



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS - UFAM
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA –
PPGBIOTEC/UFAM



EWERTON DA SILVA FERREIRA

**DIVERSIDADE MICROBIANA NO LÍQUIDO CEFALORRAQUIDIANO DE
PACIENTES COM NEUROINFECÇÃO**

MANAUS – AM

2024

EWERTON DA SILVA FERREIRA

**DIVERSIDADE MICROBIANA NO LÍQUIDO CEFALORRAQUIDIANO DE
PACIENTES COM NEUROINFECÇÃO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, da Universidade Federal do Amazonas, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Área de concentração: Biotecnologia aplicada à Saúde.

ORIENTADOR: Prof. Dr. SPARTACO ASTOLFI FILHO

CO-ORIENTADOR(A): Prof. Dra. MICHELE DE SOUZA BASTOS BARRIONUEVO

MANAUS – AM

2024

Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

F383d Ferreira, Ewerton da Silva
Diversidade microbiana no Líquido cefalorraquidiano de pacientes com neuroinfecção / Ewerton da Silva Ferreira . 2024
93 f.: il. color; 31 cm.

Orientador: Spartaco Astolfi Filho
Coorientadora: Michele de Souza Bastos Barrionuevo
Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Federal do Amazonas.

1. Sequenciamento de alto rendimento. 2. Metagenômica. 3. Líquido cefalorraquidiano. 4. Meningite bacteriana. 5. Encefalite viral. I. Astolfi Filho, Spartaco. II. Universidade Federal do Amazonas III. Título

EWERTON DA SILVA FERREIRA

**DIVERSIDADE MICROBIANA NO LÍQUIDO CEFALORRAQUIDIANO DE
PACIENTES COM NEUROINFECÇÃO**

Dissertação apresentada como requisito final para a obtenção do título de Mestre em Biotecnologia pelo Programa de Pós-graduação em Biotecnologia (PPGBIOTEC) da Universidade Federal do Amazonas (UFAM).

Aprovado em dois de fevereiro de dois mil e vinte e quatro.

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Michele de Souza Bastos Barrionuevo, Presidente

Fundação de Medicina Tropical Doutor Heitor Vieira Dourado (FMT-HVD)

Prof^o. Dr. Edmar Vaz de Andrade, Membro

Universidade Federal do Amazonas (UFAM)

Pro^a. Dr^a. Cecília Fonseca Carvalho, Membro

Fundação de Medicina Tropical Doutor Heitor Vieira Dourado (FMT-HVD)

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus por estar sempre me guiando pelos melhores caminhos.

À minha família e amigos que me incentivaram a finalizar mais uma etapa da minha vida.

Ao meu orientador Prof^o. Dr. Spartaco Astolfi Filho e minha coorientadora Prof^a. Dr^a. Michele de Souza Bastos Barrionuevo por confiar no meu potencial. À Prof^a. MSc. Rossicleia Lins Monte por me dar a oportunidade de agregar conhecimentos dentro do laboratório ainda durante a graduação.

Às minhas amigas e companheiras de laboratório Prof^a. MSc. Sabrina Araújo de Melo, Prof^a; MSc. Eveny Perlize Melo Marinho, biomédica Valderjane Aprígio, e a todos os integrantes do Laboratório de Estudos em Neuroinfecções e Resistência Bacteriana (LENRESB/FMT-HVD).

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal do Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa, à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas (FAPEAM) pelo financiamento do estudo, ao Programa Nacional de Cooperação Acadêmica (PROCAD) em nome do Dr. Luiz Carlos de Lima Freire e Dr^a. Monique Freire Reis.

À Universidade Federal do Amazonas (UFAM) e ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia (PPGBIOTEC).

RESUMO

Introdução: As infecções do sistema nervoso são um desafio para a neurologia clínica, pois o diagnóstico tardio pode contribuir para a incapacitação e, às vezes, ao óbito. Considerando que grande parte do diagnóstico permanece sem identificação do agente infeccioso, novas tecnologias são desenvolvidas para contribuir com o diagnóstico. **Objetivo:** Este estudo tem como objetivo principal identificar a diversidade microbiana utilizando metagenômica em amostras de líquido cefalorraquidiano (LCR) de pacientes com suspeita de neuroinfecção. **Métodos:** Trata-se de um estudo observacional, descritivo e retrospectivo, que analisou amostras de LCR de casos confirmados e suspeitos para infecções virais e bacterianas. O sequenciamento foi realizado na plataforma *Illumina MiSeq System* baseada na ligação de fragmentos de DNA em *beads* magnéticas, e retornou um total de 15.696.300 *reads* com informações de cinco amostras de LCR. Todos os dados gerados foram baixados, validados e analisados quanto à qualidade para verificar a perda sobre cada leitura. Além disso, para melhorar a qualidade dos *reads*, os adaptadores, sequências de baixa qualidade e cerca de 10 nucleotídeos nas extremidades da fita de DNA foram cortados. Os *pipelines* DRAGEN metagenomics e KRAKEN2 foram utilizados para a classificação taxonômica das *reads*. **Resultados:** A análise de qualidade das *reads* com *q score* ≥ 30 foi de 86,10%, dos quais em 15,3% foi possível classificar 167 espécies de microrganismos nas amostras selecionadas. Cerca de 1.399.082 *reads* foram alinhadas ao genoma do hospedeiro. No entanto, a análise mostrou predominância do filo Proteobacteria (9,9%), Firmicutes (2,59%) e Actinobacteria (0,29%). Dentre as 17 amostras selecionadas, apenas em 5 (29,4%) foi possível realizar a análise metagenômica. Em 3/4 (75%) das amostras com identificação etiológica o resultado do NGS corroborou com o achado pelos métodos convencionais. Na amostra sem identificação etiológica, houve identificação de espécies dos gêneros *Staphylococcus*, *Streptococcus* e *Burkholderia*, onde o complexo *B. cepacia* foi considerado o possível patógeno causador da mastoidite e meningite. **Conclusão:** O uso do mNGS associado a outros testes para detecção de microrganismos no LCR é importante para identificação destes patógenos no LCR. Dessa maneira, esse estudo pode gerar pesquisas futuras que permitam explorar as *reads* obtidas para cada amostra, sobretudo aquelas que não tiveram *hits* com nenhum grupo taxonômico, de forma a aumentar ainda mais a sensibilidade do teste.

Palavras-chave: sequenciamento de alto rendimento, metagenômica, líquido cefalorraquidiano, meningite bacteriana, encefalite viral.

ABSTRACT

Background: Nervous system infections are a challenge for clinical neurology, as late diagnosis can contribute to disability and, sometimes, death. Considering that much of the diagnosis remains without identification of the infectious agent, new technologies have been developed to contribute to the diagnosis. **Objective:** This study's main objective is to identify microbial diversity using metagenomics in cerebrospinal fluid (CSF) samples from patients with suspected neuroinfection. **Methods:** This is an observational, descriptive and retrospective study, which analyzed CSF samples from confirmed and suspected cases of viral and bacterial infections. Sequencing was performed on the Illumina MiSeq System platform based on the ligation of DNA fragments onto magnetic beads, and returned a total of 15,696,300 reads with information from five CSF samples. All data generated was downloaded, validated and analyzed for quality to check loss on each read. Furthermore, to improve the quality of the reads, adapters, low-quality sequences and about 10 nucleotides at the ends of the DNA strand were cut. The DRAGEN metagenomics and KRAKEN2 pipelines were used for the taxonomic classification of the reads. **Results:** The quality analysis of reads with q score ≥ 30 was 86.10%, of which in 15.3% it was possible to classify 167 species of microorganisms in the selected samples. About 1,399,082 reads were aligned to the host genome. However, the analysis showed a predominance of the phylum Proteobacteria (9.9%), Firmicutes (2.59%) and Actinobacteria (0.29%). Among the 17 samples selected, only 5 (29.4%) were able to perform metagenomic analysis. In 3/4 (75%) of the samples with etiological identification, the NGS result corroborated the findings using conventional methods. In the sample without etiological identification, species of the genera *Staphylococcus*, *Streptococcus* and *Burkholderia* were identified, where the *B. cepacia* complex was considered the possible pathogen causing the mastoiditis and meningitis. **Conclusion:** The use of mNGS associated with other tests to detect microorganisms in CSF is important for identifying these pathogens in CSF. In this way, this study can generate future research that allows the exploration of the reads obtained for each sample, especially those that did not have hits with any taxonomic group, in order to further increase the sensitivity of the test.

