	ENCEFALITES CAUSADAS POR HERPESVÍRUS E ENTEROVÍRUS	13
2.3	ENCEFALITES CAUSADAS POR ARBOVÍRUS	14
2.4	EPIDEMIOLOGIA DAS ENCEFALITES VIRAIS NO BRASIL	17
3	OBJETIVOS	20
3.1	OBJETIVO GERAL	20
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	20
4	MATERIAIS E MÉTODOS	21
4.1	POPULAÇÃO DE ESTUDO E CRITÉRIOS DE INCLUSÃO	21
4.1.1	Aspectos éticos	22
4.2	COLETA E GERENCIAMENTO DE DADOS	22
4.3	OBTENÇÃO E PROCESSAMENTO DE AMOSTRAS BIOLÓGICAS	22
4.4	DIAGNÓSTICO MOLECULAR	23
4.5	DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO	24
4.6	PROPOSTA DE ANÁLISE	25
5	RESULTADOS	26
6	DISCUSSÃO	35
7	CONSIDERAÇÕES FINAIS	40
	REFERÊNCIAS	41

1 INTRODUÇÃO

Dentre diversas síndromes neurológicas agudas, as encefalites são as mais comuns e são definidas como uma inflamação do parênquima cerebral. Geralmente causam quadro neurológico complexo e grave, que está associado a significativa morbidade e mortalidade (GLASER et al., 2006). Os principais sintomas das encefalites agudas são febres, cefaleia e diminuição da consciência, que pode variar de confusão mental ao coma, e podem estar associados a convulsões e sinais neurológicos focais (VENKATESAN et al., 2013). O resultado de uma infecção viral ao sistema nervoso central (SNC) é determinado tanto pela resposta imune do hospedeiro, como pela neurovirulência do vírus infectante (KENNEDY, 2005).

Infecções virais são a causa mais comum das encefalites (TUNKEL et al., 2008). Os vírus mais conhecidos por causar encefalites em todo o mundo são os herpesvírus, que afetam principalmente idosos e crianças e são responsáveis por casos esporádicos de encefalites, não associados com surtos e epidemias (FERREIRA et al., 2019; KENNEDY; QUAN; LIPKIN, 2017). Os enterovírus também podem causar encefalites e, apesar de efeitos neurológicos serem raros, o alto número de infecções por estes vírus faz com que eles sejam o segundo principal agente etiológico mais relacionado à encefalite (VENKATESAN; MURPHY, 2018). Por fim, arbovírus também são responsáveis por causar a doença, em que se destacam o vírus da encefalite de Saint Louis (SLEV), os vírus das encefalites equinas do Leste, venezuelana e do Oeste (EEEV, VEEV e WEEV) e o vírus do Oeste do Nilo (WNV), que possuem sua circulação descrita nas Américas (TYLER, 2018). Ao contrário dos herpesvírus e enterovírus, surtos de encefalites causados por arbovírus podem ocorrer, aumentando a importância da vigilância epidemiológica destes.

Entretanto, a identificação do agente etiológico de casos de encefalites é complexa. Muitos casos permanecem com etiologia desconhecida, variando entre 40-60% (GLASER et al., 2003; KAHWAGI et al., 2022). Há uma grande variedade de agentes virais passíveis de causar encefalites e sua ocorrência varia de acordo com a localização geográfica, estação do ano e *status* imunológicos do paciente (COSTA; SATO, 2019). Desta forma, um grande leque de possibilidades precisa ser investigado no líquido, que é a amostra biológica preferencial para se investigar doenças do sistema nervoso central, mas sua coleta é difícil e geralmente rende um pequeno volume.

Atualmente, os dados sobre a epidemiologia, caracterização clínica, morbidade e etiologia das encefalites virais no Brasil ainda são poucos. Apenas os casos de encefalites que possuem um diagnóstico viral confirmado com algum vírus que represente um agravo de notificação compulsória são notificados, como por exemplo, casos de infecção pelos vírus da dengue (DENV), zika (ZIKV) e chikungunya (CHIKV) (BRASIL, 2016). Além disso, casos de encefalites causados por WNV têm sido notificados no país (MARTINS et al., 2019; PAUVOLID-CORRÊA et al., 2015), alertando para a emergência e risco de expansão deste vírus.

Neste cenário, o presente estudo pretende caracterizar perfis clínicos de pacientes com suspeita de encefalite viral em hospitais de municípios da Bahia e identificar o agente etiológico causador da patologia. Com isso, pretende-se gerar dados epidemiológicos sobre esta doença e os vírus mais comumente associados, possibilitando um diagnóstico eficaz e uma melhor caracterização clínica da doença relacionada ao seu agente etiológico.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 ENCEFALITES VIRAIS

A encefalite viral ocorre quando há uma infecção viral no parênquima cerebral e se apresenta mais comumente de forma aguda, com um processo inflamatório que é responsável pelos danos ao sistema nervoso central (KENNEDY, 2005). Os sintomas clínicos mais frequentes são febre, dor de cabeça e alteração do nível de consciência, mas também pode ocorrer desorientação, distúrbios comportamentais e da fala, sinais neurológicos focais ou difusos, além de crises convulsivas (WHITLEY; GNANN, 2002). Existem ainda outras síndromes neurológicas agudas com sintomatologia muito semelhante às encefalites e a diferenciação entre elas é complexa. Uma vez que as encefalopatias são a forma mais comum de síndrome neurológica aguda, esse termo é usado de forma generalizada para descrever a doença.

A encefalite viral possui consideráveis taxas de morbidade e mortalidade e pode causar sequelas neurológicas permanentes. Entre 1988 e 1997, ocorreram cerca de 7,3 internações associadas à encefalite a cada 100 mil pessoas anualmente nos Estados Unidos (EUA), com aproximadamente 1.400 mortes por ano, resultando num custo anual estimado de US\$630 milhões no período estudado (KHETSURIANI; HOLMAN; ANDERSON, 2002) e entre 1998 e 2010 ocorreram cerca de 263.352 internações (VORA et al., 2014). Apesar da incidência anual de encefalite ser de 0,07 a 12,6 casos a cada 100 mil indivíduos no mundo todo, distúrbios graves foram relatados em até 56% dos sobreviventes e as taxas de mortalidade variam entre 7% e 18% (GRANEROD et al., 2010).

O diagnóstico das encefalites virais depende dos sinais clínicos, exames físicos e neurológicos, dados epidemiológicos e de informações que podem guiar os testes a serem realizados (TYLER, 2018). A rápida identificação do agente etiológico é de extrema importância para estabelecer o prognóstico do paciente. A forma mais rápida e específica de se identificar o agente causador da encefalite é a detecção de ácido nucleico específico no líquido cefalorraquidiano (LCR).

As técnicas mais utilizadas para se identificar agentes relacionados à encefalite incluem principalmente o isolamento do vírus, a reação em cadeia de polimerase (PCR), sorologia e, mais recentemente, a metagenômica por sequenciamento de nova geração (NGS) (WILSON et al., 2019). O isolamento viral em cultura de células é o método clássico para o

diagnóstico, porém, requer um tempo maior para ser conclusivo e isso pode prejudicar o manejo do paciente. Em contrapartida, o PCR consegue fornecer resultados quase imediatos e está se tornando o teste preferível para detectar vírus em LCR (DEBIASI; TYLER, 2004). Além disso, também pode se realizar o diagnóstico da etiologia da doença através da detecção específica de anticorpos em sangue ou LCR. Entretanto, esse método fornece evidências menos conclusivas pois não representam a identificação direta do patógeno no sítio da infecção ou no momento de apresentação do quadro clínico (STEINER et al., 2010).

Apesar da existência e aplicação desses avançados métodos, a taxa de diagnóstico diferencial da encefalite viral permanece baixa em todo o mundo, sendo que em quase 70% dos casos, o agente etiológico permanece desconhecido (FENG et al., 2020). Dentre os casos identificados, os vírus mais comumente notificados em casos de encefalite aguda são herpesvírus e enterovírus (COSTA; SATO, 2019).

2.2 ENCEFALITES CAUSADAS POR HERPESVÍRUS E ENTEROVÍRUS

Herpesvírus são grandes vírus de DNA que são disseminados entre os animais. Relacionados às encefalites se destacam o herpes simplex (HSV) 1 e 2, pertencente ao gênero *Simplexvirus* e o vírus varicela zoster (VZV), pertencente ao gênero *Varicellovirus*, ambos pertencentes à família *Herpesviridae*, e à subfamília *Alfa-herpesviridae* (KAEWPOOWAT et al., 2016). Esses vírus causam infecções ao longo da vida e podem ocasionar manifestações neurológicas graves e infecções neonatais fatais (NORBERG, 2010). A maioria dos pacientes com encefalite por HSV apresenta sintomas inespecíficos, como febre, dor de cabeça, alterações no comportamento e confusão mental, e as manifestações clínicas evoluem em poucos dias, com cerca de um terço dos pacientes em coma (VENKATESAN; MURPHY, 2018).

Sabe-se que o HSV é a causa mais comum da encefalite infecciosa na maioria dos países, representando 50-75% dos casos (TYLER, 2018). A encefalite por HSV é causada, em maior parte, pelo HSV-1, porém, em populações neonatais o HSV-2 predomina (WHITLEY, 1991). O HSV-1 é responsável por cerca de 10% a 20% de todos os casos anuais de encefalite nos EUA, a incidência é estimada em 2,2 casos por 1.000.000 habitantes (SILVA, 2013). O VZV é a segunda causa mais comum de encefalites virais no mundo (VENKATESAN; MURPHY, 2018). Um estudo epidemiológico realizado nos EUA, em 2014, mostrou que o

VZV representou 0,4% das causas de encefalite com uma taxa de mortalidade semelhante à da encefalite do HSV (GEORGE; SCHNEIDER; VENKATESAN, 2014).

Enterovírus (EV) são vírus de RNA senso-positivo membros da família *Picornaviridae*, gênero *Enterovirus*, e são classificados em mais de 70 sorotipos diferentes. O enterovírus neurotrópico mais conhecido é o poliovírus, porém, devido ao sucesso da vacinação anti-pólio, as encefalites por este EV são muito raras. Enterovírus não-pólio também são conhecidos por infectar o SNC e, atualmente, causam a maioria das infecções enterovirais com distúrbios neurológicos (CHEN et al., 2020). Os EVs são as causas mais comuns de infecção neonatal e as suas infecções são, na maioria das vezes, assintomáticas. Entretanto, podem apresentar algumas manifestações clínicas, como febre, exantemas, doença respiratória, dor de garganta, miocardite, vômito, diarreia e doença semelhante à sepsse em recém-nascidos e bebês (POSNAKOGLOU et al., 2021). Cerca de 58% dos bebês/crianças e 52% dos adultos nos EUA diagnosticados com encefalite/meningite são decorrentes de enterovírus (CHEN et al., 2020).

Dentre os sorotipos de enterovírus, o EV-71 vem sendo associado a vários surtos e casos esporádicos de infecção do SNC e ocorre mundialmente (KOMATSU et al., 1999). Em 1978, por exemplo, uma epidemia grave de doenças agudas do SNC ocorreu na Hungria, com 1550 casos, sendo 724 de encefalite (6,8 por 100 mil) e 826 meningites assépticas (7,7 por 100 mil). Durante esse período, foi realizada pesquisa de anticorpos com amostras de sangue de 1050 pacientes, sendo 593 positivas para EV-71. Por outras técnicas ainda identificaram E-71 em 145 de 323 amostras de líquido (NAGY et al., 1982).

2.3 ENCEFALITES CAUSADAS POR ARBOVÍRUS

Os vírus transmitidos por artrópodes, mais conhecidos como arbovírus, têm merecido uma importância como patógenos que circulam entre animais silvestres e humanos por causarem doenças graves. Esses vírus são transmitidos através da picada de vetores, que são principalmente mosquitos e carrapatos.

Os arbovírus apresentam uma crescente incidência mundial, além de alguns deles possuírem alto tropismo para invasão do SNC (MILHIM et al., 2020). Diversos arbovírus estão associados à encefalite, principalmente os pertencentes ao gênero *Flavivirus*, como o vírus da encefalite japonesa (JEV), o vírus do Nilo Ocidental (WNV) e o vírus da encefalite de Saint Louis (SLEV); e ao gênero *Alfavirus*, como os vírus da encefalite equina oriental,

ocidental e venezuelano (EEEV, WEEV e VEEV, respectivamente) (SALIMI; CAIN; KLEIN, 2016).

Esses vírus são mantidos em um ciclo zoonótico, onde aves, morcegos ou roedores são hospedeiros amplificadores naturais, com outros vertebrados, como equinos e humanos, sendo apenas hospedeiros acidentais. Outros vírus pertencentes aos gêneros *Flavivirus*, como ZIKV, DENV, e *Alfavírus*, como CHIKV e Mayaro vírus também podem causar encefalites, mas com uma frequência menor (TERZIAN et al., 2011).

O JEV é a causa arboviral mais frequente de encefalite em todo o mundo e tem se espalhado pela maior parte da Ásia, causando surtos (WEAVER; REISEN, 2010). A incidência global da encefalite japonesa é desconhecida, visto que a vigilância e a disponibilidade de testes laboratoriais de diagnóstico variam em todo o mundo. Através de um estudo realizado por Campbell e colaboradores, foi possível estimar que aproximadamente 67.900 casos de encefalite japonesa ocorrem anualmente em países endêmicos, como China, Japão, Coreia do Sul, Austrália, Índia, Paquistão, Rússia e diversos países do sudeste asiático, com uma incidência de 1,8 por 100.000 habitantes (CAMPBELL et al., 2011).

