



“Identificação Molecular de Infecções Virais em Amostras de LCR de Pacientes com Meningite Bacteriana”

Palavras-Chave: HERPESVÍRUS, LÍQUIDO CEFALORRAQUIDIANO, MENINGITE BACTERIANA

Autores(as):

GABRIEL CAETANO SCACHETTI, IB – UNICAMP

RODRIGO GONÇALVES DE LIMA, FCM – UNICAMP

SANDRA CECÍLIA BOTELHO COSTA, FCM – UNICAMP

Prof.^a Dr.^a SANDRA HELENA ALVES BONON (orientadora), FCM – UNICAMP

INTRODUÇÃO:

O líquido cefalorraquidiano (LCR), produzido pelos plexos coróides e meninges, é um ultrafiltrado derivado do sangue ou cérebro, que atua na homeostase metabólica do sistema nervoso central (SNC), bem como, em sua proteção mecânica. Devido sua íntima relação com o SNC, o aspecto e a composição do LCR são influenciados por processos inflamatórios, e desse modo, sua análise é essencial para o diagnóstico de infecções neurológicas.¹

Uma das patologias causadas por infecções neurológicas é a meningite, que consiste em uma inflamação das meninges e do espaço subaracnóideo, o qual contém o LCR. O processo inflamatório que desencadeia um quadro de meningite pode estar associado a diferentes agentes etiológicos, como por exemplo: vírus, bactérias, fungos e parasitos.² Embora exista uma diversidade nos agentes etiológicos responsáveis pelo desenvolvimento de um quadro meníngeo, com base na epidemiologia, as meningites bacterianas e virais apresentam uma maior relevância, devido sua elevada incidência na população e alta taxa de letalidade.³

A meningite bacteriana pode ser causada, em indivíduos suscetíveis, por qualquer espécie de bactéria; no entanto, as espécies *Haemophilus influenzae* tipo B, *Neisseria meningitidis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus* spp. e *Streptococcus pneumoniae* são frequentemente encontradas nas análises de LCR e, portanto, apresentam maior relevância quando comparadas com outras bactérias.^{4,5,6,7}

A meningite viral ocorre quando um processo inflamatório é desencadeado no SNC em resposta a uma infecção viral. Dentre os agentes etiológicos responsáveis por essa patologia estão os vírus da família Picornaviridae, como por exemplo: os enterovírus (Enterovirus -EVs); os arbovírus de diferentes famílias, como por exemplo: o vírus dengue (Dengue virus - DENV), o vírus Chikungunya (*Chikungunya*

vírus - CHIKV), o vírus Zika (Zika vírus - ZIKV) e o vírus Mayaro (Mayaro vírus - MAYV); e diversos vírus da família Herpesviridae, os quais serão objeto de foco desse estudo.^{2,8,9}

Embora as meningites virais e bacterianas ocorram prevalentemente de forma isolada, estudos demonstraram a possibilidade de ocorrência de meningite viral-bacteriana mista (mixed viral-bacteria meningitis), devido a coinfeção do LCR.¹⁰ Esse estudos identificaram duas principais ocorrências, sendo elas: 1- indivíduos com meningite bacteriana possuem uma maior probabilidade de reativação de vírus latentes, promovendo alterações na resposta imune, de modo a resultar em complicações no quadro da doença; 2- o aumento da carga viral no LCR, em indivíduos com meningite bacteriana, promove um aumento na probabilidade de morte por meningite bacteriana.¹¹

Nesse cenário, os vírus da família Herpesviridae, em especial os herpesvírus humanos (HHV), apresentam grande importância, devido a sua elevada prevalência na população, alta contagiosidade, neurotropismo e capacidade de instaurar infecções latentes, as quais são reativadas mediante alterações na resposta imune do hospedeiro.¹² Diante disso, esse estudo tem como objetivo identificar os genomas dos 8 HHV em amostras de LCR de pacientes atendidos no Hospital de Clínicas da UNICAMP, dentre os anos de 2017-2018 e 2022-2023, buscando entender os impactos clínicos da coinfeção.