Keywords: high-throughput sequencing, metagenomics, cerebrospinal fluid, bacterial meningitis, viral encephalitis.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1: Locais de produção, secreção e circulação do líquido cefalorraquidiano..... | 20 |
| Figura 2: Apresentação esquemática das vias patogênicas da meningite viral. | 28 |
| Figura 3: Cronologia do surgimento das tecnologias de sequenciamento após a descoberta da estrutura do DNA.. | 31 |
| Figura 4: Comparação do custo (em dólar) do sequenciamento genômico por dados do genoma. | 32 |
| Figura 5: Visão geral dos valores de qualidade em todas as bases após processamento do arquivo pela ferramenta <i>Fastqc</i> | 50 |
| Figura 6: Distribuição dos filios bacterianos alinhados para as sequências das amostras de LCR analisadas no estudo. | 52 |
| Figura 7: Visualização metagenômica interativa pelo software KRONA da amostra (AM-1) confirmada laboratorialmente e pelo sequenciamento para <i>N. meningitidis</i> | 53 |
| Figura 8: Distribuição da microbiota predominante a nível de filo (A) e gênero (B) na amostra de LCR do Caso 1 pelo KRAKEN2. | 54 |
| Figura 9: Visualização metagenômica interativa pelo software KRONA da amostra confirmada laboratorialmente e não confirmada pelo sequenciamento para <i>P. mirabilis</i> | 55 |
| Figura 10: Distribuição da microbiota predominante a nível de filo (A) e gênero (B) na amostra de LCR do Caso 2 pelo KRAKEN2. | 56 |
| Figura 11: Visualização metagenômica interativa pelo software KRONA da amostra confirmada laboratorialmente e pelo sequenciamento para HSV-1. | 57 |
| Figura 12: Distribuição da microbiota predominante a nível de filo (A) e gênero (B) na amostra de LCR do Caso 3 pelo KRAKEN2. | 58 |
| Figura 13: Visualização metagenômica interativa pelo software KRONA da amostra confirmada laboratorialmente e pelo sequenciamento para VZV. | 59 |
| Figura 14: Distribuição da microbiota predominante a nível de filo (A) e gênero (B) na amostra de LCR do Caso 4 pelo KRAKEN2. | 60 |
| Figura 15: Visualização metagenômica interativa pelo software KRONA da amostra suspeita de infecção bacteriana. | 61 |
| Figura 16: Distribuição da microbiota predominante a nível de filo (A) e gênero (B) na amostra de LCR do Caso 5 pelo KRAKEN2. | 62 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|----|
| Tabela 1: Características sociodemográficas, clínicas e laboratoriais dos pacientes com meningite bacteriana confirmada laboratorialmente por testes convencionais e moleculares..... | 40 |
| Tabela 2: Características sociodemográficas, clínicas e laboratoriais dos pacientes com encefalite herpética confirmada laboratorialmente por testes convencionais e moleculares..... | 41 |
| Tabela 3: Características sociodemográficas, clínicas e laboratoriais dos pacientes que tiveram o líquido cefalorraquidiano sugestivo de infecção bacteriana, mas que não foram confirmados por testes convencionais e moleculares..... | 42 |
| Tabela 4: Características sociodemográficas, clínicas e laboratoriais dos pacientes que tiveram o líquido cefalorraquidiano sugestivo de infecção viral, mas que não foram confirmados por testes convencionais e moleculares | 43 |
| Tabela 5: Relação de <i>primers</i> (oligonucleotídeos) utilizados na qPCR para o diagnóstico diferencial das amostras de LCR no período de janeiro de 2020 a novembro de 2022..... | 45 |
| Tabela 6: <i>Primers</i> (oligonucleotídeos) utilizados na PCR convencional para a detecção do gene 16S rDNA nas amostras de LCR no período de janeiro de 2020 a novembro de 2022..... | 46 |
| Tabela 7: Análise das <i>reads</i> das amostras incluídas na biblioteca e mapeamento das espécies identificadas..... | 51 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

| | |
|-----------|--|
| BHE | Barreira Hematoencefálica |
| BHL | Barreira Hematoliquórica |
| CMV | Citomegalovírus |
| DNA | Ácido desoxirribonucleico |
| EBV | Epstein-baar vírus |
| EMB | <i>Eosine Methylen Blue</i> |
| GLU | Glutamato |
| Hib | <i>Haemophilus influenzae</i> sorotipo b |
| HIV | Vírus da imunodeficiência humana |
| HSV-1 e 2 | Herpes simples tipo 1 e 2 |
| IgA | Imunoglobulina A |
| LCR | Líquido cefalorraquidiano |
| MB | Meningite bacteriana |
| MenACWY | <i>N. meningitidis</i> sorogrupo A, C, W e Y |
| NGS | Sequenciamento de nova geração |
| OMS | Organização Mundial da Saúde |
| OPAS | Organização Pan-Americana de Saúde |
| PGH | Projeto Genoma Humano |
| PIC | Pressão intracraniana |
| PL | Punção lombar |
| PNI | Programa Nacional de Imunizações |
| qPCR | Reação em cadeia da Polimerase Quantitativa |
| SNC | Sistema nervoso central |
| SNP | Sistema nervoso periférico |
| SUS | Sistema Único de Saúde |
| TTV | <i>Torque teno vírus</i> |
| UTI | Unidade de terapia intensiva |
| VZV | Varicela zoster vírus |

SUMÁRIO

| | | |
|----------|---|----|
| 1. | INTRODUÇÃO..... | 13 |
| 2. | REFERENCIAL TEÓRICO..... | 16 |
| 2.1. | O SISTEMA NERVOSO CENTRAL..... | 17 |
| 2.2. | BARREIRAS NEURAIS | 17 |
| 2.2.1. | BARREIRA HEMATOENCEFÁLICA..... | 18 |
| 2.2.2. | BARREIRA HEMATOLIQÚORICA..... | 18 |
| 2.3. | O LÍQUIDO CEFALORRAQUIDIANO..... | 19 |
| 2.3.1. | COMPOSIÇÃO DO LÍQUIDO CEFALORRAQUIDIANO..... | 21 |
| 2.3.2. | FUNÇÕES DO LÍQUIDO CEFALORRAQUIDIANO..... | 22 |
| 2.4. | INFECÇÕES DO SISTEMA NERVOSO CENTRAL | 23 |
| 2.4.1. | MENINGITE BACTERIANA | 23 |
| 2.4.1.1. | EPIDEMIOLOGIA DA MENINGITE BACTERIANA..... | 24 |
| 2.4.1.2. | FISIOPATOLOGIA DA MENINGITE BACTERIANA | 25 |
| 2.4.2. | MENINGITE VIRAL..... | 26 |
| 2.4.2.1. | EPIDEMIOLOGIA DA MENINGITE VIRAL | 27 |
| 2.4.2.2. | FISIOPATOLOGIA DA MENINGITE VIRAL | 28 |
| 2.5. | ANÁLISE DO LÍQUIDO CEFALORRAQUIDIANO..... | 29 |
| 2.6. | SEQUENCIAMENTO GENÔMICO..... | 30 |
| 2.6.1. | TECNOLOGIAS DE SEQUENCIAMENTO DE NOVA GERAÇÃO..... | 32 |
| 2.7. | O USO DO SEQUENCIAMENTO DE NOVA GERAÇÃO NO DIAGNÓSTICO DE MENINGITE | 34 |
| 3. | OBJETIVOS..... | 36 |
| 3.1. | OBJETIVO GERAL..... | 37 |
| 3.2. | OBJETIVOS ESPECÍFICOS | 37 |
| 4. | MATERIAIS E MÉTODOS..... | 38 |
| 4.1. | DESENHO DO ESTUDO | 39 |