O SLEV, por sua vez, é amplamente disperso nas Américas, do Canadá à Argentina (DA SILVA HEINEN et al., 2015). O vírus foi identificado pela primeira vez na década de 1930, após surtos de encefalite ao redor da cidade de Saint Louis, no Missouri, Estados Unidos (WEBSTER; FITE, 1933). Esporadicamente ele é responsável por surtos de encefalites virais, mas em número bem menor se comparado ao JEV e WNV.

O WNV é comumente encontrado na África, Europa, Oriente Médio, América do Norte e Ásia Ocidental, o seu ciclo envolve transmissão entre aves e mosquitos e assim o vírus é mantido na natureza (BENJELLOUN; EL HARRAK; BELKADI, 2016). O vírus emergiu nos Estados Unidos em 1999, num surto em Nova York e é a causa mais importante de encefalites na América do Norte (KHETSURIANI; HOLMAN; ANDERSON, 2002). Esse surto causou cerca de 8.200 infecções humanas, resultando em aproximadamente 1.700 casos de febre do WNV, que é caracterizada por uma febre de baixo grau (MOSTASHARI et al., 2001). Entre 1999 e 2012, foi registrado um total de 16.196 pacientes com doença neuroinvasiva do WNV e 1.549 mortes nos EUA (PETERSEN; BRAULT; NASCI, 2013).

Após sua introdução nos EUA, o WNV se espalhou por países da América Latina. Em 2002, foi identificado em cavalos e galinhas em Guadalupe, em pássaros na República Dominicana e em cavalos no México. Nos anos seguintes, se espalhou para El Salvador, Guatemala, Belize, Cuba, Porto Rico, Bahamas, Haiti, Trinidad, Colômbia e Venezuela. Em

2005, aves infectadas por WNV foram identificadas na Argentina (BEATTY et al., 2007; BOSCH et al., 2007; DIAZ et al., 2008; KOMAR; CLARK, 2006). Apesar dessa rápida expansão pelas Américas, casos de encefalites causados por WNV ainda são raros fora dos EUA. Entretanto, mudanças climáticas e a expansão de áreas urbanas para zonas de florestas podem mudar o cenário atual e aproximar o ser humano, um hospedeiro acidental do vírus, de animais reservatórios.

Epidemias não são causadas pela maioria dos arbovírus com tropismo pelo SNC, como WNV, JEV, SLEV e os vírus das encefalites equinas. Isto ocorre, pois, um artrópode que se alimente do sangue de um ser humano infectado por esses vírus, não é capaz de se infectar e transmitir para outro ser humano (TYLER, et al, 2018). Entretanto, arbovírus como DENV, ZIKV e CHIKV são capazes de estabelecer ciclos urbanos através da infecção humano-artrópode-humano e dessa forma causar epidemias. Casos de encefalites são raramente associados a estes vírus, mas, em momentos de epidemia, eles podem ser detectados devido ao grande número de pessoas infectadas.

A dengue é endêmica em mais de 100 países e estima-se que ocorrem 50 a 100 milhões de infecções e 25.000 mortes a cada ano no mundo todo (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2015). As Américas registraram mais de 3 milhões de casos de dengue em 2019, segundo a última atualização epidemiológica da Organização Pan-Americana da Saúde (OPAS) (PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION, 2020) e 1.206 mortes de janeiro a outubro, dos quais mais de 1,2 milhão foram confirmados laboratorialmente e mais de 22 mil foram classificados como dengue grave (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2019). ZIKV e CHIKV são vírus emergentes e ganharam importância mundial após os anos 2000, com grandes epidemias em ilhas do Oceano Pacífico e posteriormente nas Américas (PAIXÃO; TEIXEIRA; RODRIGUES, 2018).

A infecção pelo ZIKV era considerada uma doença autolimitada, com manifestações clínicas representadas por febre de baixo grau, erupção cutânea maculopapular, mialgia, artralgia, dor de cabeça e conjuntivite (DUFFY et al., 2009). Entretanto, em 2013, complicações neurológicas foram observadas em pacientes durante um surto de ZIKV na Polinésia Francesa, onde vários indivíduos apresentaram síndrome de Guillain-Barré (SGB) (IOOS et al., 2014). A SGB é a causa mais comum de paralisia facial e possui cerca de 100.000 novos casos anualmente em todo o mundo (SEJVAR et al., 2011; SHAHRIZAILA et al., 2021). Na maioria dos pacientes, a doença possui um início agudo dos sintomas neurológicos, que é precedido por uma doença infecciosa (JACOBS et al., 1998).

Dentre estes três vírus, CHIKV é o que mais vem sendo associado a encefalites. Um trabalho realizado na ilha de La Reunion, durante uma epidemia de CHIKV entre setembro de 2005 e junho de 2006, encontrou uma incidência de encefalites de 187 por 100.000 indivíduos em bebês, e 37 por 100.000 em adultos com mais de 64 anos de idade (GÉRARDIN et al., 2016). Outro estudo semelhante, realizado na Índia, investigou complicações neurológicas associadas ao CHIKV, mostrando que a encefalite foi a síndrome mais comum entre os infectados, presente em 55% dos pacientes com doenças neurológicas (CHANDAK et al., 2009).

2.4 EPIDEMIOLOGIA DAS ENCEFALITES VIRAIS NO BRASIL

No Brasil, estudos investigando os agentes etiológicos de encefalites são escassos, sendo que só em 2018, foram registradas 2.075 internações hospitalares por encefalites virais no Sistema Único de Saúde (SUS) (SILVEIRA, 2020). O estudo de Ferreira e colaboradores, feito em São Paulo, encontrou que EVs eram os principais causadores de encefalites entre as amostras de Líquor onde foi possível se fazer um diagnóstico. Herpesvírus foram os mais frequentes se considerados juntos diferentes membros da família, como HSV, vírus Epstein-Barr e citomegalovírus (FERREIRA et al., 2019). Da mesma forma, no trabalho conduzido por Bastos e colaboradores (2014), em Manaus, foram identificados EVs como os principais causadores de encefalites, sendo responsáveis por 35% das amostras de líquido positivas para algum dos vírus neurotrópicos investigados (BASTOS et al., 2014). Juntos, esses trabalhos sugerem um padrão distinto dos principais vírus causadores de encefalites, quando comparado o Brasil a outros países.

Devido a condições climáticas e urbanização não planejada, no Brasil há um risco elevado para a disseminação de arbovírus para humanos, isso se deve ao fato do país possuir centros urbanos infestados por vetores, como os mosquitos do gênero *Aedes* e *Culex*. A dengue, por exemplo, é uma doença muito comum no Brasil, tendo sido registrados 4.243.049 casos e 338 mortes entre os anos de 1981 e 2006 (NOGUEIRA; DE ARAÚJO; SCHATZMAYR, 2007). Em 2020, até o mês de novembro, foram notificados 987.173 casos prováveis (taxa de incidência de 469,8 casos por 100 mil habitantes) de dengue no país (SAÚDE, 2021). Em 2022, até o presente momento, ocorreram 90.335 casos prováveis de dengue (taxa de incidência de 42,3 casos por 100 mil habitantes), comparando com o mesmo período analisado de 2021, houve um aumento de 43,2% de casos registrados (Secretaria de

Vigilância em Saúde, 2022). Encefalites são raramente associadas à dengue, porém, durante um estudo realizado na epidemia da dengue em Vitória, estado do Espírito Santo, 18 pacientes, de 85 com diagnóstico confirmado de dengue, manifestaram algum sintoma neurológico, sendo 11 desses casos classificados como encefalite (DOMINGUES et al., 2008).

CHIKV e ZIKV foram introduzidos no Brasil entre 2014 e 2015 e causaram surtos epidêmicos desde então (PAIXÃO; TEIXEIRA; RODRIGUES, 2018). Enquanto ZIKV tem seu tropismo pelo SNC mais associado com a gestação e o desenvolvimento de microcefalia, estudos recentes sugerem uma relação entre encefalites e infecção por CHIKV (DE LIMA et al., 2020b). Em 2020, De Lima e colaboradores relataram um caso fatal de um paciente internado com sintomas característicos de encefalite e presença de anticorpos IgM anti-CHIKV no LCR. (DE LIMA et al., 2020a).

Até então, o maior surto de encefalites já registrado no Brasil ocorreu na década de 1970, no Vale do Ribeira, estado de São Paulo, e foi causado pelo arbovírus Rocio (ROCV). O surto terminou em 1976 com 1.021 indivíduos infectados, 100 mortes e deixando centenas de pessoas com sequelas neuronais (NEVES; MACHADO, 2016). A caracterização genômica completa deste vírus isolada de um caso fatal desse surto foi publicada apenas em 2007 (MEDEIROS et al., 2007).

O SLEV foi identificado pela primeira vez no Brasil na década de 1960, no estado do Pará, na região norte do país (PINHEIRO et al., 1981). O primeiro isolamento de SLEV de um caso humano que se pensava ser dengue ocorreu no estado de São Paulo, em 2004 (ROCCO et al., 2005). Mais recentemente, um surto de manifestações hemorrágicas foi ligado ao SLEV, o qual foi concomitante com um grande surto do sorotipo 3 de DENV, em 2006 (MONDINI et al., 2007b). A circulação de SLEV tem sido relatada nas regiões Sudeste e Centro-Oeste nos últimos anos, apresentando na maioria das vezes sintomas leves (DA SILVA; HEINEN et al., 2015; DÍAZ et al., 2012; MONDINI et al., 2007a, 2007c; TERZIAN et al., 2011). Mais recente, foi descrita a circulação do vírus do SLEV em dois estados brasileiros, São Paulo e Mato Grosso, durante surtos de DENV e ZIKV (MORAES et al., 2022). De forma geral, a epidemiologia do SLEV em humanos ainda é pouco entendida e os relatos de surtos no Brasil são esporádicos.

O primeiro relato contendo evidências sorológicas da circulação do WNV no Brasil ocorreu em 2008, na região do Pantanal, no Centro-Oeste do Brasil. Amostras de três dos 38 cavalos e uma das 31 galinhas testadas deram resultado positivo para WNV, evidenciando

assim a circulação do vírus em animais no Pantanal (PAUVOLID-CORRÊA et al., 2011). Em outro estudo, em 2014, realizou-se a detecção de equinos soropositivos para WNV em 10 fazendas no Pantanal, além de equinos soropositivos para o Vírus Ilhéus e SLEV em 14 fazendas da mesma região (PAUVOLID-CORRÊA et al., 2014). O primeiro caso humano registrado de infecção por WNV no Brasil, ocorreu em agosto de 2014 no estado do Piauí, no qual o paciente deu entrada em um hospital apresentando encefalite aguda e paralisia flácida (VIEIRA et al., 2015). Desde então, a Secretaria de Saúde do estado do Piauí já notificou sete casos de infecções pelo WNV, gerando um sinal de alerta aos sistemas de vigilância epidemiológica dos estados brasileiros, principalmente da região nordeste, sobre o potencial de emergência de surtos de encefalites causados por este arbovírus (SESAPI, 2021). Além disso, dados genômicos sugerem que há pelo menos dois clados do vírus no Brasil, originados de introduções distintas que ocorreram a partir de 2010. Tais amostras foram isoladas na Bahia e no Ceará, alertando novamente para a iminente emergência de surtos de WNV na região nordeste do país (FRITSCH et al., 2022).

O monitoramento da circulação de arbovírus neurotrópicos no Brasil é de fundamental importância. O país possui potencial de transmissão de arboviroses, devido a características climáticas e de saneamento básico. Entretanto, casos de encefalites no Brasil ainda são foco de pouca atenção por parte dos sistemas de vigilância epidemiológica e há poucos dados sobre a incidência de encefalites no país e os agentes etiológicos relacionados. Este projeto tem como objetivo colaborar com a geração de conhecimento na área, investigando as principais causas de encefalites virais em casos identificados na Bahia. Através de um diagnóstico e caracterização dos casos pretendemos entender o papel dos vírus classicamente associados a encefalites e de arbovírus neurotrópicos.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Identificar agentes etiológicos virais de casos de encefalites e outras síndromes neurológicas agudas.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar a etiologia viral dos casos utilizando métodos sorológicos e moleculares;
- Analisar a dispersão temporal dos casos com intuito de entender a ocorrência de surtos ou se há sazonalidade;
- Realizar uma caracterização clínica breve de casos de doenças neurológicas virais.

4 METODOLOGIA

4.1 POPULAÇÃO DE ESTUDO E CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

Tipo do estudo: Longitudinal observacional.

Período do estudo: março/2020 até agosto/2022 - 30 meses.

População do estudo

Pacientes pediátricos e adultos.

Critérios de inclusão

Pacientes com critérios clínicos compatíveis com encefalites, de acordo com critérios específicos pré-determinados (STEINER et al., 2005), e outras síndromes neurológicas, como: Síndrome de Guillan-Barré e variantes (Wakerley et al., 2014), polineuropatias, síndromes extrapiramidais, mielites (BARNES et al., 2002) e encefalomielite aguda disseminada (MARCHIONI et al., 2008).

Critérios de exclusão

Diagnóstico durante o internamento de trauma, intoxicação exógena, neoplasia ou síndrome metabólica.

Locais de inclusão de casos:

O Instituto Gonçalo Moniz (IGM) – Fiocruz/BA foi o centro coordenador do estudo que contou com onze centros para recrutamento de participantes, conforme lista abaixo:

1. Hospital Cardiopulmonar – Salvador - BA;
2. Hospital Geral Roberto Santos – Salvador - BA;
3. Hospital do Subúrbio – Salvador - BA;
4. Hospital da Criança – Obras Sociais Irmã Dulce – Salvador - BA;
5. Hospital Santo Antônio – Obras Sociais Irmã Dulce – Salvador - BA
6. Hospital Santa Izabel – Salvador - BA
7. Hospital Emec – Feira de Santana - BA
8. Hospital Cleriston Andrade – Feira de Santana - BA

9. Hospital da Unimed – Feira de Santana - BA
10. Vigilância epidemiológica da Secretaria de Saúde de Feira de Santana - BA
11. Hospital Regional de Irecê – BA.