METODOLOGIA:

Materiais

Foram selecionadas, inicialmente, amostras de LCR de pacientes atendidos no Hospital de Clínicas da UNICAMP (HC/UNICAMP), coletadas dentre os períodos de janeiro de 2017 até julho de 2018 e novembro de 2022 até março de 2023. Dentre essas amostras, foram consideradas elegíveis para o estudo apenas aquelas que cumpriram os seguintes critérios de inclusão: exame de cultura bacteriana positivo ou pleocitose com predomínio de polimorfonucleares (≥ 100 leucócitos/mm³ com $>50\%$ neutrófilos); ausência de coloração compatível com hemorragia; e ausência de repetição (uma amostra/paciente).¹¹

Ademais, também serão incluídos os resultados de exames laboratoriais e dados dos prontuários dos pacientes, obtidos através dos sistemas Vmsist3 e AGHUse. Os prontuários serão filtrados para seleção dos seguintes dados: hipótese diagnóstica inicial (HDI), sintomatologia apresentada, óbito e entre outros.

Métodos

As amostras de LCR, dentro dos critérios de inclusão, foram submetidas ao processo de extração de DNA, de acordo com o protocolo do BIOPUR Kit Extração Mini Spin Plus. Em seguida, foi realizada uma amplificação da sequência do gene da $\beta 2$ -microglobulina humana ($\beta 2$ -M) por meio de uma reação em cadeia da polimerase (PCR). Essa etapa tem como objetivo confirmar a ausência de inibidores da PCR,

bem como avaliar a presença e qualidade do DNA extraído.¹³ Ademais, todas as reações de amplificação do gene da β 2-M foram performadas contendo dois controles negativos, com objetivo de avaliar a possibilidade de contaminação.

Após esse processo, foram realizadas reações de nested-PCR (nPCR), objetivando aumentar a sensibilidade e especificidade na detecção do DNA dos HHV. Para realizar essas reações, foram selecionados primers para as sequências conservadas dos oito HHV.^{9,14} Vale ressaltar que todas as reações de nPCR realizadas nesse estudo contaram com dois controles positivos, objetivando garantir a acurácia da amplificação; e ao menos dois controles negativos, com objetivo de avaliar a possibilidade de contaminação.

Por fim, os dados obtidos através dos exames laboratoriais e dos prontuários dos pacientes serão contrastados e analisados através do teste “t” para amostras pareadas. Os resultados obtidos para os testes de PCR e nPCR serão analisados através de estatísticas descritivas. Ademais, também serão aplicados o teste exato de Fisher e o teste U de Mann Whitney, conforme a necessidade.

RESULTADOS PARCIAIS E DISCUSSÃO:

Características dos pacientes incluídos no estudo

No total foram incluídos 66 pacientes, sendo que 57 tiveram as amostras coletadas dentro o período de janeiro de 2017 até julho de 2018; e 9 dentro o período de novembro de 2022 até março de 2023, os quais apresentaram os dados sociodemográficos e dados de exames laboratoriais retratados nas Tabelas 1 e 2 e na Figura 1.

Características demográficas dos pacientes incluídos no estudo	
Idade, a	39 (0-74)
Sexo, no. (%)	
Feminino	24 (36%)
Masculino	42 (64%)
Etnia, no. (%)	
Branco	48 (73%)
Pardo	16 (24%)
Preto	2 (3%)
Mortalidade (%)	13/66 (20%)

Tabela 1. Características demográficas dos pacientes incluídos no estudo. Os valores são de mediana (intervalo), salvo indicação contrária.

Análises do LCR dos pacientes incluídos no estudo			
	Média ± DP	Mediana	25%-75%
Leucócitos (células/mm ³)	2878.8 ± 9627.9	562 (1 - 73950)	138 - 1878
Neutrófilos (%)	77.2 ± 23.5	86.5 (11 - 100)	64.5 - 95

Tabela 2. Análises do LCR dos pacientes incluídos no estudo. Os valores de leucócitos se referem a contagem global de leucócitos no liquor. Os valores de neutrófilos são referentes a contagem diferencial de leucócitos.