| | | |
|--------|---|----|
| 4.2. | CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E EXCLUSÃO | 39 |
| 4.3. | ASPECTOS ÉTICOS | 44 |
| 4.4. | PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS DE LÍQUIDO CEFALORRAQUIDIANO 44 | |
| 4.4.1. | ANÁLISE BACTERIOLÓGICA | 45 |
| 4.4.2. | DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL..... | 45 |
| 4.4.3. | PCR DO GENE 16S rDNA BACTERIANO | 46 |
| 4.5. | ANÁLISE POR SEQUENCIAMENTO | 46 |
| 4.5.1. | QUANTIFICAÇÃO DO DNA..... | 46 |
| 4.5.2. | CONSTRUÇÃO E ANÁLISE DA BIBLIOTECA..... | 47 |
| 4.5.3. | SEQUENCIAMENTO E ANÁLISE BIOINFORMÁTICA | 47 |
| 5. | RESULTADOS | 49 |
| 5.1. | DADOS SOCIODEMOGRÁFICOS E CLÍNICOS DOS PACIENTES | 50 |
| 5.2. | PROCESSAMENTO DOS DADOS..... | 50 |
| 5.3. | MAPEAMENTO DAS AMOSTRAS | 51 |
| 5.4. | ANÁLISE DOS DADOS METAGENÔMICOS E CARACTERIZAÇÃO TAXONÔMICA..... | 51 |
| 5.4.1. | CASO 1 | 52 |
| 5.4.2. | CASO 2 | 54 |
| 5.4.3. | CASO 3 | 56 |
| 5.4.4. | CASO 4 | 58 |
| 5.4.5. | CASO 5 | 60 |
| 6. | DISCUSSÃO..... | 63 |
| 7. | CONCLUSÃO..... | 68 |
| 8. | REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 70 |
| 9. | CRONOGRAMA | 80 |
| 10. | APÊNDICE | 82 |
| 11. | ANEXO | 92 |

1. INTRODUÇÃO

O sistema nervoso humano é responsável por coordenar várias funções do organismo, como o processamento de informações, controle de comportamentos, percepções sensoriais, entre outros. Ele pode ser dividido em central, periférico e somático, sendo que o sistema nervoso central (SNC) é o principal, pois recebe e processa as informações para gerar impulsos aos órgãos efetores. Os principais órgãos do SNC são o encéfalo e a medula espinhal, que estão recobertos por três meninges que os protegem, e são denominadas pia-máter, dura-máter e aracnoide (BORON, 2015).

Entre as camadas aracnoide e pia-máter está localizado o espaço subaracnoide, onde circula o líquido cefalorraquidiano (LCR). Ele serve como um fluido protetor para o cérebro e medula espinhal, evitando que ocorra choques mecânicos e reduzindo o real peso do cérebro, uma vez que este fica flutuando no LCR. A produção do LCR ocorre principalmente nos plexos coroides dos ventrículos laterais, de onde é distribuído para os demais ventrículos. O LCR é um fluido claro, incolor, asséptico e composto de baixa concentração de proteínas e glicose, sendo rico principalmente de íons sódio (Na^+), cloreto (Cl^-) e bicarbonato (HCO_3^-) (BOLODEOKU et al., 1997; THOMPSON, 1995).

Qualquer alteração que ocorra na produção, composição ou fluxo do LCR, gera uma série de sinais e sintomas neurológicos. Essas alterações são comuns nas infecções do SNC e podem ser causadas por diversos patógenos como bactérias, fungos e vírus. Dentre elas, a meningite se destaca por causar uma inflamação nas meninges, com sintomas característicos como febre, rigidez de nuca, cefaleia, fotofobia e alteração do estado mental. A meningite bacteriana (MB) é importante causa de morbimortalidade em aproximadamente 13-27% dos casos, por isso requer avaliação e tratamento rápidos. Em comparação com a MB, a meningite viral (MV) tem sua letalidade mais baixa, onde apenas 4,5% dos casos evoluem ao pior prognóstico. (BENNINGER; STEINER, 2020; POPLIN, et al. 2020; WRIGHT; LAI; SINCLAIR, 2012).

Dentre as principais bactérias causadoras de MB estão as espécies de *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae* e *Haemophilus influenzae b*. Com a implantação da vacinação contra esses agentes gerou uma mudança na epidemiologia das MB nas décadas passadas. Como consequência, outras bactérias emergiram, sobretudo nos casos de meningites nosocomiais, que incluem bactérias Gram-negativas como *Escherichia coli*, *Klebsiella spp.*, *Pseudomonas aeruginosa*, entre outras. A maioria dos casos de MV são causadas por enterovírus e herpesvírus, e em algumas partes do mundo por arbovírus. (MACE, 2008; MCGILL, et al. 2017).

A análise do LCR é uma ferramenta poderosa para o diagnóstico das infecções do SNC. Atualmente, está bem descrito a dosagem de marcadores bioquímicos do LCR para o diagnóstico destas infecções, como dosagens de proteínas, glicose e lactato. Além disso, técnicas de coloração e cultura detectam as espécies bacterianas presentes no fluido, permitindo o direcionamento da antibioticoterapia. Porém, em alguns casos, o uso prévio de antimicrobianos, pode levar a inibição do crescimento ou não detecção do microrganismo em meios de cultura convencionais ou diagnóstico molecular. (COMAR, et al. 2009).

Para isso, novas metodologias têm surgido com o objetivo de melhorar a identificação etiológica das infecções no sistema nervoso. O sequenciamento metagenômico de nova geração (mNGS, *Metagenomics New Generation Sequencing*) é uma ferramenta com potencial para a detecção de DNA e RNA de patógenos causadores de infecções do SNC, uma vez que o LCR é uma amostra livre de contaminação. Um estudo recente avaliou a performance do mNGS no LCR de pacientes com suspeita de infecção, e 37,8% dos casos foram verdadeiramente positivos para diversos agentes infecciosos (GU et al., 2022; RAMACHANDRAN; WILSON, 2020).

A Fundação de Medicina Tropical Doutor Heitor Vieira Dourado (FMT-HVD) é um centro especializado no tratamento de doenças tropicais e infecciosas, e conta com um laboratório referência no diagnóstico de meningites, encefalites e meningoencefalites bacterianas e virais. Desta forma, este estudo propõe uma estratégia de vigilância laboratorial utilizando o mNGS, para identificar patógenos causadores de infecção do sistema nervoso, nos casos em que a etiologia permanece sem identificação.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1.O SISTEMA NERVOSO CENTRAL

O sistema nervoso humano é responsável por várias funções no organismo de acordo com as suas subdivisões. Mesmo que todos os componentes atuem em conjunto para um bom funcionamento do corpo, para simplificar o entendimento desse sistema, ele foi dividido em sistema nervoso central (SNC), periférico (SNP) e autônomo (SNA) (BORON, 2015).