4.1.1 Aspectos éticos

O presente projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa da FIOCRUZ/IGM (CAAE 30400320.5.0000.0040). Todos os participantes foram incluídos após o consentimento e assinatura do Termo de Consentimento livre e esclarecido (TCLE) pelo participante ou representante legal.

4.2 COLETA E GERENCIAMENTO DE DADOS

O recrutamento de participantes foi realizado através de uma rede de profissionais de saúde, sobretudo médicos neurologistas, lotados nos hospitais participantes, que notificaram os pesquisadores responsáveis quando houve a identificação de casos suspeitos de encefalites internados nos hospitais participantes.

Após verificação dos critérios de inclusão, um membro da equipe do projeto foi direcionado ao hospital notificante para inclusão do caso, aplicação do TCLE e coleta de dados. Dados sociodemográficos, informações clínicas, resultados de exames laboratoriais e de exames de imagem feitos no hospital foram coletados dos prontuários médicos em formulários padronizados utilizando a plataforma REDCap (REDCap 9.3.1 - © 2021 Vanderbilt University).

4.3 OBTENÇÃO E PROCESSAMENTO DE AMOSTRAS BIOLÓGICAS

Amostras biológicas (soro e líquido) dos participantes foram coletadas pelos profissionais de saúde dos hospitais participantes e enviadas ao Laboratório de Patologia Experimental (LAPEX), IGM-Fiocruz. As amostras de líquido foram coletadas como rotina assistencial, pelo médico neurologista, tendo uma alíquota reservada e enviada ao LAPEX. As amostras foram acondicionadas e transportadas em temperatura refrigerada, seguindo um protocolo de diretrizes para coleta, embalagem e transporte de amostras. No laboratório, as amostras biológicas foram processadas, alíquotadas e armazenadas no freezer a -80°C.

4.4 DIAGNÓSTICO MOLECULAR

As amostras de soro e líquido foram submetidas à extração de RNA e DNA, utilizando os kits comerciais Pure Link Mini Kit de Purificação RNA e DNA (Invitrogen) ou Maxwell 16 Viral Total Nucleic Acid Purification Kit (Promega), de acordo com as instruções dos fabricantes. Em seguida, o diagnóstico molecular da amostra seguiu o fluxograma representado na **Figura 1**.

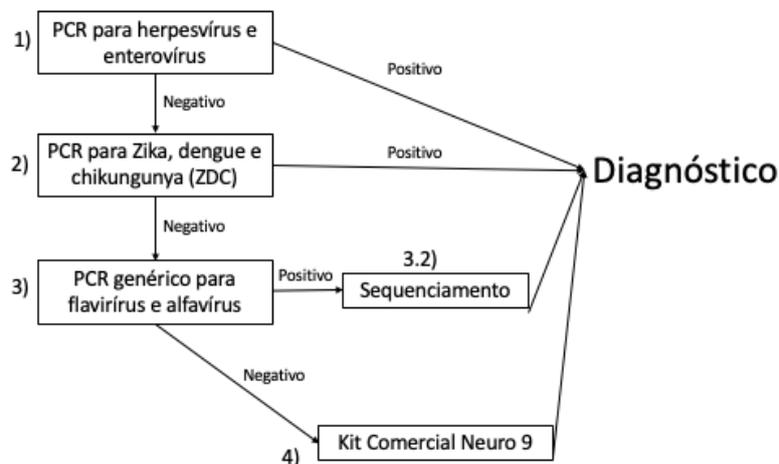


Figura 1 - Fluxograma do diagnóstico molecular de amostras de pacientes com quadro clínico de encefalites.
Fonte: Elaboração da autora

Inicialmente, investigamos a presença dos vírus mais comumente associados a encefalites através da reação da transcriptase reversa seguida pela reação em cadeia da polimerase (RT-PCR) multiplex para a detecção de enterovírus e herpesvírus. Seguindo a metodologia de Read e Kurtz (READ; KURTZ, 1999), utilizamos *primers* específicos para enterovírus, HSV-1, HSV-2 e VZV. Como controle positivo da reação utilizamos um fragmento sintético (*gBlock*) contendo todos os alvos dos quatro vírus. As amplificações foram realizadas em um termociclador Veriti® ThermalCycler (Thermo Fisher Scientific). Após a reação, analisamos por eletroforese através de gel de 1% de agarose contendo 3 µl do corante SYBR *green* em tampão TBE 1X. Os produtos foram visualizados através do programa ImageQuant™ LAS 4000.

As reações qPCR para ZIKV, DENV e CHIKV foram realizadas com o kit Multiplex Zika, Dengue e Chikungunya (Kit Molecular - ZDC, Bio-Manguinhos), seguindo as

instruções do fabricante e utilizando controles positivos extraídos de cultura dos mesmos vírus. A amplificação foi realizada no equipamento Applied Biosystems™ 7500 Real-Time PCR Systems, localizado na plataforma de sequenciamento do IGM.

Para as amostras negativas para os testes anteriores, fizemos a investigação da presença de vírus do gênero *Alfavírus* (pan-alfavírus) e *Flavivírus* (pan-flavivírus). Para o método pan-alfavírus, utilizamos uma reação RT-PCR com quatro *primers* (dois externos e dois internos, *nested-PCR*), que foram desenhados para anelar em uma região conservada do gênero *Alfavírus* e é capaz de detectar até 10 alfavírus diferentes, como descrito anteriormente (GRYWNA et al., 2010). A visualização dos resultados em gel de eletroforese foi feita como explicado no PCR de enterovírus e herpesvírus. O teste qRT-PCR pan-flavivírus foi executado segundo o método utilizado por Patel e colaboradores (PATEL et al., 2013), utilizando três *primers* e três sondas, que foram desenhados para anelar em uma região conservada do gênero flavivírus e é capaz de detectar mais de 10 flavivírus diferentes. A amplificação foi realizada no equipamento Applied Biosystems™ 7500 Real-Time PCR Systems, localizado na plataforma de sequenciamento do IGM. Os dois PCRs genéricos para os gêneros alfavírus e flavivírus utilizaram o mesmo controle positivo do PCR ZDC.

Por fim, foi realizado um teste qPCR Multiplex para detectar nove vírus causadores de encefalite, com o kit comercial MULTI NEURO 9 (XGEN), utilizando *primers* e sondas específicas para Adenovírus humano (HAdV), Citomegalovírus (CMV), vírus Epstein-Barr (EBV), HSV-1 e 2, VZV, Parechovírus humano (HPeV), Eritrovírus B19, vírus herpes humano tipo 6 (HHV6) e 7 (HHV7) e enterovírus. A amplificação foi realizada no equipamento Applied Biosystems™ 7500 Real-Time PCR Systems, localizado na plataforma de sequenciamento do IGM.

4.5 DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO

Amostras de soro foram utilizadas para testes sorológicos anti-ChikungunyaIgM utilizando kit comercial Anti-Chikungunyavirus ELISA (IgM) kit (Euroimmun, Lübeck, Alemanha), seguindo protocolo do fabricante. Também foram realizadas outras sorologias, como anti-DengueIgM, NS1 denguee anti-Zika (Euroimmun, Lübeck, Alemanha) utilizando kits comerciais de acordo com as instruções do fabricante e métodos *in-house*, utilizando protocolos pré-estabelecidos (CDC, 2018).

4.6 PROPOSTA DE ANÁLISE

O registro e organização dos dados foram feitas utilizando a ferramenta REDCap (REDCap 9.3.1 - © 2021 VanderbiltUniversity). Foram realizadas análises descritivas da população do estudo, como frequência de sintomas e cálculo da mediana e intervalo interquartil (25-75%) de dados contínuos. As figuras foram feitas utilizando o programa R, com o pacote ggplot2.

5 RESULTADOS

5.1 ASPECTOS CLÍNICOS E DEMOGRÁFICOS DOS PACIENTES PARTICIPANTES

Para realização deste estudo, foram incluídos 43 participantes com suspeitas de encefalites virais advindos dos hospitais participantes, sendo coletado um total de 40 amostras de líquido e 36 amostras de soro. Trinta e quatro pacientes (80,9%) foram internados em hospitais situados em Salvador, sendo nove internados no Hospital Cardio Pulmonar, nove no Hospital Santo Antonio – Obras Sociais Irmã Dulce, seis no Hospital Santa Izabel, cinco no Hospital Geral Roberto Santos, dois no Hospital da Criança – Obras Sociais Irmã Dulce, dois no Hospital Municipal e um no Hospital do Subúrbio. Cinco pacientes (11,9%) foram internados em Feira de Santana, sendo dois no Hospital Clériston Andrade, um no Hospital EMEC, um no Hospital Unimed e um no Hospital Estadual da Criança. Além disso, três pacientes (7,2%) estavam internados no Hospital Regional de Irecê.

A figura 2 mostra a distribuição de nossa amostragem no tempo, que ocorreu de fevereiro de 2020 a junho de 2022. De forma geral, as amostras ficam bem dispersas nesse período, sendo que na maioria dos meses apenas um paciente foi recrutado. A exceção é o mês de junho de 2020, quando cinco pacientes com quadro clínico de encefalites foram incluídos no estudo.

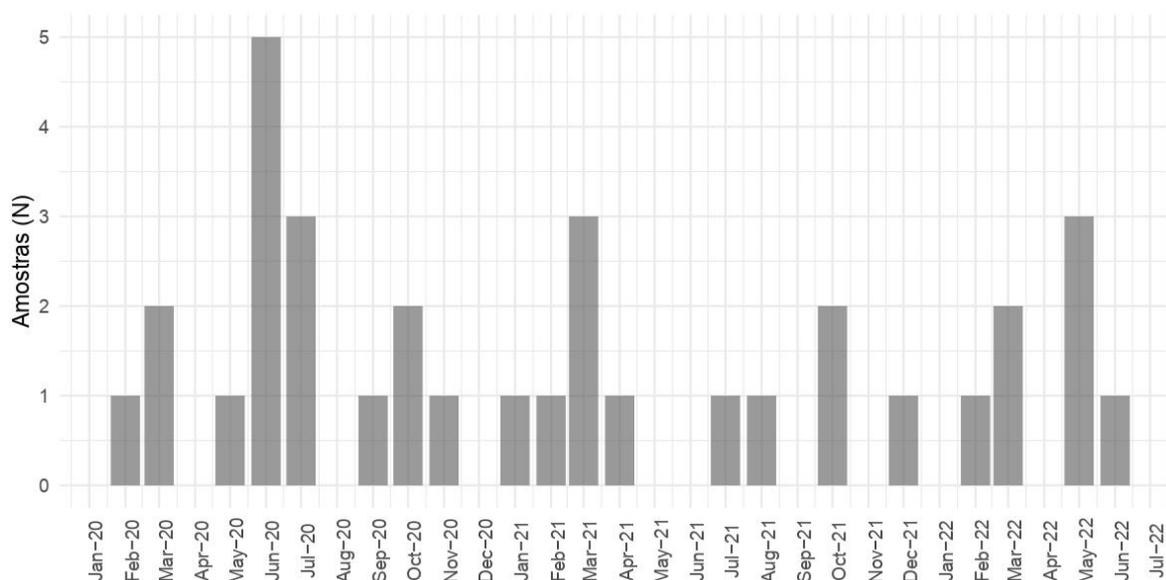


Figura 2 - distribuição temporal das amostras coletadas de casos de encefalite no presente estudo.

Fonte: Elaboração da autora

A mediana da idade dos pacientes foi de 38 anos, tendo intervalo interquartil de 20 a 75 anos. Dentre os 43 participantes do estudo, 24 foram homens (55,8%) e 19 mulheres (44,2%). De acordo com os prontuários médicos, a cor mais frequente foi parda (44,2%) (**Tabela 1**).

Com relação às comorbidades, 24 pacientes (55,8%) relataram apresentar pelo menos uma comorbidade. Quinze deles (62,5%) apresentaram Hipertensão Arterial Sistêmica (HAS), sete (29,1%) apresentaram doença neurológica prévia, seis (25%) apresentaram Diabetes Mellitus (DM), dois (8,3%) apresentaram doença endócrina e sete (29,1%) apresentaram outras comorbidades (**Tabela 1**).

Tabela 1 - Características sociodemográficas e comorbidades dos participantes do estudo.

	N (%)
Sexo	
Feminino	19 (44,2)
Masculino	24 (55,8)
Etnia	
Branco	4 (9,3)
Pardo	19 (44,2)
Preto	4 (9,3)
Não declarada	16 (37,2)
Comorbidades	
HAS	15 (62,5)
DM	6 (25)
Doença endócrina	2 (8,3)
Doença neurológica prévia	7 (29,1)
Outras	7 (29,1)
Municípios	
Salvador	34 (80,9)
Feira de Santana	5 (11,9)
Outros	3 (7,2)

HAS: Hipertensão Arterial Sistêmica; DM: Diabetes Mellitus.

Fonte: Elaboração da autora

Antes de apresentarem sinais e sintomas neurológicos associados à encefalite, 32,5% dos pacientes referiram a presença de sintomas de infecção viral. Os sintomas virais mais frequentes que antecederam os sintomas neurológicos foram febre (71,4%) e artralgia (50%), seguidos por cefaleia (42,8%), odinofagia (28,5%), mialgia (28,5%), erupções cutâneas (21,4%), diarreia (21,4%), edema em pés (14,2%) e edema em mãos (7,1%). Outros sintomas virais foram encontrados em 35,7% pacientes (**Figura 3**).