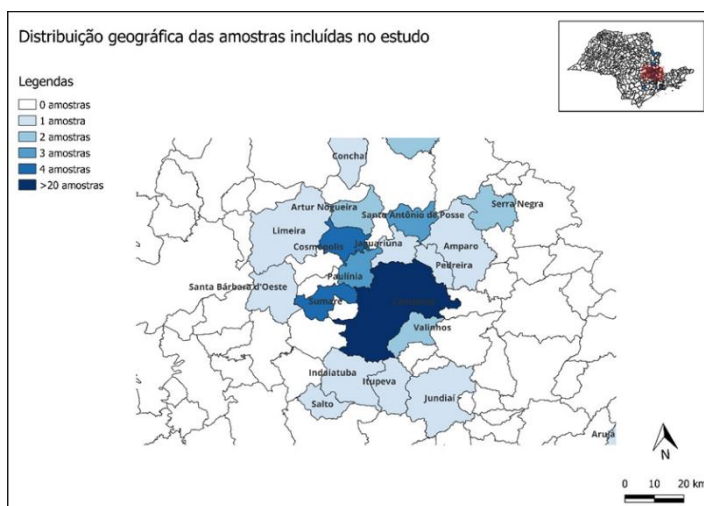


Figura 1. Distribuição geográfica das amostras incluídas no estudo. Mapa da Região Metropolitana de Campinas colorido conforme a distribuição das amostras incluídas no estudo.

Das 66 amostras incluídas no estudo, 36,4% apresentaram cultura bacteriana positiva, tendo um valor de mediana de 465 leucócitos/mm³. Das amostras positivas para cultura bacteriana, um total de 54,2% eram do gênero *Staphylococcus* spp.

Foram identificados HHV em 20/66 (30,3%) das amostras, sendo que os vírus HHV-6 e HHV-8 foram os mais prevalentes, conforme indica a Tabela 3. Codetecção ocorreu em 2/66 (3,03%) das amostras, sendo uma composta por HSV-1 + HHV-8 e outra composta por HSV-2 + HHV-8.

Prevalência de HHV nas amostras de LCR					
Vírus	Positivo (%)	Negativo (%)	Idade, a	Homens (%)	Óbitos (%)
HSV-1	2 (3,0%)	64 (97,0%)	40,5 (36-45)	2 (100,0%)	0 (0,0%)
HSV-2	1 (1,5%)	65 (98,5%)	73 (-)	1 (100,0%)	0 (0,0%)
HCMV	1 (1,5%)	65 (98,5%)	0 (-)	1 (100,0%)	0 (0,0%)
HHV-6	12 (18,2%)	54 (81,8%)	35,5 (0-64)	9 (75,0%)	2 (16,7%)
HHV-8	6 (9,1%)	60 (90,9%)	38,5 (22-73)	5 (83,3%)	1 (16,7%)

Tabela 3. Prevalência de HHV em amostras de LCR. Os valores são de mediana (intervalo), salvo indicação contrária.

O vírus HHV-6 é responsável pelo exantema súbito, o qual acomete principalmente crianças e recém-nascidos. Usualmente, esse vírus não costuma ocasionar sintomas graves, entretanto sabe-se que a infecção do liquor por HHV-6 pode ocasionar convulsões febris, e em casos mais graves meningoencefalites. Por sua vez, o vírus HHV-8, além de estar associado ao sarcoma de Kaposi, também é responsável pela doença de Castleman multicêntrica e por linfomas, todavia pouco se sabe sobre as consequências da infecção do LCR por HHV-8.