O encéfalo é o principal órgão do SNC, pois é ele quem controla pensamentos, comportamentos, percepções sensoriais, entre outros. Além do encéfalo, o SNC é composto pela medula espinhal, a qual é recoberta por três membranas, denominadas leptomeninges. Essas membranas estão localizadas em três porções, onde a mais interna é denominada pia-máter, a mais externa dura-máter, e a intermediária é a aracnoide. São elas que ligam o parênquima do SNC ao crânio e à medula espinhal. (BORON, 2015; DASGUPTA & JEONG, 2019).

O desenvolvimento das leptomeninges inicia ainda na vida embrionária. A sua formação começa no 22-24º dia do estágio de desenvolvimento, onde as dobras neurais começam a se fundir e criar uma estrutura semelhante a um tubo, que posteriormente será chamada tubo neural. As meninges começam a surgir no 40º dia de gestação, a partir de uma camada fina interna chamada ectomesenquimal, que forma a endomeninge (ENGELHARDT; SOROKIN, 2009).

2.2.BARREIRAS NEURAI

O SNC é hermeticamente fechado do meio sanguíneo por duas barreiras principais: a barreira hematoencefálica (BHE) e a barreira hematoliquórica (BHL). As barreiras neurais foram descobertas por Paul Erlich (1880), em um experimento onde aplicou um corante no sistema vascular e observou que ele rapidamente se espalhou pelos órgãos, exceto pelo cérebro e medula espinhal. Erlich observou que corantes ácidos quando injetados na circulação sistêmica são capazes de corar órgãos periféricos do corpo. Porém, ele não supôs a existência de uma barreira, mas sim de que o SNC não possui receptores de drogas expressos nos tecidos periféricos que podiam se ligar ao corante (PARDRIDGE, 2016; SAUNDERS et al., 2014).

Em 1913, Goldmann realizou um experimento com corante azul trypan aplicando-o no líquido cefalorraquidiano (LCR) e observou que somente o tecido nervoso absorvia o corante. Os seus achados foram confirmados anos depois através de microscopia eletrônica e ressonância magnética. Posteriormente, outros estudos foram realizados com agente neurotóxicos aplicados no cérebro e no sistema vascular, onde foi verificado que a droga só

afetava a função cerebral quando aplicada diretamente no cérebro. A partir de então, foi entendido que a BHE e BHL são importantes para manter o ambiente cerebral protegido da circulação sistêmica. (ENGELHARDT; SOROKIN, 2009; TUMANI; HUSS; BACHHUBER, 2017).

2.2.1. BARREIRA HEMATOENCEFÁLICA

A BHE não é apenas uma barreira anatômica, ela também funciona como um tecido dinâmico que expressa moléculas transportadoras, receptoras e enzimas. A BHE está localizada ao nível das células endoteliais do plexo coroide, e compreende uma estrutura superficial de aproximadamente 12-18m² em adultos. Sua principal função é separar o cérebro da circulação sanguínea, mantendo a homeostase cerebral (PARDRIDGE, 2016; REDZIC, 2011).

A BHE é formada principalmente pelas células endoteliais dos capilares cerebrais, lâmina basal, pericitos, camada perivascular de terminação de astrócitos, células de interação da micróglia e neurônios, que são chamadas de unidade neurovascular. A BHE impede que substâncias do sangue cheguem ao cérebro, com exceção de algumas pequenas moléculas lipofílicas que são transportadas por transporte ativo para o cérebro (PARDRIDGE, 2016; TUMANI; HUSS; BACHHUBER, 2017).

2.2.2. BARREIRA HEMATOLIQUÓRICA

A BHL é a barreira que separa a circulação sanguínea do espaço que comporta o LCR. A BHL é composta principalmente de uma monocamada de células epiteliais do plexo coroide, que separa as substâncias produzidas no sangue daquelas produzidas no LCR. Ela difere da BHE em sua morfologia e fisiologia, uma vez que a BHL é selada por junções estreitas entre as células epiteliais do plexo coroide nos quatro ventrículos cerebrais e pelo epitélio subaracnoide voltado para o LCR nas áreas intracranianas e espinhais. O principal mecanismo de transferência na BHL ocorre através de transporte ativo mediado por carreadores ou receptores, ou por transporte passivo de compostos hidrofílicos (TUMANI; HUSS; BACHHUBER, 2017; UENO et al., 2016).

Como as células endoteliais fenestradas dos capilares no plexo coroide são permeáveis às substâncias produzidas no sangue, a BHL no epitélio do plexo coroide tem uma importante função no controle da entrada de substâncias para o LCR. Além disso, estudos recentes têm reportado que as junções entre as células endoteliais ao redor dos ventrículos são abertas e que a membrana pia-máter é conhecida por ser um tecido solto com comunicações ou fenestrações,

que permite o fluxo através dos fluidos (MACAULAY; KEEP; ZEUTHEN, 2022; UENO et al., 2016).

2.3.O LÍQUIDO CEFALORRAQUIDIANO

A primeira descrição clara do LCR foi feita em 1764, por Domenico Contugno (1736-1822), que observou a continuidade entre o cérebro e os fluidos espinhais. Esse momento pode ser considerado o início do entendimento da fisiologia do LCR, apesar de que essa observação permaneceu obscura por muitos anos e foi redescoberta 60 anos depois por François Magendie (1783-1855). Ele observou a presença normal do LCR no cérebro e nos ventrículos, em 1825 e 1827, respectivamente (BOLODEOKU et al., 1997; SAKKA; COLL; CHAZAL, 2011).

O LCR é um fluido transcelular, que preenche o espaço intracerebral ou intraventricular em até 20%, e extra cerebral ou subaracnóideo em 80%, e é originado do plasma através da ultrafiltração e do plexo coroide por secreção ativa nos ventrículos (Fig. 1). O LCR flui através das cisternas e espaço subaracnoide, e finalmente drena através da vilosidade aracnoide para o sangue venoso. Em condições normais, o volume de LCR produzido em adultos é cerca de 150-160mL, dos quais 20% estão depositados nos ventrículos (ADAM et al., 2001; THOMPSON, 1995).

É estimado que em torno de 80-90% do LCR é secretado pelo plexo coroide, uma estrutura altamente vascularizada de células epiteliais localizada nos ventrículos cerebrais. Após a produção no plexo coroide, o LCR circula pelos sistemas ventriculares do cérebro. O fluxo inicia nos ventrículos laterais, e migra para o terceiro ventrículo via forame de Monro. A partir de então, o fluxo continua através do aqueduto cerebral de Sylvius para o quarto ventrículo e para o espaço subaracnóideo através das aberturas de Magendie e Luschka (BOTHWELL; JANIGRO; PATABENDIGE, 2019; YAMADA, 2021).

Além de produzir o LCR, os plexos coroides também tem a função de transportar moléculas pequenas entre o sangue e o LCR. Esse mecanismo é mediado por transportadores em um processo dependente de sódio, e essa rota é importante para o tratamento de tumores cerebrais, onde as drogas são desenhadas com base nessa permeabilidade dos plexos coroides. Além disso, o LCR circula a partir do plexo coroide, em uma taxa de aproximadamente 25ml/h. Esse fluxo movimentava o LCR recém produzido e o remanescente, removendo assim produtos residuais do cérebro (SEGAL, 2000; WRIGHT; LAI; SINCLAIR, 2012).