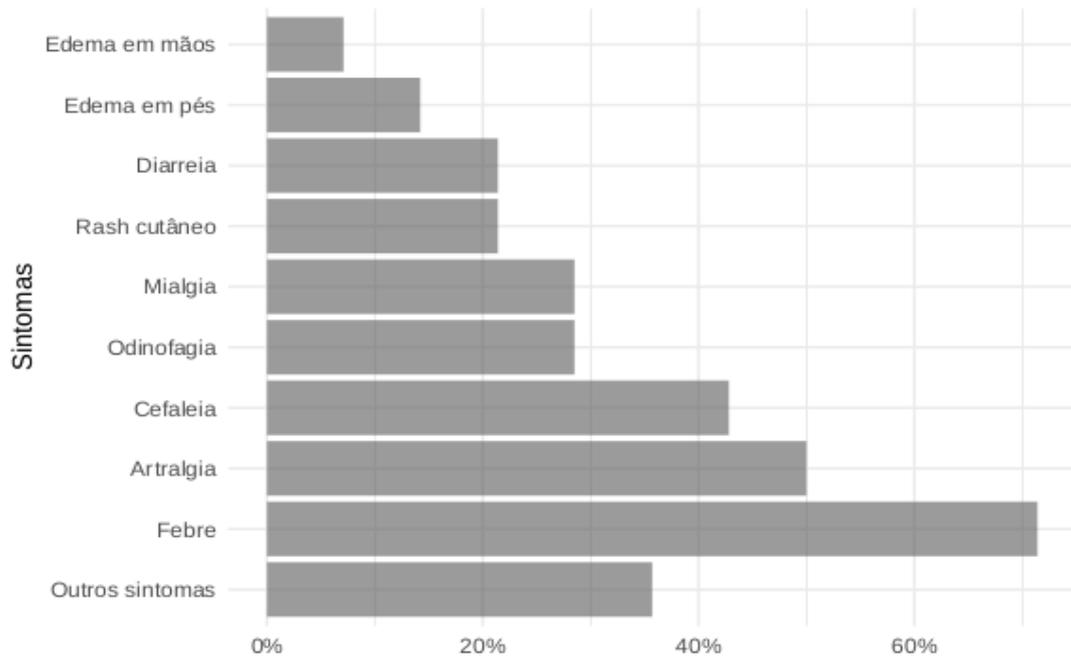


Figura 3 - Principais sintomas virais apresentados pelos pacientes nos 11 hospitais participantes do estudo, coletados entre 2020 e 2022.

Fonte: Elaboração da autora

Dentre os principais sintomas neurológicos na admissão hospitalar, 14 pacientes (32,5%) apresentaram confusão mental, 13 pacientes (30,2%) apresentaram sonolência, 11 (25,5%) apresentaram agitação psicomotora, 11 (25,5%) apresentaram crises epiléticas e sete (16,2%) apresentaram alteração de memória (**Figura 4**).

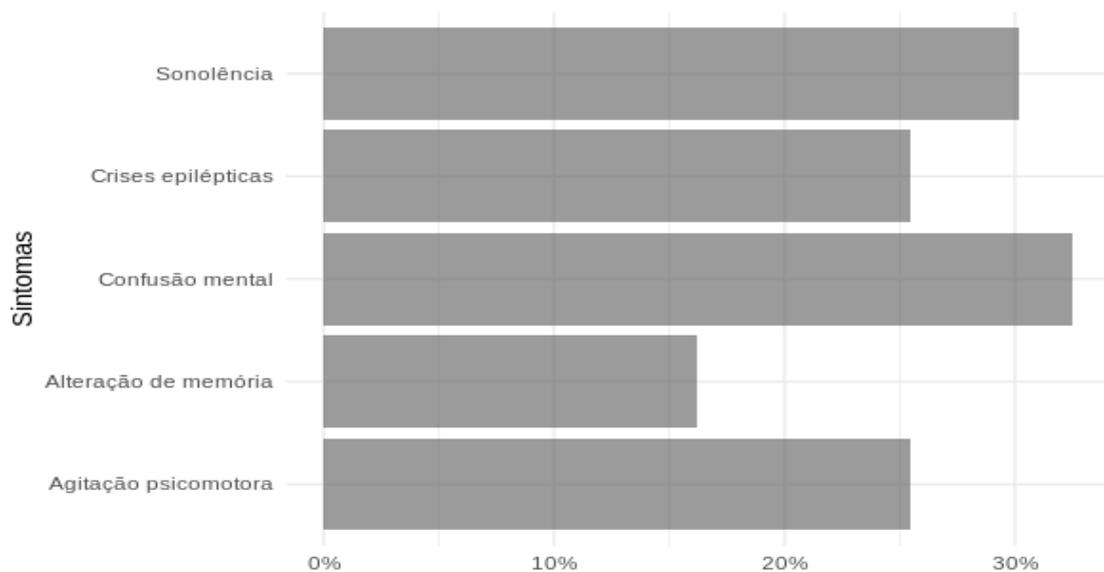


Figura 4 - Principais sintomas neurológicos durante o internamento.

Fonte: Elaboração da autora

Na Tabela 2 estão descritos os resultados de celularidade e bioquímica do exame de LCR. Todos os exames foram considerados alterados e o aumento de celularidade observado foi predominantemente de linfócitos.

Tabela 2 - Dados de celularidade e bioquímica do exame de líquido de 43 participantes.

	Mediana
	(25%-75%)
Celularidade (cell/mm ³)	22 (2-115)
Proteína (mg/dL)	95,1 (27,5-131)
Glicose (mg/dL)	65 (54-75,3)
Predomínio de	N (%)
celularidade	
Neutrófilos	2 (11,1)
Linfócitos	13 (72,2)
Monócitos	3 (16,6)

Fonte: Elaboração da autora

5.2 PADRONIZAÇÃO DAS REAÇÕES DE PCR MULTIPLEX HERPES/ENTERO, PAN-ALFAVÍRUS E PAN-FLAVIVÍRUS

O PCR Herpes/Entero foi padronizado utilizando controles positivos (fragmento sintético contendo todos os alvos) nas diluições de 1 milhão, 10 mil e 100 cópias por µl em reações individuais dos três vírus (figuras 5, 6 e 7, para HSV, VZV e EV, respectivamente). A diluição de 100 cópias foi a que apresentou resultados mais satisfatórios com amplificação da região desejada e sem bandas inespecíficas. A multiplexação também foi padronizada, utilizando o controle de 100 cópias testado anteriormente (figura 8).

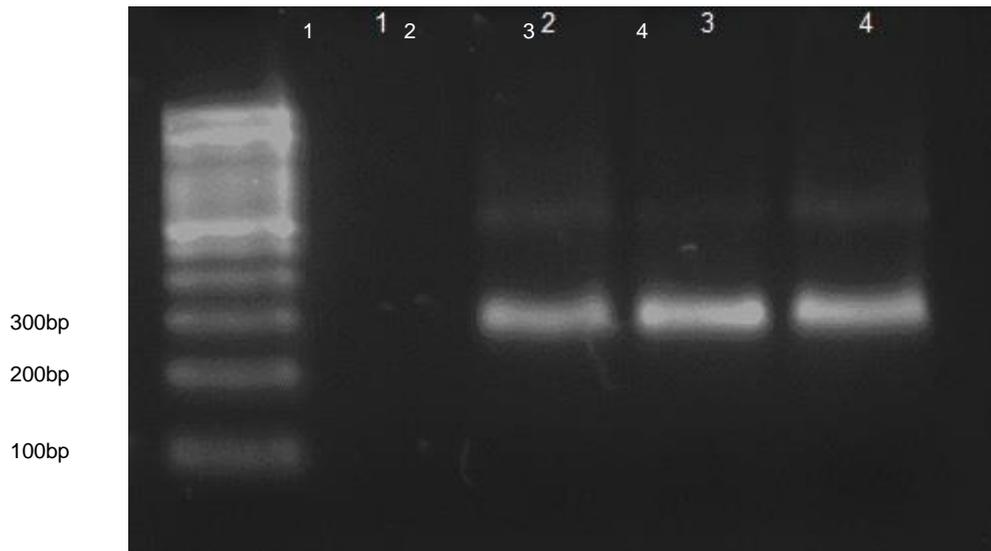


Figura 5 - Gel de agarose com amplificação do controle positivo para HSV em diferentes diluições. **(1)** Controle negativo. **(2)** Controle diluído em 1 milhão de cópias por μl . **(3)** Controle diluído em 10 mil cópias por μl . **(4)** Controle diluído em 100 cópias por μl .
Fonte: Elaboração da autora

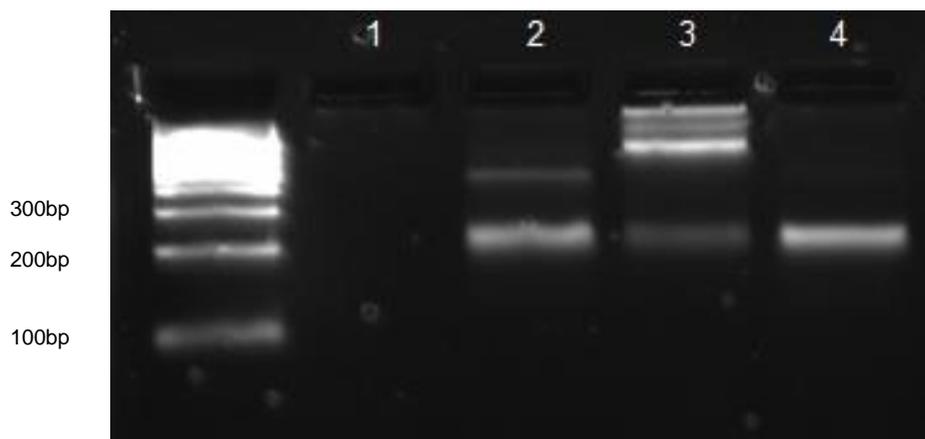


Figura 6 - Gel de agarose com amplificação do controle positivo para VZV em diferentes diluições. **(1)** Controle negativo. **(2)** Controle diluído em 1 milhão de cópias por μl . **(3)** Controle diluído em 10 mil cópias por μl . **(4)** Controle diluído em 100 cópias por μl .
Fonte: Elaboração da autora

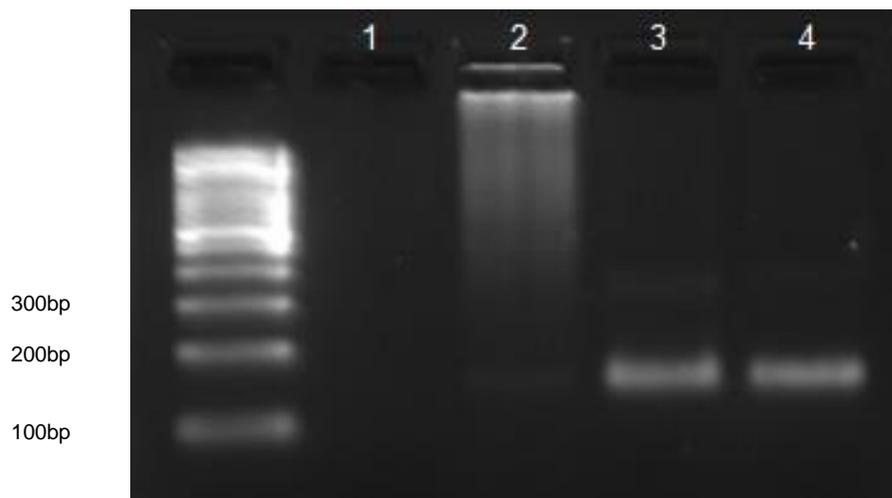


Figura 7 - Gel de agarose com amplificação do controle positivo para EV em diferentes diluições. (1) Controle negativo. (2) Controle diluído em 1 milhão de cópias por μl . (3) Controle diluído em 10 mil cópias por μl . (4) Controle diluído em 100 cópias por μl .

Fonte: Elaboração da autora

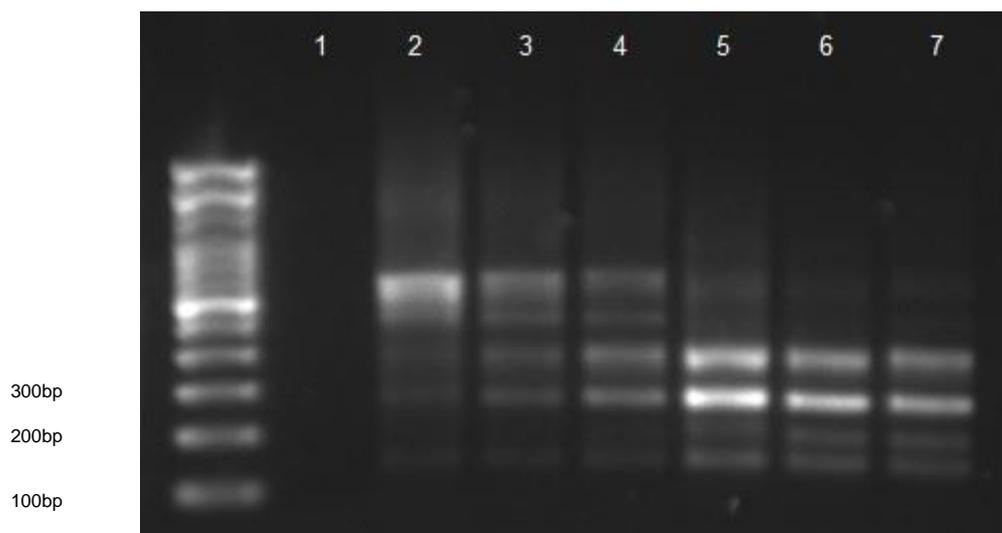


Figura 8 - Gel de agarose com amplificação em duplicata dos controles positivos para HSV (bandas 2 e 3), EV (bandas 4 e 5) e VZV (bandas 6 e 7). (1) Controle negativo. (2, 4 e 6). Controles diluídos em 10 mil cópias por μl . (3, 5 e 7). Controles diluídos em 100 cópias por μl .