CONCLUSÕES:

Até o momento, o estudo demonstrou uma elevada prevalência dos HHV no sistema nervoso, ressaltando a importância da análise do impacto clínico da coinfeção por herpesvírus, especialmente dos vírus HHV-6 e HHV-8. Desse modo, na próxima etapa do projeto, a sintomatologia dos pacientes com meningite bacteriana será comparada entre aqueles que possuem detecção de herpesvírus no LCR e aqueles que não possuem, buscando analisar uma possível correlação entre a piora do quadro clínico e a presença de vírus no LCR.

BIBLIOGRAFIA

- 1- Tumani H, Huss A, Bachhuber F. The cerebrospinal fluid and barriers – anatomic and physiologic considerations. *Cerebrospinal Fluid in Neurologic Disorders*. 2018;21–32.
- 2- Kohil A, Jemmieh S, Smatti MK, Yassine HM. Viral meningitis: an overview. *Archives of Virology*. 2021 Jan 3;166(2):335–45.
- 3- 18- Dados Estatísticos - Secretaria da Saúde - Governo do Estado de São Paulo [Internet]. www.saude.sp.gov.br. [cited 2023 May 10]. Available from: <http://www.saude.sp.gov.br/cve-centro-de-vigilancia-epidemiologica-prof.-alexandre-vranjac/areas-de-vigilancia/doencas-de-transmissao-respiratoria/agrivos/meningites/dados-estatistico>
- 4- M. de Faria S, K. Farhat C. Meningites bacterianas - diagnóstico e conduta. *Jornal de Pediatria*. 1999;75:46–56.
- 5- Wall EC, Chan JM, Gil E, Heyderman RS. Acute bacterial meningitis. *Current Opinion in Neurology*. 2021 Jun 1;34(3):386–95.
- 6- Wyres KL, Lam MMC, Holt KE. Population genomics of *Klebsiella pneumoniae*. *Nature Reviews Microbiology*. 2020 Feb 13;18(6):344–59.
- 7- Swolana D, Wojtyczka RD. Activity of Silver Nanoparticles against *Staphylococcus* spp. *International Journal of Molecular Sciences*. 2022 Apr 13;23(8):4298.
- 8- Wright WF, Pinto CN, Palisoc K, Baghli S. Viral (aseptic) meningitis: A review. *Journal of the Neurological Sciences*. 2019 Mar 15;398:176–83.
- 9- Leon LL, Lima RG de, Boffi LC, Bindilatti RN, Garlipp CR, Costa SCB, et al. Arbovirus, herpesvirus, and enterovirus associated with neurological syndromes in adult patients of a university hospital, 2017-2018. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 2021;54.
- 10- Sferra TJ, Pacini DL. Simultaneous recovery of bacterial and viral pathogens from cerebrospinal fluid. *The Pediatric Infectious Disease Journal*. 1988 Aug;7(8):552-556. PMID: 2845346.
- 11- Kelly MJ, Benjamin LA, Cartwright K, Ajdukiewicz KMB, Cohen DB, Menyere M, et al. Epstein-Barr Virus Coinfection in Cerebrospinal Fluid Is Associated With Increased Mortality in Malawian Adults With Bacterial Meningitis. *The Journal of Infectious Diseases*. 2011 Nov 9;205(1):106–10.
- 12- Connolly SA, Jardetzky TS, Longnecker R. The structural basis of herpesvirus entry. *Nature Reviews Microbiology*. 2021 Feb 1;19(2):110–21.
- 13- Mehrabani-Khasraghi S, Ameli M, Khalily F. Demonstration of Herpes Simplex Virus, Cytomegalovirus, and Epstein-Barr Virus in Colorectal Cancer. *Iranian Biomedical Journal*. 2016 Nov 1;20(5):302–6
- 14- Rimério CAT, De Oliveira RS, de Almeida Bonatelli MQ, Nucci A, Costa SCB, Bonon SHA. Human herpesvirus infections of the central nervous system: Laboratory diagnosis based on DNA detection by nested PCR in plasma and cerebrospinal fluid samples. *Journal of Medical Virology*. 2015 Jan 21;87(4):648–55.