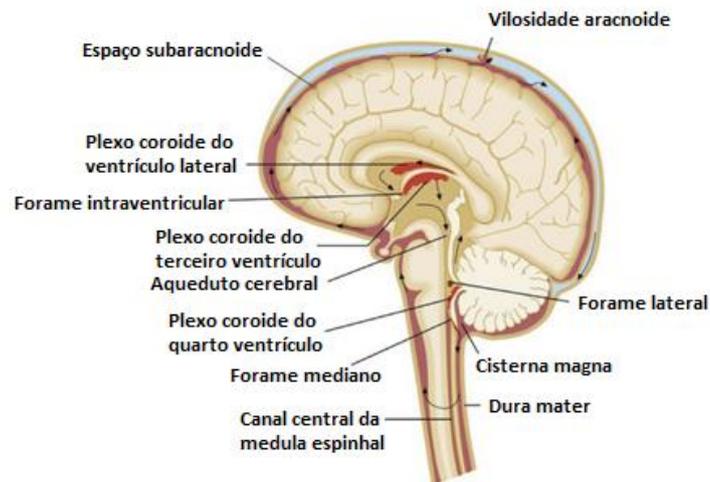


Figura 1: Locais de produção, secreção e circulação do líquido cefalorraquidiano.

Fonte: Adaptado de Tumani H, *et al.* 2018.

As células epiteliais em torno dos capilares são quem compõem a BHL, a qual controla seletivamente o movimento dos solutos e água para regular a composição do LCR. Para a manutenção deste volume, a secreção e drenagem do LCR tem que ser igual. Desequilíbrios podem produzir um aumento no conteúdo total do fluido do cérebro e, conseqüentemente, causar aumento na pressão intracraniana. Acreditava-se que o LCR fluía conforme a pulsação do plexo coroide, porém estudos posteriores relataram que o fluxo do LCR ocorre com a frequência respiratória, e em menor grau, a cardíaca. Isso permite correlacionar o fluxo bidirecional do LCR durante a inspiração e expiração (BOTHWELL; JANIGRO; PATABENDIGE, 2019; THOMPSON, 1995).

A próxima etapa de fluxo do LCR é a passagem do espaço subaracnoide para a circulação sistêmica. O LCR é drenado para a circulação venosa principalmente pelo tecido de granulação aracnoide. Cada vilosidade deste tecido permite o fluxo unidirecional do LCR para o sangue, através da ação de uma válvula. A homeostase do LCR é importante tanto no indivíduo saudável quanto no doente. (BOTHWELL; JANIGRO; PATABENDIGE, 2019; YAMADA *et al.*, 2013).

Algumas condições patológicas como derrame ou lesão cerebral podem levar à um aumento na pressão intracraniana (PIC), que se não tratada pode causar herniação ou até mesmo a morte. A PIC é influenciada pela pressão liquórica e sanguínea, e como o tecido cerebral é recoberto pela caixa craniana rígida, qualquer alteração na pressão do sangue e LCR causa aumento na PIC. As oscilações na PIC podem afetar negativamente a função cerebral e diversos

processos patológicos podem alterar a homeostase do LCR e impactar no fluxo sanguíneo cerebral. Dentre os principais processos estão as lesões, obstrução do fluxo do LCR e compressão da veia jugular. (MACAULAY; KEEP; ZEUTHEN, 2022; WRIGHT; LAI; SINCLAIR, 2012).

2.3.1. COMPOSIÇÃO DO LÍQUIDO CEFALORRAQUIDIANO

O LCR é um ultrafiltrado plasmático composto principalmente de íons sódio, cloreto e bicarbonato, e em menor quantidade de potássio, magnésio, cálcio, além de vitaminas como folato, ácido ascórbico, tiamina e piridoxal monofosfato. O sódio é o íon mais abundante no LCR, sendo importante no transporte e regulação da osmolaridade do fluido. A concentração de potássio é essencial para o funcionamento neuronal e a liberação de neurotransmissores. O nível de potássio líquido é menor que o plasmático e isto é mantido em uma margem muito estreita (DI TERLIZZI; PLATT, 2006; SAKKA; COLL; CHAZAL, 2011).

Alguns peptídeos e proteínas são ativamente transferidos para o LCR derivados do sangue, ou sintetizadas no próprio plexo coroide, como por exemplo, a transtirretina, e fator de crescimento *like*-insulina (IGF-1), entre outros. Cerca de 20% dos peptídeos do LCR são derivados do cérebro, e a concentração deles diminui com o fluxo do LCR dos ventrículos para o espaço subaracnóideo. Alguns autores acreditam que a dosagem de proteínas no LCR não reflete a concentração real, uma vez que varia em algumas condições, como idade avançada e esclerose múltipla (ADAM et al. 2001; SAKKA; COLL; CHAZAL, 2011; SPECTOR; ROBERT SNODGRASS; JOHANSON, 2015).

A concentração de proteínas no LCR é muito baixa, variando de 15-45 mg/dL. Valores aumentados podem ser encontrados em casos de ruptura da BHE onde há extravasamento dessas moléculas para o LCR. A principal proteína presente no LCR é a albumina, com taxas de 50-70%. A glicose que circula no LCR é proveniente do plasma, e corresponde a cerca de 60-80% da glicemia. As moléculas de glicose são transportadas para o fluido através de mecanismos de transporte facilitado ou difusão, sendo esse último responsável por internalizar uma quantidade mínima de glicose no LCR (COMAR et al., 2009; DI TERLIZZI; PLATT, 2006).

Algumas enzimas também estão presentes no LCR que são provenientes do sangue, tecido neural e da produção pelas próprias células. Um exemplo é a creatina quinase, que quando elevada no LCR pode indicar doença do sistema nervoso. Sua concentração no LCR independe do soro e pode refletir várias doenças neurológicas, como aquelas de pior prognóstico. Aspartato transaminase e lactato desidrogenase também são importantes, pois

quando elevada no LCR pode indicar degeneração extensa da mielina e linfoma ou doenças inflamatórias, respectivamente. Porém, esses parâmetros não são muito utilizados na análise do LCR pois não são específicos (DI TERLIZZI; PLATT, 2006).

Uma variedade de peptídeos biologicamente ativos tem sido detectada no SNC. O ácido gama-aminobutírico (GABA) e glutamato (GLU), são os principais neurotransmissores inibitório e excitatório, respectivamente, encontrado no LCR. São moléculas produzidas pelos neurônios e que tem sido estudada em humanos para entendimento de muitas doenças neurológicas. O GLU, por exemplo, desempenha um papel muito importante como mediador de danos de tecidos secundários e são encontrados em concentrações elevadas no LCR em muitas doenças neurológicas, como em lesões crônicas e agudas da medula espinhal e herniação do disco intervertebral (BURBACH, 1982; DI TERLIZZI; PLATT, 2006).

2.3.2. FUNÇÕES DO LÍQUIDO CEFALORRAQUIDIANO

Por muito tempo, acreditava-se que o LCR era apenas um envelope fluídico que envolvia e protegia o SNC. Porém, com o passar dos anos e o desenvolvimento de novos estudos sobre o fluido, outras importantes funções foram verificadas, como protetora, estrutural, hidrodinâmica, metabólica e imunológica no sistema nervoso. Uma função importante do LCR é prover proteção mecânica do cérebro em casos de movimentos rápidos ou abruptos da cabeça e traumas suaves, e deste modo prevenir dano devido a colisão entre o cérebro e crânio (BOLODEOKU et al., 1997; TUMANI; HUSS; BACHHUBER, 2017).