Fonte: Elaboração da autora

Os PCRs genéricos para os gêneros *Alfavírus* e *Flavivírus* foram padronizados com os controles de vírus cultivados (DENV, ZIKV e CHIKV) e aplicados às amostras recebidas. A figura 9 mostra o gel de amplificação para o teste pan-alfavírus com os controles positivos do CHIKV, ZIKV e DENV, revelando banda apenas para o CHIKV, que é um alfavírus. O teste de controles positivos também foi feito para a reação pan-flavivírus por RT-qPCR. Os

resultados mostraram apenas amplificação para ZIKV e DENV, que são dois flavivírus (imagem da amplificação não disponível).

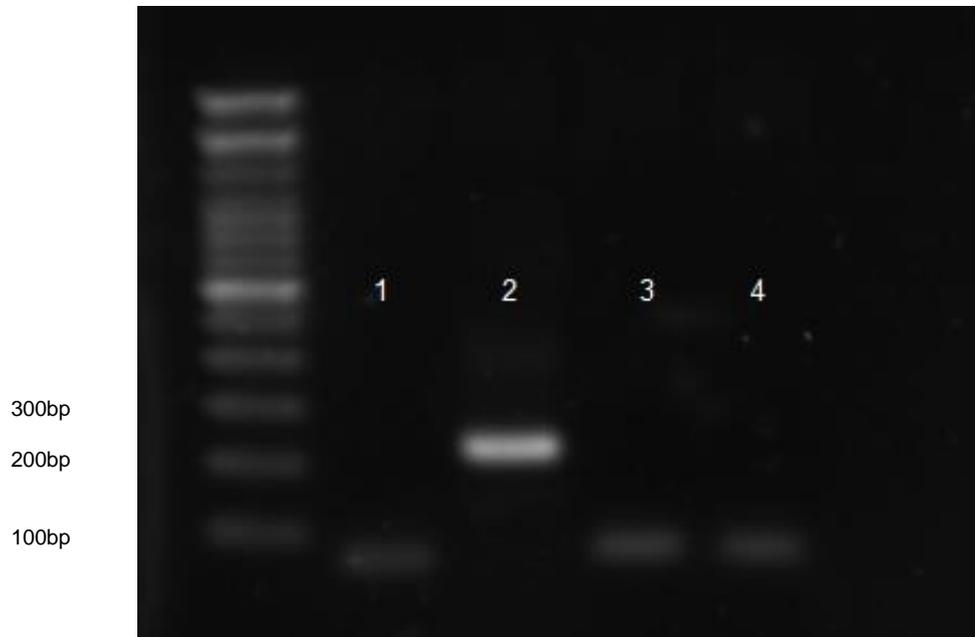


Figura 9 - Gel de agarose com amplificação dos controles positivos CHIKV, ZIKV e DENV na reação pan-alfavírus. **(1)** Controle negativo. **(2)** Amplificação do CHIKV. **(3)** Ausência de banda para ZIKV. **(4)** Ausência de banda para DENV.

Fonte: Elaboração da autora

5.3 DIAGNÓSTICO MOLECULAR

O PCR para enterovírus e herpesvírus foi realizado em 33 amostras de LCR. Das 33 amostras testadas, todas tiveram resultado negativo para EV e HSV, e uma amostra foi positiva para VZV (3%).

As reações de PCR em tempo real para ZIKV, DENV e CHIKV foram realizadas com todas as amostras de líquido (N = 43) e 35 amostras de soro dos pacientes. Todas as amostras (soro e líquido) tiveram resultado negativo para ZIKV e DENV. O CHIKV foi detectado em duas (5,7%) amostras de soro e em uma (2,5%) amostra de líquido, sendo que uma amostra positiva de soro e uma de líquido eram do mesmo paciente, portanto, dois pacientes foram positivos para CHIKV no teste molecular.

O pan-flavivírus foi realizado com todas as amostras de LCR e com 29 amostras de soro e todas as amostras testadas tiveram resultado negativo. Sete amostras de soro e nove amostras de líquido foram submetidas ao PCR pan-alfavírus e todas tiveram resultado negativo.

O teste comercial de qPCR para detecção dos nove tipos de vírus causadores de encefalites foi realizado com as 40 amostras de LCR. Obtivemos três resultados positivos para EBV (7,5%), dois para HAdV (5%), um para EV (2,5%) e um para VZV (2,5%), sendo que esse último havia sido detectado anteriormente através do PCR convencional para herpesvírus e EVs. Todos esses resultados estão resumidos abaixo, na tabela 3.

Tabela 3 - Presença dos vírus estudados nas amostras analisadas.

	Resultados positivos N (%*)
PCR	
ZIKV	0 (0)
DENV	0 (0)
CHIKV	2 (4,6)
pan-alfavírus	0 (0)
pan-flavivírus	0 (0)
HSV	0 (0)
VZV	1 (2,3)
EV	1 (2,3)
EBV	3 (6,9)
HAdV	2 (4,6)
CMV	0 (0)
HPeV	0 (0)
HHV6	0 (0)
HHV7	0 (0)
B19	0 (0)

*relativo ao total de pacientes (N = 43)

Fonte: Elaboração da autora

5.4 DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO

Foi realizada sorologia anti-CHIKV IgM com todas as amostras de soro que tínhamos disponíveis, 33 amostras, e nove delas (27,3%) foram positivas. Também foram realizadas sorologias IgM anti-ZIKV e anti-DENV. Não obtivemos nenhum resultado positivo para ZIKV, porém, na sorologia IgM anti-DENV houve um resultado positivo (3%) e na pesquisa do antígeno NS1 DENV obtivemos dois resultados positivos (6%).

Dentre as nove amostras positivas para anti-CHIKV IgM, tivemos resultados positivos detectados através de outras sorologias e do diagnóstico molecular. Uma dessas amostras teve

resultado positivo para CHIKV também através do PCR ZDC e teve resultado positivo para NS1 DENV e duas tiveram resultado positivo também para EBV.

No total, dos 43 pacientes participantes deste estudo, conseguimos identificar o agente etiológico ou a presença de IgM (indicando infecção recente) em 16 deles (37,2%). Nove casos foram positivos para CHIKV, três para DENV, três para EBV, dois para HAdV, um para VZV, e um para EV, utilizando os métodos sorológicos e moleculares já descritos.

5.5 SINTOMAS DOS CASOS POSITIVOS PARA CHIKV

Dentre os nove casos positivos para CHIKV, três (33,3%) apresentaram algum sintoma viral antes dos sintomas neurológicos, sendo que febre e artralgia estiveram presentes nos três. Cinco pacientes (55,5%) apresentaram sintomas neurológicos, sendo que sonolência estava presente nos cinco. Dos três pacientes com diagnóstico de EBV, um (33,3%) apresentou os seguintes sintomas virais antes dos neurológicos: febre, erupção cutânea, artralgia, odinofagia, diarreia e edema em mãos e pés, os outros dois não apresentaram nenhum. Dois deles apresentaram algum sintoma neurológico, sendo que sonolência esteve presente em ambos.

6 DISCUSSÃO

Neste estudo conseguimos detectar alguns dos principais vírus causadores de doenças neurológicas, com maior foco em encefalites virais. O estudo surgiu pela necessidade de se entender melhor os vírus causadores dessa doença no Brasil, que possui uma taxa de diagnóstico baixa. O LCR é considerado o melhor espécime substituto de biópsia na investigação de doenças neurológicas (ELLUL; SOLOMON, 2018). Aqui nós utilizamos tanto o LCR quanto o soro para detectar a presença dos vírus através das técnicas sorológicas e moleculares. Vários fatores podem interferir na detecção dos agentes etiológicos de encefalites, como a sensibilidade dos métodos diagnósticos e suas limitações (tempo e custo), condições de coleta e armazenamento das amostras, carga viral e a evolução da doença em indivíduos infectados (BALE, 2015; Silva, 2013). Muitos sintomas neuronais que levam o paciente a procurar atendimento médico se iniciam dias após os sintomas virais se iniciarem e, portanto, a quantidade de vírus já pode estar reduzida, dificultando a sua detecção. Com relação às características clínicas dos pacientes desse estudo, observamos que a febre foi um dos sintomas virais mais frequente, corroborando com estudos anteriores (KUMAR et al., 2018; VALLE et al., 2020).

Considerando os resultados positivos para as técnicas moleculares e sorológicas, fomos capazes de identificar o agente etiológico (diretamente ou indiretamente) em 16 dos 43 (37,2%) casos estudados. Desses casos que possuíam diagnóstico positivo para algum agente viral, nove foram detectados através dos testes sorológicos e outros doze foram através dos testes moleculares, sendo que algumas amostras foram positivas tanto em testes moleculares quanto em sorológicos. Se considerarmos apenas os diagnósticos positivos em técnicas de biologia molecular (20,9%), nossos resultados ainda são comparáveis a estudos anteriores similares ao nosso e realizados no Brasil, que, em geral, foram capazes de detectar o agente etiológico associado a casos de encefalites virais entre 23,3% a 29,7% das amostras (Valle et al., 2020; BASTOS et al., 2014; MENDOZA et al., 2007), mas podendo chegar a apenas 5,2% (FERREIRA et al., 2019).

Neste trabalho, vírus da família *Herpesviridae* foram os mais comumente encontrados. Estes resultados diferem de outros estudos feitos no Brasil que encontraram EVs como a principal causa de encefalites, enquanto nosso estudo encontrou apenas um (2,3%) caso de infecção com EV. Por exemplo, Bastos e colaboradores investigaram pacientes com suspeita de infecção viral no SNC em Manaus, no estado do Amazonas, identificando os agentes virais

em 29,7% das amostras testadas, sendo que os EVs foram predominantes, seguidos pelos EBV e VZV (Bastos et al., 2014). Outro trabalho feito com pacientes que apresentaram suspeita clínica de infecção viral do SNC em Ribeirão Preto, São Paulo, através do PCR, conseguiu detectar 6% de CMV, 5% de HSV-1, 0,5% de VZV, 0,5% de EBV e 11,3% de EVs em 43 amostras de LCR (MENDOZA et al., 2007). Ferreira e colaboradores investigaram 234 amostras de LCR coletadas de pacientes com encefalites e encontraram mais resultados positivos em PCR para EVs (3%) (FERREIRA et al, 2019). Por fim, no sul do Brasil, um estudo demonstrou EV como a principal causa de encefalite em crianças (18.1% dos casos estudados), seguido por 2,2% de CMV, 1,5% de HSV e 1,1% de EBV (VALLE et al., 2020).

A presença de arbovírus em amostras LCR ou soro de pacientes diagnosticados com encefalites ou outros casos de doença neurológica aguda é raramente investigada. Nosso estudo encontrou a presença direta de arbovírus em quatro casos (9,3%), sendo dois casos (4,7%) de PCR positivo para CHIKV e dois resultados positivos (4,7%) para a presença do antígeno NS1 de DENV. Recentemente, um estudo retrospectivo de amostras coletadas entre 2016 e 2017 avaliou a incidência de arboviroses em LCR de pacientes internados com sintomas neurológicos num hospital em São José do Rio Preto, São Paulo. Os casos clínicos apresentaram-se principalmente como meningite, encefalite e eventos cerebrovasculares. Das 255 amostras de LCR analisadas, 3,5% foram positivas para arboviroses sendo que ZIKV foi detectado em 2,7% e DENV em 0,8% (MILHIM et al., 2022). Já Ferreira e colaboradores encontraram uma prevalência de 1,2% de arbovírus no seu estudo feito em São Paulo com pacientes com suspeita de encefalites (FERREIRA et al., 2019).

Desta forma, mesmo considerando apenas a detecção direta da presença do agente etiológico, nosso estudo revelou uma importância maior de arbovírus em casos de encefalites do que estudos anteriores. Essa importância fica ainda mais destacada se considerarmos os resultados positivos para IgManti-CHIKV, onde encontramos nove casos positivos em 33 amostras testadas (27,3%). O período médio de incubação do CHIKV é de três a sete dias (Rudolph et al., 2014), e os sintomas da infecção começam logo após esse período. A detecção de IgM é geralmente observada a partir do quinto dia após o início dos sintomas (BOZZA et al., 2019) mas essa detecção pode ocorrer, em 4 – 20% dos casos, a partir do terceiro dia (BLACKSELL et al., 2011). Apesar da detecção de IgM anti-CHIKV não comprovar que o agente etiológico está presente na amostra no momento da coleta e nem sua presença no LCR, a rápida cinética deste anticorpo é compatível com a presença simultânea

do vírus. Além disso, dados da bibliografia suportam que CHIKV pode ser uma causa importante de encefalites.

Uma das primeiras evidências de que o CHIKV pode causar encefalites foi durante a epidemia na ilha de La Réunion, entre 2005 e 2006, que afetou 300.000 pessoas e permitiu que fossem observadas formas graves da doença (GÉRARDIN et al., 2008; LEMANT et al., 2008). Um estudo realizado em Salvador - BA para determinar se o CHIKV e o ZIKV eram os agentes etiológicos da encefalite viral em pacientes internados com meningoencefalite encontrou que, dos 149 pacientes incluídos, 20 (13,34%) testaram positivo para ZIKV (12%) ou CHIKV (1,34%) (EVANGELISTA et al., 2021). Um outro estudo foi realizado para detectar a frequência do DENV, CHIKV e ZIKV em pacientes adultos com suspeita de infecção viral do SNC ou síndromes pós-infecciosas residentes no estado do Rio de Janeiro. Dos 36 pacientes do estudo, cinco casos tiveram infecção por DENV e seis foram positivos para CHIKV e dentre as complicações neurológicas, encefalite foi a mais frequente (Mello et al., 2020). De Lima e colaboradores realizaram um estudo de coorte em Pernambuco e fizeram uma análise de sobrevivência onde encontraram encefalite e encefalomielite como as doenças neurológicas mais frequentes nas arboviroses, mostrando que as manifestações neurológicas do DENV, CHIKV e ZIKV têm o potencial de aumentar a mortalidade e diminuir a sobrevivência (de Lima et al., 2020). Outro estudo no estado do Ceará mostrou que 68 casos fatais tiveram infecção por CHIKV confirmada por algum método utilizado e 39 óbitos por CHIKV apresentaram sinais e sintomas neurológicos, sendo que o RNA do vírus foi encontrado no LCR de 92,3% desses pacientes. Também foi realizada a autópsia em 42 mortes por CHIKV e encontraram encefalite como causa em nove delas (DE LIMA et al., 2020b).