O LCR funciona como um ambiente de flutuação do encéfalo, que pesa cerca de 1.500g no ar, e quando imerso no LCR pesa apenas 50g. Isso reduz a aceleração do encéfalo quando o crânio sofre algum trauma ou deslocamento súbito, reduzindo os danos de concussão que leva a um estado de alteração da consciência. O LCR também tem a capacidade de remover detritos de produtos metabólicos, como o gás carbônico (CO₂), lactato e íons hidrogênio (H⁺). Drogas e outras substâncias também são eliminadas pelo LCR quando essas acessam o encéfalo pelo sangue (PUCCIONI-SOHLER, 2008).

Além disso, o LCR também é importante na comunicação das funções encefálicas e endócrinas do organismo, através do transporte de hormônios, fatores de liberação, entre outros. Esse fluido também exerce a homeostase química no SNC, controlando o meio químico, e estando em comunicação com o fluido intersticial encefálico para manter o equilíbrio do meio externo para neurônios e glia (PUCCIONI-SOHLER, 2008; TUMANI; HUSS; BACHHUBER, 2017).

2.4.INFECCÕES DO SISTEMA NERVOSO CENTRAL

As infecções agudas e crônicas do SNC causam alterações na PIC, composição e fluxo do LCR. O grande desafio na visão clínica, é identificar os pacientes que tem um risco de vida maior de acordo com os sinais e sintomas apresentados. As principais infecções incluem a meningite, encefalite e meningoencefalite, das quais a meningite é muito importante por estar associada a taxa de mortalidade que varia de 13 a 27% (SCHELD; WITHLEY; MARRA, et al., 2014).

Diferentes patógenos podem alcançar o cérebro e a medula espinhal pela via hematogênica, e com menor frequência por ação direta através de outro foco infeccioso. A detecção precoce e o diagnóstico específico são imprescindíveis. Em alguns casos, a neuroimagem se mostra importante para o processo de diagnóstico, juntamente com o histórico médico, exame clínico, e análise do LCR. A ressonância magnética também tem sido particularmente útil na detecção precoce da infecção ou no diagnóstico diferencial de outras doenças (RUMBOLDT; THURNHER; GUPTA, 2007).

2.4.1. MENINGITE BACTERIANA

A meningite é uma grave infecção que requer cuidados médicos imediatos. É definida como uma infiltração inflamatória e infecciosa das membranas pia-máter e aracnoide, a qual pode ser causada por bactérias, vírus ou fungos. O diagnóstico é baseado na apresentação clínica típica com quadro de cefaleia, febre, rigidez de nuca, fotofobia, vômitos, e alteração da consciência, em conjunto com achados do LCR característicos da infecção (RUMBOLDT; THURNHER; GUPTA, 2007; SWANSON, 2015).

A meningite bacteriana (MB) ocorre quando a bactéria acessa o SNC e o espaço subaracnoide. Essa invasão gera uma resposta imune que pode liberar fatores inflamatórios, como citocinas, que geram danos e aumentam a permeabilidade da BHE. Alguns fatores de risco podem estar associados à ocorrência de MB, dentre eles a idade, pois bebês tem mais chance de desenvolver meningite do que pessoas adultas; certas condições médicas, como imunossupressão por drogas ou pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV); pessoas que estão em contato diariamente com agentes infecciosos, como trabalhadores da saúde, entre outros. (BENNINGER; STEINER, 2020; GIOVANE; LAVENDER, 2018; SWANSON, 2015).

2.4.1.1.EPIDEMIOLOGIA DA MENINGITE BACTERIANA

A ocorrência e fatalidade pela MB varia de acordo com a região, país, microrganismo e faixa etária. Anualmente, estima-se que ocorra cerca de 1,2 milhões de MB em todo o mundo. Em casos em que não há tratamento, a taxa de letalidade pode chegar a 70%, e um a cada cinco sobreviventes permanecem com sequelas após a ocorrência da MB, como problemas auditivos, neurológicos e motores. Mesmo com uma terapia antimicrobiana adequada, a taxa de mortalidade permanece alta entre 13-27% dos casos. (CDC, 2016; HOLMQUIST, 2008).

Nos Estados Unidos, a meningite é responsável por aproximadamente 72 mil internações, gerando um gasto total de 1,2 bilhões de dólares anuais. No entanto, atualmente a incidência da MB diminuiu nos últimos anos de 3 a 5 casos por 100.000 habitantes para 1,3 a 2 casos por 100.000. Porém, em países de baixa renda essas taxas ainda permanecem altas. As MB comunitárias são frequentemente causadas por espécies de *Streptococcus pneumoniae*, *Neisseria meningitidis* e *Haemophilus influenzae b* (Hib). Outras bactérias Gram-negativas são responsáveis por MB associadas aos cuidados em saúde, como *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae* (BENNINGER; STEINER, 2020; BHIMRAJ, 2012; WALL et al., 2021).

Com a implantação das vacinas conjugadas, a epidemiologia das MB mudou nos últimos 25 anos. Até a década de 80, *S. pneumoniae*, *N. meningitidis* e Hib causavam mais que 80% das infecções em crianças. A primeira vacina implantada foi a conjugada contra Hib, em 1990, a qual eliminou consideravelmente os casos de infecção por *Haemophilus influenzae b*. Os programas mundiais de imunização aderiram a vacina, o que levou a uma redução de 55% no número de casos. Nos anos 2000, foi então implantada a vacina conjugada heptavalente pneumocócica, resultando em uma diminuição de 59% das meningites pneumocócicas em crianças menores de 2 anos (SLACK et al., 2021; SWANSON, 2015).

Na década de 70, São Paulo sediou a maior epidemia de doença meningocócica do Brasil causada por *N. meningitidis* sorogrupo C, e em seguida pelo sorogrupo A, em 1974. Nesse período, muitas vacinas conjugadas polissacarídicas foram testadas, levando ao controle da doença em 1975. Em 1980, a incidência de doença meningocócica diminuiu para 1 caso a cada 100.000 habitantes. Anos depois, em 1987, o sorotipo B emergiu sendo responsável por uma nova onda de casos em vários locais do país. O ápice da epidemia foi em 1996, onde foram registrados 7.104 casos de meningite meningocócica, principalmente no Sudeste (MORAES; BARATA, 2005; SÁFADI; BARROS, 2006).

No estado do Amazonas, um estudo baseado em dados de sistema de vigilância epidemiológica de meningites relatou a ocorrência de 2.007 casos de meningite meningocócica com média de 54,2 casos/ano em um período de 32 anos, com 41,8% de infecções relatadas para o sorotipo B. Além disso, os autores observaram uma diminuição no número de casos de MB por *H. influenzae* e aumento de infecções por *S. pneumoniae*. É possível que esse declínio de casos de MB por *H. influenzae* seja devido à introdução da vacina anti-Hib no ano 2000 (SARAIVA et al., 2015).

A vacinação é a principal estratégia para prevenção da doença meningocócica. As primeiras vacinas conjugadas baseadas nos polissacarídeos bacterianos A, C, W e Y foram essenciais, porém não protegiam os bebês por um longo período de tempo. Dessa forma, foi estudada uma estratégia de melhoria da vacina, conjugando uma proteína portadora, a MenACWY, possibilitando a proteção de crianças que tem risco de desenvolver a doença (PARIKH et al., 2020; PIZZA; BEKKAT-BERKANI; RAPPUOLI, 2020).

Duas medidas são necessárias para a diminuição da ocorrência de MB mundialmente: prevenção e tratamento. No Brasil, o Programa Nacional de Imunizações (PNI) se tornou um patrimônio e referência internacional, reconhecido mundialmente pela Organização Mundial de Saúde (OMS) e Organização Pan-Americana de Saúde (OPAS). Responsável pela elaboração da política de vacinação no Brasil, acompanha desde o processo de compra dos imunizantes até à distribuição e definição do público a ser vacinado. O Sistema Único de Saúde (SUS) disponibiliza mais de 20 vacinas para o público, incluindo desde recém-nascidos até idosos (PIZZA; BEKKAT-BERKANI; RAPPUOLI, 2020; UNASUS, 2022).