Os resultados obtidos neste estudo reforçam as evidências de que o CHIKV é um importante agente causador de encefalites e/ou outras síndromes neurológicas, destacando a necessidade de mais estudos sobre o assunto. A maioria das amostras positivas para CHIKV neste estudo foi coletada entre março e julho de 2022, quando ocorreu um importante surto dessa arbovirose na Bahia (**Figura 10**). O fato de termos vários pacientes com IgM positivo para CHIKV num período de surto da doença não necessariamente é uma evidência de causalidade de infecção de CHIKV e encefalites, podendo ser apenas dois eventos independentes correlacionados. Entretanto, dois resultados positivos para a presença do vírus no LCR e/ou soro reforçam que CHIKV pode sim ser um agente etiológico importante para a doença.

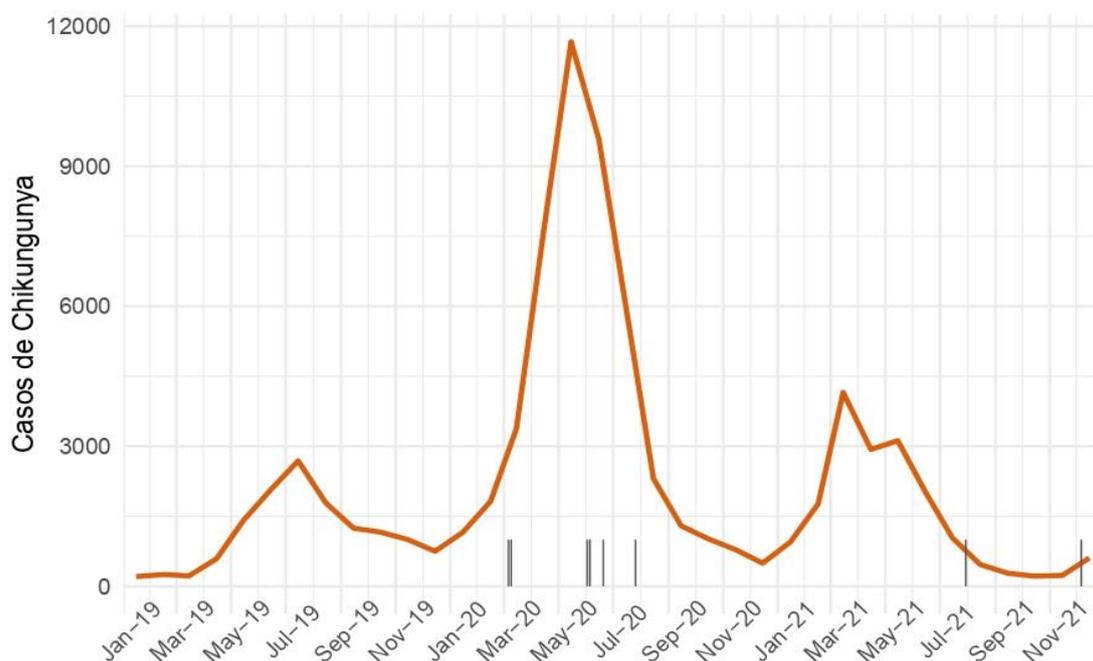


Figura 10 - Número mensal de novas infecções por CHIKV confirmadas no estado da Bahia, entre janeiro de 2019 e novembro de 2021. As barras verticais mostram a data de amostragem dos oito casos de encefalite com teste positivo para CHIKV e data de coleta disponível neste estudo.

Fonte: Elaboração da autora

Não conseguimos testar todas as amostras no teste pan-alfavírus, tendo em vista que é uma técnica de PCR convencional, que demanda mais tempo para ser realizada do que real-time PCR. Além disso, o teste não se mostrou tão sensível, uma vez que não foi capaz de amplificar as amostras com resultado positivo para CHIKV no teste ZDC. Entretanto, é evidente a importância em se detectar os arbovírus pertencentes ao gênero alfavírus, já que nesta família estão presentes importantes vírus causadores de encefalites como EEEV, WEEV e VEEV.

Estudos vêm demonstrando a circulação de diversos alfavírus e flavivírus no Brasil com potencial neuroinvasivo (MILHIM et al., 2020; MOREL et al., 2021; WEBER et al., 2021). Estes possuem subnotificação, em vista das dificuldades de se identificar o agente etiológico de encefalites e outras síndromes neurológicas. Além disso, muitos desses vírus não são nem sequer testados, devido ao número de possíveis causadores de manifestações neurológicas. Por isso, métodos menos enviesados como metagenômica e isolamento viral em cultura podem ser muito úteis no diagnóstico de encefalites e outras síndromes neurológicas agudas.

A diversidade de arbovírus circulantes no Brasil com potencial neurotrópicos é alta. Um estudo feito com um grupo de militares saudáveis em Manaus avaliando a soroprevalência de 19 tipos de arbovírus encontrou positividade em 60,4% para DENV, 30,9% para o ZIKV, 46,6% para o WNV, 54,7% para o SLEV, 51,3% para o ILHV e 48,7% para o ROCV (SALGADO et al., 2021). Outro estudo de soroprevalência realizado em 11 comunidades rurais em dois municípios do Sul da Bahia mostrou que a população teve contato com cinco arbovírus: DENV, ILHV, OROV, Caraparu e EEEV, e esse foi o primeiro estudo relatando exposição aos dois últimos vírus citados em populações humanas na Bahia (CATENACCI et al., 2021).

Em vista da importância do tema, pretendemos dar continuidade ao projeto, expandindo a amostragem e realizando outras técnicas para a detecção dos agentes etiológicos virais relacionados a encefalite e outras síndromes neurológicas agudas.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Conseguimos identificar diferentes tipos de vírus causadores de doenças neurológicas agudas, especialmente encefalites, nos pacientes internados durante o estudo. Os resultados apresentados aqui destacam a importância do CHIKV como eventual causador de encefalites, corroborando estudos anteriores. Este estudo traz novas informações quanto à epidemiologia das encefalites no Brasil, podendo estas auxiliarem no desenvolvimento de métodos e algoritmos de diagnóstico mais direcionados aos principais agentes etiológicos envolvidos na doença no país. Fica evidente também as dificuldades de se trabalhar com o diagnóstico desta doença, fazendo-se necessário o desenvolvimento de melhores métodos ou a utilização de métodos mais complexos e demorados, como a metagenômica e isolamento em cultura viral.

REFERÊNCIAS

- BALE, J. F. Virus and Immune-Mediated Encephalitides: Epidemiology, Diagnosis, Treatment, and Prevention. **Pediatric neurology**, v. 53, n. 1, p. 3–12, 1 jul. 2015.
- BARNES, G. et al. Proposed diagnostic criteria and nosology of acute transverse myelitis. **Neurology**, v. 59, n. 4, p. 499–505, 27 ago. 2002.
- BASTOS, Michele 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**, [S. l.], v. 86, n. 9, p. 1522–1527, 2014. DOI: 10.1002/jmv.23953. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1002/jmv.23953>.
- BEATTY, Mark E. et al. Mosquito borne Infections after Hurricane Jeanne, Haiti, 2004. **Emerging Infectious Diseases**, [S. l.], v. 13, n. 2, p. 308–310, 2007. DOI: 10.3201/eid1302.061132. Disponível em: <http://pmc/articles/PMC2725859/>. Acesso em: 7 abr. 2021.
- BLACKSELL, S. D. et al. Poor Diagnostic Accuracy of Commercial Antibody-Based Assays for the Diagnosis of Acute Chikungunya Infection. **Clinical and Vaccine Immunology: CVI**, v. 18, n. 10, p. 1773, out. 2011.
- BENJELLOUN, A.; EL HARRAK, M.; BELKADI, B. West Nile Disease Epidemiology in North-West Africa: Bibliographical Review. **Transboundary and Emerging Diseases**, [S. l.], v. 63, n. 6, p. e153–e159, 2016. DOI: 10.1111/tbed.12341. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1111/tbed.12341>. Acesso em: 26 mar. 2021.
- BOSCH, Irene et al. West Nile virus, Venezuela [4] **Emerging Infectious Diseases** Centers for Disease Control and Prevention (CDC), , 2007. DOI: 10.3201/eid1304.061383. Disponível em: <http://pmc/articles/PMC2725982/>. Acesso em: 7 abr. 2021.
- BOZZA, F. A. et al. Differential shedding and antibody kinetics of zika and Chikungunya viruses, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 25, n. 2, p. 311–315, 1 fev. 2019.
- BRASIL. **Ministério da Saúde**. 2016. Disponível em: https://bvsmms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2016/prt0204_17_02_2016.html. Acesso em: 4 abr. 2021.
- CAMPBELL, Grant L. et al. Systematic reviews 766 Estimated global incidence of Japanese encephalitis: a systematic review. **Bull World Health Organ**, [S. l.], v. 89, p. 766–774, 2011. DOI: 10.2471/BLT.10.085233. Disponível em: www.GeoHive.com. Acesso em: 26 mar. 2021.
- CATENACCI, L. S. et al. Individual, household and environmental factors associated with arboviruses in rural human populations, Brazil. **Zoonoses and Public Health**, v. 68, n. 3, p. 203–212, 1 maio 2021.

CDC. **Zika MAC-ELISA For Use Under an Emergency Use Authorization Only Instructions for Use.** [s.l.: s.n.]. Disponível em: <http://www.cdc.gov/zika/state-labs/index.html>. Acesso em: 30 abr. 2021.

CHALHOUB, F. L. L. et al. West Nile Virus in the State of Ceará, Northeast Brazil. **Microorganisms**, v. 9, n. 8, 1 ago. 2021.

CHANDAK, Nitin H. et al. Neurological complications of Chikungunya virus infection. **Neurology India**, [S. l.], v. 57, n. 2, p. 177–180, 2009. DOI: 10.4103/0028-3886.51289. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19439849/>. Acesso em: 7 abr. 2021.

CHEN, Bo Shiun et al. **Enterovirus and Encephalitis** *Frontiers in Microbiology* Frontiers Media S.A., 2020. DOI: 10.3389/fmicb.2020.00261. Disponível em: </pmc/articles/PMC7044131/>. Acesso em: 24 mar. 2021.

COSTA, Bruna Klein Da; SATO, Douglas Kazutoshi. Viral encephalitis: a practical review on diagnostic approach and treatment. **Jornal de Pediatria**, [S. l.], 2019. DOI: 10.1016/j.jped.2019.07.006.

COSTA, É. A. et al. West nile virus in Brazil. **Pathogens**, v. 10, n. 7, p. 896, 1 jul. 2021.

COSTA, Galileu Barbosa et al. Silent circulation of the saint louis encephalitis virus among humans and equids, Southeast Brazil. **Viruses**, [S. l.], v. 11, n. 11, 2019. DOI: 10.3390/v11111029. Disponível em: </pmc/articles/PMC6893452/>. Acesso em: 7 abr. 2021.

DA SILVA HEINEN, Letícia Borges et al. Vírus da encefalite de saint Louis em Mato Grosso, Centro-Oeste, Brasil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, [S. l.], v. 57, n. 3, p. 215–220, 2015. DOI: 10.1590/S0036-46652015000300006. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/S0036-46652015000300006>. Acesso em: 7 abr. 2021.

DE LIMA, Elaine Cristina Bomfim et al. Chikungunya encephalitis: Report of a fatal case in northeastern Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo**, [S. l.], v. 62, p. 1–5, 2020. a. DOI: 10.1590/S1678-9946202062040. Disponível em: </pmc/articles/PMC7304265/>. Acesso em: 7 abr. 2021.

DE LIMA, E. C. B. et al. Survival analysis in non-congenital neurological disorders related to dengue, chikungunya and Zika virus infections in Northeast Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 62, p. 1–9, 2020.

DE LIMA, ShirleneTelmos Silva et al. Fatal Outcome of Chikungunya Virus Infection in Brazil. **Clinical Infectious Diseases**, [S. l.], 2020. b. DOI: 10.1093/cid/ciaa1038. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32766829/>. Acesso em: 27 abr. 2021.

DEBIASI, Roberta L.; TYLER, Kenneth L. **Molecular methods for diagnosis of viral encephalitis** *Clinical Microbiology Reviews* American Society for Microbiology Journals, 2004. DOI: 10.1128/CMR.17.4.903-925.2004. Disponível em: <http://cmr.asm.org/>. Acesso em: 9 out. 2020.

DIAZ, LuisAdrián et al. **West Nile virus in birds**, *Argentina Emerging Infectious Diseases* Centers for Disease Control and Prevention (CDC), 2008. DOI: 10.3201/eid1404.071257.

Disponível em: [/pmc/articles/PMC2570931/](#). Acesso em: 7 abr. 2021.