2.4.1.2.FISIOPATOLOGIA DA MENINGITE BACTERIANA

A bactéria pode acessar o SNC através de algumas infecções como: bacteremia, infecções dentárias, sinusais, procedimentos cirúrgicos, entre outros. Após alcançar a circulação sanguínea, as bactérias ativam o sistema complemento do hospedeiro, permitindo a sua passagem para o espaço subaracnoide, atravessando a BHE para acessar o LCR. Como os mecanismos imunológicos do LCR são pobres, o microrganismo consegue se disseminar e proliferar. Na tentativa de se defender, o sistema imune do hospedeiro começa a gerar uma cascata de eventos inflamatórias, que geram os sinais e sintomas característicos da meningite (MACE, 2008; ROOS, 2000).

Muitos desses patógenos primeiramente colonizam as superfícies de mucosa através da ligação por proteínas da matriz extracelular, como por exemplo, a laminina, colágeno ou

fibronectina, que facilita a adesão inicial antes da invasão pelo microrganismo. Algumas bactérias, como *N. meningitidis*, *S. pneumoniae* e Hib, são capazes de sintetizar proteases de imunoglobulinas A (IgA) que inativam aquelas produzidas pelo hospedeiro para a resposta imune. A IgA é importante na defesa local de invasão por esses agentes, e a sua destruição permite a adesão epitelial e colonização bacteriana. Por serem bactérias encapsuladas, elas também conseguem escapar do processo fagocitário do hospedeiro e bactericida mediada pelo sistema complemento (MACE, 2008; MCGILL et al., 2016).

Todas as bactérias são capazes de romper BHE e BHL para acessar o SNC, e essa translocação pode ocorrer por um processo paracelular ou transcelular, dependendo da bactéria e dos fatores de virulência que expressa. Por exemplo, a *Escherichia coli* também pode causar meningite através da danificação de células do hospedeiro, que rompe a BHE e promove a invasão através de um processo paracelular. Essa invasão gera a atração de células para o local, como granulócitos, monócitos ou macrófagos, que também se infiltram no parênquima cerebral infectado (MCGILL et al., 2016; WALL et al., 2021).

A resposta imune causada no hospedeiro pode ser grave e não tolerada, como em recém-nascidos, e isso gera um dano neuronal que pode levar à morte. Quando o hospedeiro sobrevive à infecção, algumas sequelas como surdez, cegueira, ou retardos mentais podem permanecer. Outras complicações cerebrovasculares também podem ocorrer, como isquemia cerebral e atividade convulsiva. A presença de um exsudato purulento no espaço subaracnoide também pode gerar hidrocefalia comunicante e obstrutiva, edema intersticial e paralisia dos nervos cranianos (DORAN et al., 2016; MACE, 2008).

2.4.2. MENINGITE VIRAL

A meningite viral (MV), também conhecida como meningite asséptica, é uma inflamação causada nas meninges devido à entrada do vírus no SNC carregados pelas células imunes ou pela travessia da BHE. A etiologia viral é a mais importante das meningites assépticas, pois é responsável por aproximadamente 75.000 novos casos anualmente nos EUA. Os arbovírus, enterovírus (EVs) e os herpesvírus são importantes agentes causadores de meningite viral, e em alguns casos também podem ser encefalitogênicos (KOHIL et al., 2021; VENKATESAN; MURPHY, 2018).

A MV ocorre com um quadro de início agudo de febre, cefaleia, fotofobia, rigidez de nuca, e muitas das vezes, náuseas e vômitos. Geralmente as infecções têm bom prognóstico e é importante ser avaliada, pois não há indicadores que permitam distinguir entre infecção viral

ou bacteriana. A MV é comum principalmente em crianças, mas também pode ser observada em qualquer faixa etária (LOGAN; MACMAHON, 2008; WRIGHT et al., 2019).

2.4.2.1.EPIDEMIOLOGIA DA MENINGITE VIRAL

A meningite asséptica é relativamente comum nos EUA, com taxa de incidência de 7,6 casos para cada 100.000 habitantes. Ela pode ser de origem infecciosa, como aquelas causadas por vírus, e não infecciosa, quando por medicamentos, quimioterapia e vacinas. Os principais vírus relatados para meningite asséptica infecciosa são os enterovírus, herpesvírus e vírus *West Nile*. Outros vírus também são identificados, como citomegalovírus e HIV. Entretanto, cerca de 30-65% das etiologias de MV não são definitivamente identificadas (MOUNT; BOYLE, 2017; POPLIN; BOULWARE; BAHR, 2020).

Os EVs humanos são vírus de RNA capazes de causar infecção principalmente em crianças, sobretudo em locais com clima temperado e no período de junho a outubro. Os surtos se repetem anualmente, apesar das mudanças nas linhagens virais predominantes. A transmissão dos EVs ocorre principalmente por via fecal-oral, e menos comumente por secreções respiratórias. A incidência anual no mundo de MV por EVs é de 1,8 casos por 100.000 habitantes, com desfecho desfavorável em 24% dos casos. (DE JONG et al., 2018; BODILSEN et al., 2021; STOFFEL et al., 2021).

Em 1970, a família *Herpesviridae* foi categorizada em subfamílias de acordo com suas características biológicas distintas em alfa, beta e gama-herpesvírus. Essa família é composta por vírus de DNA dupla fita envoltos por um capsídeo icosaédrico. Todos os herpesvírus são capazes de causar infecção em humanos, como infecções no SNC, provocando quadros de meningite e encefalite. A etiologia herpética é responsável por aproximadamente 10% das meningites virais, principalmente pelo herpes simplex tipo 1 e 2 (HSV-1 e HSV-2) que estão associados a infecções em todo o mundo e em qualquer faixa etária (BHARUCHA; HOULIHAN; BREUER, 2019; MATTHEWS et al., 2022; VENKATESAN; MURPHY, 2018).

A utilização de técnicas de PCR tem facilitado o diagnóstico dos agentes causadores de MV. No estado do Amazonas, através desta metodologia foi possível detectar 29,7% de agentes causadores de meningite asséptica, dos quais os enterovírus foram mais frequentes em 32% dos casos, seguidos de Epstein-barr vírus (22,4%), vírus da varicela-zóster (20,4%), citomegalovírus (18,4%), HSV-1 e HSV-2 (4,1%). Os arbovírus foram detectados em apenas 14,3% dos casos, distribuídos entre vírus da dengue e Oropouche (SARAIVA et al., 2015; TUPPENY, 2013).

2.4.2.2.FISIOPATOLOGIA DA MENINGITE VIRAL

A patogênese da MV inicia quando o vírus realiza uma infecção primária, como no trato gastrointestinal pelos EVs humanos, e assim chega ao tecido nervoso através de uma infecção secundária orientada pela corrente sanguínea (Fig. 2). O vírus acessa o SNC por diversos mecanismos, como através de invasão tecidual do plexo coroide, tecido linfoide ou tecido nervoso periférico, indução de inflamação, e pelo rompimento da BHE. Essa invasão causa a meningite ou outros problemas neurológicos (KIM et al., 2009; KOHIL et al., 2021).