DÍAZ, Luís Adrian et al. Silent circulation of St. Louis encephalitis virus prior to an encephalitis outbreak in Cordoba, Argentina (2005). **PLoS Neglected Tropical Diseases**, [S. l.], v. 6, n. 1, 2012. DOI: 10.1371/journal.pntd.0001489. Disponível em: [/pmc/articles/PMC3269431/](#). Acesso em: 7 abr. 2021.

DO ROSÁRIO, Mateus Santana et al. Case report: Guillain-barré syndrome after zika virus infection in Brazil. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, [S. l.], v. 95, n. 5, p. 1157–1160, 2016. DOI: 10.4269/ajtmh.16-0306.

DOMINGUES, Renan B et al. Involvement of the central nervous system in patients with dengue virus infection. **Journal of the Neurological Sciences**, [S. l.], v. 267, n. 1–2, p. 36–40, 2008. DOI: 10.1016/j.jns.2007.09.040. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022510X07006582>. Acesso em: 7 abr. 2021.

DUFFY, Mark R. et al. Zika Virus Outbreak on Yap Island, Federated States of Micronesia. **New England Journal of Medicine**, [S. l.], v. 360, n. 24, p. 2536–2543, 2009. DOI: 10.1056/nejmoa0805715. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19516034/>. Acesso em: 30 abr. 2021.

ELLUL, M.; SOLOMON, T. Acute encephalitis - diagnosis and management. **Clinical medicine (London, England)**, v. 18, n. 2, p. 155–159, 1 abr. 2018.

EVANGELISTA, G. DE A. O. et al. Meningoencephalitis Associated with Zika Virus and Chikungunya Virus Infection. **Japanese journal of infectious diseases**, v. 74, n. 6, p. 584–586, 2021.

FENG, Guibo et al. **Predictors of Outcome in Clinically Diagnosed Viral Encephalitis Patients: A 5-Year Prospective Study BioMed Research International** Hindawi Limited, 2020. DOI: 10.1155/2020/2832418. Disponível em: [/pmc/articles/PMC7366193/](#). Acesso em: 20 mar. 2021.

FERREIRA, Jerenice E. et al. Molecular characterization of viruses associated with encephalitis in São Paulo, Brazil. **PLoS ONE**, [S. l.], v. 14, n. 1, p. 1–10, 2019. DOI: 10.1371/journal.pone.0209993.

FRITSCH, H. et al. Retrospective Investigation in Horses with Encephalitis Reveals Unnoticed Circulation of West Nile Virus in Brazil. **Viruses**, v. 14, n. 7, p. 1540, 14 jul. 2022.

GEORGE, Benjamin P.; SCHNEIDER, Eric B.; VENKATESAN, Arun. Encephalitis Hospitalization Rates and Inpatient Mortality in the United States, 2000-2010. **PLoS ONE**, [S. l.], v. 9, n. 9, 2014. DOI: 10.1371/journal.pone.0104169. Disponível em: [/pmc/articles/PMC4156306/](#). Acesso em: 21 abr. 2021.

GÉRARDIN, Patrick et al. Chikungunya virus-associated encephalitis. **Neurology**, [S. l.], v. 86, n. 1, p. 94–102, 2016. DOI: 10.1212/WNL.0000000000002234. Disponível em: <http://www.neurology.org/lookup/doi/10.1212/WNL.0000000000002234>. Acesso em: 26 mar. 2021.

GÉRARDIN, P. et al. Estimating Chikungunya prevalence in La Réunion Island outbreak by serosurveys: two methods for two critical times of the epidemic. **BMC infectious diseases**, v. 8, 28 jul. 2008.

GLASER, C. A. et al. **Beyond Viruses: Clinical Profiles and Etiologies Associated with Encephalitis**. [s.l: s.n.].

GLASER, Carol A. et al. In Search of Encephalitis Etiologies: Diagnostic Challenges in the California Encephalitis Project, 1998–2000. **Clinical Infectious Diseases**, [S. l.], v. 36, n. 6, p. 731–742, 2003. DOI: 10.1086/367841.

GRANEROD, J.; TAM, C. C.; CROWCROFT, N. S.; DAVIES, N. W. S.; BORCHERT, M.; THOMAS, S. L. **Challenge of the unknown: A systematic review of acute encephalitis in non-outbreak situations** *Neurology* Neurology, 2010. DOI: 10.1212/WNL.0b013e3181f11d65. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20820004/>. Acesso em: 21 abr. 2021.

GRYWNA, Klaus et al. Detection of all species of the genus Alphavirus by reverse transcription-PCR with diagnostic sensitivity. **Journal of Clinical Microbiology**, [S. l.], v. 48, n. 9, p. 3386–3387, 2010. DOI: 10.1128/JCM.00317-10.

IOOS, S. et al. **Current Zika virus epidemiology and recent epidemics** *Medecine et Maladies Infectieuses* Elsevier Masson SAS, , 2014. DOI: 10.1016/j.medmal.2014.04.008. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25001879/>. Acesso em: 30 abr. 2021.

JACOBS, B. C. et al. The spectrum of antecedent infections in Guillain-Barré syndrome: a case-control study. **Neurology**, v. 51, n. 4, p. 1110–1115, 1998.

KAEWPOOWAT, Quanhathai et al.. Herpes simplex and varicella zoster CNS infections: clinical presentations, treatments and outcomes. **Infection**, [S. l.], v. 44, n. 3, p. 337–345, 2016. DOI: 10.1007/s15010-015-0867-6. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/s15010-015-0867-6>. Acesso em: 6 abr. 2021.

KAHWAGI, J. et al. Surveillance of Viral Encephalitis in the Context of COVID-19: A One-Year Observational Study among Hospitalized Patients in Dakar, Senegal. **Viruses**, v. 14, n. 5, 1 maio 2022.

KENNEDY, Peter G. E. Viral encephalitis. **Journal of Neurology**, [S. l.], v. 252, n. 3, p. 268–272, 2005. DOI: 10.1007/s00415-005-0770-7. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/s00415-005-0770-7>. Acesso em: 18 out. 2019.

KENNEDY, Peter G. E.; QUAN, Phenix Lan; LIPKIN, W. Ian. Viral encephalitis of unknown cause: Current perspective and recent advances. **Viruses**, [S. l.], v. 9, n. 6, p. 1–8, 2017. DOI: 10.3390/v9060138.

KHETSURIANI, Nino; HOLMAN, Robert C.; ANDERSON, Larry J. Burden of encephalitis-associated hospitalizations in the United States, 1988-1997. **Clinical Infectious Diseases**, [S. l.], v. 35, n. 2, p. 175–182, 2002. DOI: 10.1086/341301. Disponível em: <https://academic.oup.com/cid/article-lookup/doi/10.1086/341301>. Acesso em: 6 abr. 2021.

KOLSKI, H. et al. Etiology of acute childhood encephalitis at The Hospital for Sick Children, Toronto, 1994-1995. **Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America**, v. 26, n. 2, p. 398–409, 1998.

KOMAR, Nicholas; CLARK, Gary G. West Nile virus activity in Latin America and the Caribbean. **Revista Panamericana de Salud Publica/Pan American Journal of Public Health**, [S. l.], v. 19, n. 2, p. 112–117, 2006. DOI: 10.1590/S1020-49892006000200006. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16551385/>. Acesso em: 7 abr. 2021.

KOMATSU, Hiroshi; SHIMIZU, Yoshitaka; TAKEUCHI, Yoshihiro; ISHIKO, Hiroaki; TAKADA, Hiroshi. Outbreak of severe neurologic involvement associated with Enterovirus 71 infection. **Pediatric Neurology**, [S. l.], v. 20, n. 1, p. 17–23, 1999. DOI: 10.1016/S0887-8994(98)00087-3. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10029254/>. Acesso em: 7 abr. 2021.

KOSKINIEMI, M. et al. Infections of the central nervous system of suspected viral origin: A collaborative study from Finland. **Journal of NeuroVirology**, [S. l.], v. 7, n. 5, p. 400–408, 2001. DOI: 10.1080/135502801753170255. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1080/135502801753170255>. Acesso em: 7 abr. 2021.

KUMAR, R. et al. Epidemiological Profile of Acute Viral Encephalitis. **Indian Journal of Pediatrics**, v. 85, n. 5, p. 358–363, 1 maio 2018.

LEMANT, J. et al. Serious acute chikungunya virus infection requiring intensive care during the Reunion Island outbreak in 2005-2006. **Critical care medicine**, v. 36, n. 9, p. 2536–2541, 2008.

MARCHIONI, E. et al. Recurrent ADEM versus MS: differential diagnostic criteria. **Neurological research**, v. 30, n. 1, p. 74, fev. 2008.

MELLO, C. DA S. et al. Dengue and chikungunya infection in neurologic disorders from endemic areas in Brazil. **Neurology. Clinical practice**, v. 10, n. 6, p. 497–502, dez. 2020.

MARTINS, Livia Caricio et al. First isolation of west nile virus in brazil. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, [S. l.], v. 114, n. 1, 2019. DOI: 10.1590/0074-02760180332. MEDEIROS, Daniele B. A.; NUNES, Márcio R. T.; VASCONCELOS, Pedro F. C.;

CHANG, GwongJen J.; KUNO, Goro. Complete genome characterization of Rocio virus (Flavivirus: Flaviviridae), a Brazilian flavivirus isolated from a fatal case of encephalitis during an epidemic in São Paulo state. **Journal of General Virology**, [S. l.], v. 88, n. 8, p. 2237–2246, 2007. DOI: 10.1099/vir.0.82883-0. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17622628/>. Acesso em: 7 abr. 2021.

MENDOZA, L. P. et al. Viral infections of the central nervous system in Brazil. **The Journal of infection**, v. 54, n. 6, p. 589–596, jun. 2007.

MILHIM, Bruno H. G. A. et al. Fatal Outcome of Ilheus Virus in the Cerebrospinal Fluid of a Patient Diagnosed with Encephalitis. **Viruses**, [S. l.], v. 12, n. 9, p. 957, 2020. DOI: 10.3390/v12090957. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1999-4915/12/9/957>.

MILHIM, B. H. G. A. et al. Arboviral Infections in Neurological Disorders in Hospitalized Patients in São José do Rio Preto, São Paulo, Brazil. **Viruses** **2022**, Vol. **14**, Page **1488**, v. 14, n. 7, p. 1488, 7 jul. 2022.

MONDINI, Adriano et al. **Saint Louis encephalitis virus, Brazil [5] Emerging Infectious Diseases** Centers for Disease Control and Prevention (CDC), , 2007. a. DOI: 10.3201/eid1301.060905. Disponível em: /pmc/articles/PMC2725838/. Acesso em: 7 abr. 2021.

MONDINI, Adriano et al. Saint Louis Encephalitis Virus, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, [S. l.], v. 13, n. 1, p. 176–178, 2007. b. DOI: 10.3201/eid1301.060905. Disponível em: http://wwwnc.cdc.gov/eid/article/13/1/06-0905_article.htm.

MONDINI, Adriano et al. Simultaneous infection by DENV-3 and SLEV in Brazil. **Journal of Clinical Virology**, [S. l.], v. 40, n. 1, p. 84–86, 2007. c. DOI: 10.1016/j.jcv.2007.06.007. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1386653207002144>. Acesso em: 7 abr. 2021.

MORAES, M. M. et al. Detection of Saint Louis encephalitis virus in two Brazilian states. **Journal of medical virology**, v. 94, n. 2, p. 776–781, 1 fev. 2022.

MOREL, A. P. et al. Serosurvey of West Nile virus (WNV) in free-ranging raptors from Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 52, n. 1, p. 411, 1 mar. 2021.

MOSTASHARI, Farzad et al. Epidemic West Nile encephalitis, New York, 1999: Results of a household-based sero epidemiological survey. **Lancet**, [S. l.], v. 358, n. 9278, p. 261–264, 2001. DOI: 10.1016/S0140-6736(01)05480-0. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11498211/>. Acesso em: 7 abr. 2021.

MUSSO, D.; NILLES, E. J.; CAO-LORMEAU, V. M. Rapid spread of emerging Zika virus in the Pacific area. **Clinical Microbiology and Infection**, [S. l.], v. 20, n. 10, p. O595–O596, 2014. DOI: 10.1111/1469-0691.12707. Disponível em: <http://www.invs.sante.fr/Publica->. Acesso em: 30 abr. 2021.

NAGY, G. et al. Virological diagnosis of enterovirus type 71 infections: Experiences gained during an epidemic of acute CNS diseases in Hungary in 1978. **Archives of Virology**, [S. l.], v. 71, n. 3, p. 217–227, 1982. DOI: 10.1007/BF01314873. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/BF01314873>. Acesso em: 6 abr. 2021.

NEVES, Andressa de Sousa; MACHADO, Carla Jorge. A reemergência do vírus Rocio no Brasil. **Revista da Faculdade de Ciências Médicas de Sorocaba**, [S. l.], v. 18, n. 1, p. 61–62, 2016. DOI: 10.5327/z1984-4840201623881. Disponível em: <http://revistas.pucsp.br/index.php/RFCMS/article/view/23881/pdf>.

NGUYEN, Lam Tung; SCHMIDT, Heiko A.; VON HAESLER, Arndt; MINH, Bui Quang. IQ-TREE: A fast and effective stochastic algorithm for estimating maximum-likelihood phylogenies. **Molecular Biology and Evolution**, [S. l.], v. 32, n. 1, p. 268–274, 2015. DOI: 10.1093/molbev/msu300. Disponível em: /pmc/articles/PMC4271533/. Acesso em: 27 abr. 2021.

NOGUEIRA, Rita Maria Ribeiro; DE ARAÚJO, Josélio Maria Galvão; SCHATZMAYR, Hermann Gonçalves. Dengue viruses in Brazil, 1986-2006. **Revista Panamericana de Salud Publica/Pan American Journal of Public Health**, [S. l.], v. 22, n. 5, p. 358–363, 2007. DOI: 10.1590/S1020-49892007001000009. Disponível em: <http://www.paho.org/english/ad/dpc/cd/dengue.htm>. Acesso em: 8 abr. 2021.

NORBERG, Peter. **Divergence and genotyping of human α -herpesviruses**: An overview *Infection, Genetics and Evolution* Elsevier, 2010. DOI: 10.1016/j.meegid.2009.09.004.

OMETTO, Tatiana et al. West Nile virus surveillance, Brazil, 2008-2010. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, [S. l.], v. 107, n. 11, p. 723–730, 2013. DOI: 10.1093/trstmh/trt081. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24008895/>. Acesso em: 7 abr. 2021.

PAIXÃO, Enny S.; TEIXEIRA, Maria Glória; RODRIGUES, Laura C. Zika, chikungunya and dengue: The causes and threats of new and reemerging arboviral diseases. **BMJ Global Health**, [S. l.], v. 3, n. Suppl 1, 2018. DOI: 10.1136/bmjgh-2017-000530. Disponível em: </pmc/articles/PMC5759716/>. Acesso em: 21 abr. 2021.

PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION. **Cases of dengue in the Americas exceeded 3 million in 2019 - PAHO/WHO | Pan American Health Organization**. 2020. Disponível em: <https://www.paho.org/en/news/12-2-2020-cases-dengue-americas-exceeded-3-million-2019>. Acesso em: 30 abr. 2021.

PATEL, Pranav et al. Development of one-step quantitative reverse transcription PCR for the rapid detection of flaviviruses. **Virology Journal**, [S. l.], v. 10, 2013. DOI: 10.1186/1743-422X-10-58.

PAUVOLID-CORRÊA, Alex et al. Neutralising antibodies for West Nile virus in horses from Brazilian Pantanal. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, [S. l.], v. 106, n. 4, p. 467–474, 2011. DOI: 10.1590/S0074-02762011000400014. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0074-02762011000400014&lng=en&nrm=iso&tlng=en. Acesso em: 7 abr. 2021.

PAUVOLID-CORRÊA, Alex et al. Serological Evidence of Widespread Circulation of West Nile Virus and Other Flaviviruses in Equines of the Pantanal, Brazil. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, [S. l.], v. 8, n. 2, 2014. DOI: 10.1371/journal.pntd.0002706.

PAUVOLID-CORRÊA, Alex et al. Neutralising antibodies for mayaro virus in Pantanal, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, [S. l.], v. 110, n. 1, p. 125–133, 2015. DOI: 10.1590/0074-02760140383.

PETERSEN, Lyle R.; BRAULT, Aaron C.; NASCI, Roger S. West Nile virus: Review of the literature *JAMA. Journal of the American Medical Association* American Medical Association, 2013. DOI: 10.1001/jama.2013.8042. Disponível em: </pmc/articles/PMC4563989/>. Acesso em: 7 abr. 2021.

PINHEIRO, F. P. et al. Isolation of St. Louis encephalitis virus from a patient in Belem, Brazil. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, [S. l.], v. 30, n. 1, p. 145–148, 1981. DOI: 10.4269/ajtmh.1981.30.145. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/6259956/>. Acesso em: 7 abr. 2021.

- POLLETT, S. et al. Genomic Epidemiology as a Public Health Tool to Combat Mosquito-Borne Virus Outbreaks. **Journal of Infectious Diseases**, [S. l.], v. 221, n. Suppl 3, p. S308–S318, 2020. DOI: 10.1093/infdis/jiz302. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31711190/>. Acesso em: 27 abr. 2021.
- POSNAKOGLOU, Lamprini et al. Molecular Epidemiology of Enterovirus in Children with Central Nervous System Infections. **Viruses**, [S. l.], v. 13, n. 1, 2021. DOI: 10.3390/v13010100. Disponível em: [/pmc/articles/PMC7828273/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31711190/). Acesso em: 24 mar. 2021.
- READ, Steven J.; KURTZ, John B. Laboratory diagnosis of common viral infections of the central nervous system by using a single multiplex PCR screening assay. **Journal of Clinical Microbiology**, [S. l.], v. 37, n. 5, p. 1352–1355, 1999. DOI: 10.1128/jcm.37.5.1352-1355.1999. Disponível em: <http://jcm.asm.org/>. Acesso em: 9 out. 2020.
- ROCCO, Iray Maria et al. St. Louis encephalitis virus: First isolation from a human in São Paulo State, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo**, [S. l.], v. 47, n. 5, p. 281–285, 2005. DOI: 10.1590/s0036-46652005000500008. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0036-46652005000500008&lng=en&nrm=iso&tlng=en. Acesso em: 7 abr. 2021.
- RUDOLPH, K. E. et al. Incubation periods of mosquito-borne viral infections: a systematic review. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 90, n. 5, p. 882–891, 2014.
- SALGADO, B. B. et al. Prevalence of arbovirus antibodies in young healthy adult population in Brazil. **Parasites & Vectors**, v. 14, n. 1, p. 403, 1 dez. 2021.
- SALIMI, Hamid; CAIN, Matthew D.; KLEIN, Robyn S. **Encephalitic Arboviruses: Emergence, Clinical Presentation, and Neuropathogenesis Neurotherapeutics**. Springer, New York: LLC, 2016. DOI: 10.1007/s13311-016-0443-5.
- SAÚDE, Secretaria de Vigilância em. **Monitoramento dos casos de arboviroses urbanas causados por vírus transmitidos por Aedes (dengue, chikungunya e zika), semanas epidemiológicas 1 a 53, 2020**. 2021. Disponível em: https://www.gov.br/saude/pt-br/media/pdf/2021/fevereiro/01/boletim_epidemiologico_svs_3.pdf. Acesso em: 30 abr. 2021.
- SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE, M. DA S. **Monitoramento dos casos de arboviroses urbanas causados por vírus transmitidos pelo mosquito Aedes (dengue, chikungunya e zika)**. Disponível em: <http://plataforma.saude.gov.br/anomalias-congenitas/boletim-epidemiologico-SVS-07-2022.pdf>. Acesso em: 31 jul. 2022.
- SEJVAR, J. J. et al. Population incidence of Guillain-Barré syndrome: a systematic review and meta-analysis. **Neuroepidemiology**, v. 36, n. 2, p. 123–133, abr. 2011.
- SHAHRIZAILA, N.; LEHMANN, H. C.; KUWABARA, S. Guillain-Barré syndrome. **The Lancet**, v. 397, n. 10280, p. 1214–1228, 27 mar. 2021.
- SILVA, M. T. T. Viral encephalitis. **Arquivos de neuro-psiquiatria**, v. 71, n. 9B, p. 703–709, 2013.

SESAPI. **Piauí registra mais um caso de Febre do Nilo - Portal da Saúde - Secretaria de Estado da Saúde do Piauí**. 2021. Disponível em: <http://www.saude.pi.gov.br/noticias/2020-04-28/9709/piaui-registra-mais-um-caso-de-febre-do-nilo.html>. Acesso em: 21 abr. 2021.

SILVA, Marcus Tullius T. Encefalites virais. **Arquivos de Neuro-Psiquiatria**, [S. l.], v. 71, n. 9 B, p. 703–709, 2013. DOI: 10.1590/0004-282X20130155.

SILVEIRA, Elena Caires. Perfil das internações por encefalite viral no Brasil em 2018 por unidade da federação, sexo e faixa etária. **Medicina (Ribeirão Preto)**, [S. l.], v. 53, n. 3, p. 268–274, 2020. DOI: 10.11606/issn.2176-7262.v53i3p268-274.

SOARES, Cristiane N. et al. Fatal encephalitis associated with Zika virus infection in an adult. **Journal of Clinical Virology**, [S. l.], v. 83, p. 63–65, 2016. DOI: 10.1016/j.jcv.2016.08.297. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcv.2016.08.297>. Acesso em: 30 abr. 2021.

SOLOMON, Tom; BAYLIS, Matthew; BROWN, David. Zika virus and neurological diseases approaches to the unknown. **The Lancet Infectious Diseases**, [S. l.], v. 16, p. 402–404, 2016. DOI: 10.1371/currents.outbreaks.b50c2aaf1032b3ccade0fca0b63ee518.6. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/>. Acesso em: 30 abr. 2021.

STEINER, I.; BUDKA, H. et al. Viral encephalitis: A review of diagnostic methods and guidelines for management. **European Journal of Neurology Eur J Neurol**, 2005. DOI: 10.1111/j.1468-1331.2005.01126.x. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15804262/>. Acesso em: 30 abr. 2021.

STEINER, I.; BUDKA, H. et al. Viral meningoencephalitis: a review of diagnostic methods and guidelines for management. **European Journal of Neurology**, [S. l.], v. 17, n. 8, p. 999–e57, 2010. DOI: 10.1111/j.1468-1331.2010.02970.x. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1468-1331.2010.02970.x>. Acesso em: 26 mar. 2021.

TERZIAN, Ana Carolina Bernardes et al. Detection of Saint Louis Encephalitis virus in Dengue-suspected cases during a Dengue 3 outbreak. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, [S. l.], v. 11, n. 3, p. 291–300, 2011. DOI: 10.1089/vbz.2009.0200. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20645866/>. Acesso em: 7 abr. 2021.

TUNKEL, Allan R. et al. The Management of Encephalitis: Clinical Practice Guidelines by the Infectious Diseases Society of America. **Clinical Infectious Diseases**, [S. l.], v. 47, n. 3, p. 303–327, 2008. DOI: 10.1086/589747.

TYLER, Kenneth L. Acute viral encephalitis. **New England Journal of Medicine**, [S. l.], v. 379, n. 6, p. 557–566, 2018. DOI: 10.1056/NEJMra1708714.

VALLE, D. A. DO et al. Acute childhood viral encephalitis in southern Brazil. **Pediatric Infectious Disease Journal**, p. 894–898, 2020.

VENKATESAN, A. et al. Case definitions, diagnostic algorithms, and priorities in encephalitis: Consensus statement of the international encephalitis consortium. **Clinical Infectious Diseases**, [S. l.], v. 57, n. 8, p. 1114–1128, 2013. DOI: 10.1093/cid/cit458.

VENKATESAN, Arun; MURPHY, Olwen C. Viral Encephalitis. **Neurologic Clinics**, [S. l.], v. 36, n. 4, p. 705–724, 2018. DOI: 10.1016/j.ncl.2018.07.001. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ncl.2018.07.001>.

VIDAL, L. R. R. et al. Enterovirus and herpesviridae family as etiologic agents of lymphomonocytary meningitis, Southern Brazil. **Arquivos de neuro-psiquiatria**, v. 69, n. 3, p. 475–481, 2011.

VIEIRA, Marcelo A. C. S. et al. Case report: West Nile virus encephalitis: The first human case recorded in Brazil. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, [S. l.], v. 93, n. 2, p. 377–379, 2015. DOI: 10.4269/ajtmh.15-0170.

VORA, Neil M. et al. Burden of encephalitis-associated hospitalizations in the United States, 1998-2010. **Neurology**, [S. l.], v. 82, n. 5, p. 443–451, 2014. DOI: 10.1212/WNL.0000000000000086. Disponível em: <http://www.neurology.org/cgi/doi/10.1212/WNL.0000000000000086>. Acesso em: 23 mar. 2021.

WAKERLEY, B. R.; UNCINI, A.; YUKI, N. Guillain-Barré and Miller Fisher syndromes--new diagnostic classification. **Nature reviews. Neurology**, v. 10, n. 9, p. 537–544, 29 set. 2014.

WEAVER, Scott C.; REISEN, William K. Present and future arboviral threats. **Antiviral research**, [S. l.], v. 85, n. 2, p. 328–45, 2010. DOI: 10.1016/j.antiviral.2009.10.008. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19857523>. Acesso em: 10 maio. 2019.

WEBER, M. N. et al. Serologic evidence of West Nile virus and Saint Louis encephalitis virus in horses from Southern Brazil. **Brazilian journal of microbiology: [publication of the Brazilian Society for Microbiology]**, v. 52, n. 2, p. 1021–1027, 1 jun. 2021.

WEBSTER, Leslie T.; FITE, George L. A virus encountered in the study of material from cases of encephalitis in the St. Louis and Kansas City epidemics of 1933. **Science**, [S. l.], v. 78, n. 2029, p. 463–465, 1933. DOI: 10.1126/science.78.2029.463. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17752093/>. Acesso em: 7 abr. 2021.

WHITLEY, Richard J. Herpes Simplex Virus Infections of the Central Nervous System: Encephalitis and Neonatal Herpes. **Drugs**, [S. l.], v. 42, n. 3, p. 406–427, 1991. DOI: 10.2165/00003495-199142030-00005. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1720381/>. Acesso em: 23 mar. 2021.

WHITLEY, Richard J.; GNANN, John W. **Viral encephalitis: Familiar infections and emerging pathogens** *Lancet* Elsevier Limited, 2002. DOI: 10.1016/S0140-6736(02)07681-X. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S014067360207681X>. Acesso em: 20 mar. 2021.

WILSON, M. R. et al. Clinical metagenomic sequencing for diagnosis of meningitis and encephalitis. **New England Journal of Medicine**, [S. l.], v. 380, n. 24, p. 2327–2340, 2019. DOI: 10.1056/NEJMoa1803396.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. WHO | Dengue haemorrhagic fever: diagnosis, treatment, prevention and control. 2nd edition. Geneva : World Health Organization. **WHO**, [S. l.], 2015.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **WHO Region of the Americas records highest number of dengue cases in history**: cases spike in other regions. 2019. Disponível em: <https://www.who.int/news/item/21-11-2019-who-region-of-the-americas-records-highest-number-of-dengue-cases-in-history-cases-spike-in-other-regions>. Acesso em: 30 abr. 2021.