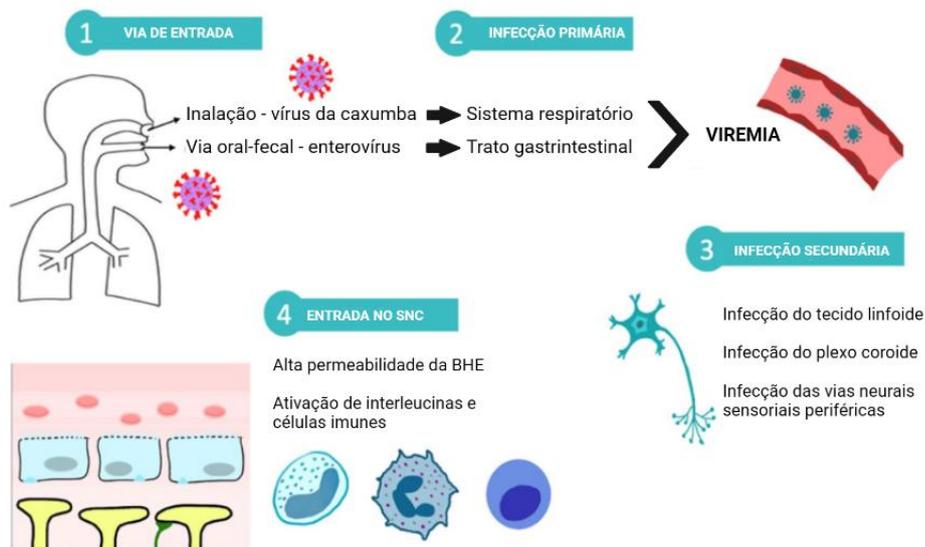


Figura 2: Apresentação esquemática das vias patogênicas da meningite viral.

Fonte: Adaptado de Kohil *et al.* 2021.

Uma vez que o agente alcança o SNC, a reposta imune do hospedeiro é ativada, aumentando níveis de quimiocitocinas e de células imunes como neutrófilos, células T CD8 e monócitos. Além disso, interleucinas (IL) pré- e pró-inflamatórias também podem ser detectadas, como IL-6 e IL-1. Essa inflamação desempenha um papel importante na patogênese da MV, entretanto a resposta imune dessa infecção ainda é pouco compreendida (KOHIL et al., 2021; RAMILO et al., 1990).

Geralmente, pacientes com MV apresentam na punção lombar pressão de abertura normal ou levemente alterada, glicorraquia e lactatorraquia normais, proteinorraquia normal ou aumentada. A contagem de leucócitos na MV é alta, com predomínio inicial de células polimorfonucleadas, mais frequentes neutrófilos em até 50% das células, e após células mononucleadas com desvio gradual de linfócitos em até 80% das células. Apesar de

característica, a MV ainda pode ser confundida com MB, por isso são levadas em consideração outros parâmetros laboratoriais como dosagem de procalcitonina, proteína C reativa, entre outros (KAUR et al.,2023; LYONS, 2018).

2.5.ANÁLISE DO LÍQUIDO CEFALORRAQUIDIANO

A suspeita de meningite é uma das principais indicações para realização da punção lombar (PL). Essa é uma técnica invasiva na qual possibilita o acesso ao compartimento restrito do espaço subaracnoide para coletar a amostra de LCR. O processo consiste na introdução de uma agulha na terminação da medula espinhal, passando através da dura-máter, e permitindo o acesso ao espaço subaracnoide. A primeira descrição da PL foi feita por Quincke (1891) que a definiu como uma técnica terapêutica usada para diminuir a PIC em crianças com meningite. Atualmente, a técnica é utilizada principalmente para procedimentos de diagnóstico, para obter amostras de LCR para análises futuras, ou para administrar drogas para acessar o SNC (HEPNAR et al., 2019; WRIGHT; LAI; SINCLAIR, 2012)

A análise do LCR é útil no diagnóstico de condições neurológicas agudas e ajuda no início da terapêutica em tempo hábil. Resumidamente, a análise consiste em medição da pressão de abertura, análise bioquímica, citológica, imunológica e microbiológica. Em alguns casos, a PL e drenagem do LCR também pode ser uma terapêutica para diminuir a PIC. Além disso, outros métodos de diagnóstico podem ser utilizados, como a reação em cadeia da polimerase (PCR) para detecção de outros agentes, de forma a contribuir para o prognóstico do paciente e terapia adequada (HEPNAR et al., 2019; HRISHI; SETHURAMAN, 2019).

O exame de LCR fornece informações fundamentais sobre o comprometimento do SNC e determina a decisão de exames ou terapias adicionais. A pressão de abertura é lida com um manômetro colocado na extremidade da agulha, antes da coleta do LCR. A leitura deve ser feita com o paciente em decúbito lateral, e se a punção for feita com o paciente na posição sentada, deve ter cuidado ao colocá-lo em decúbito lateral para não quebrar a agulha durante o movimento. Dependendo do calibre da agulha, o fluxo do LCR até o manômetro pode demorar alguns minutos. Para garantir a PIC o paciente deve inspirar e expirar várias vezes até que o LCR não se movimente tanto no manômetro (DEPREITERE; BRUYNINCKX; GÜIZA, 2016).

A análise bioquímica do LCR é baseada principalmente na dosagem de proteínas, glicose e lactato. As proteínas totais é um parâmetro não específico, mesmo assim é essencial para uma orientação básica e rápida do estado clínico do paciente. Sendo necessária a dosagem das proteínas totais, pois, o aumento destas, indicam desestabilização das células da BHL. Um

exame adicional é o proteinograma completo do LCR que traz informações mais específicas. Em recém-nascidos, a concentração de proteínas é alta e vai diminuindo com o passar dos anos (HEPNAR et al., 2019).

Em adultos, a concentração de proteínas aumenta com a idade. A principal proteína dosada é a albumina, e a sua medição deve ser feita no LCR e soro, porém valores aumentados também podem estar relacionados à idade do paciente. A concentração normal de proteínas no LCR em um indivíduo adulto é de até 40mg/dL, quando obtido por PL. Em geral, alta concentração de proteínas no LCR (hiperproteinorraquia) está relacionada ao rompimento da BHL ou síntese intratecal de anticorpos. (PUCCIONI-SOHLER, 2008).

Outro parâmetro essencial na análise do LCR é a dosagem de glicose. A concentração da glicorraquia é dependente da glicemia, pois a glicose é transportada ativamente entre a BHE. Em condições normais, a glicose no LCR representa 2/3 da glicemia, variando de 45-80mg/dL. A avaliação no soro e no LCR devem ser feitas simultaneamente para efeitos de comparação. Em alguns casos é recomendado fazer o cálculo do quociente de glicose no LCR, baseado na concentração de glicose e lactato, para determinar o estado de energia líquórico. A diminuição da glicose no LCR (hipoglicorraquia) é comum em infecções bacterianas, fúngicas e meningite tuberculosa. (HEPNAR et al., 2019; PUCCIONI-SOHLER, 2008).

O lactato é um parâmetro líquórico importante no diagnóstico de infecções bacterianas, e seu aumento está relacionado ao aumento do metabolismo anaeróbico da glicose e acidose tecidual. Sua concentração no LCR não tem relação com a plasmática, pois sua produção ocorre no SNC, sugerindo glicólise anaeróbica. Em infecções bacterianas, o lactato é um importante sinalizador pois ele aumenta primeiro, quando comparado à diminuição da glicose. A concentração do lactato no LCR varia de acordo com a idade, podendo variar de 10,8-23,4 mg/dL em condições normais. (PUCCIONI-SOHLER, 2008).

2.6.SEQUENCIAMENTO GENÔMICO

O surgimento das metodologias de sequenciamento aconteceu logo após a descoberta da estrutura do DNA (fig. 3). O primeiro método publicado foi baseado na adição de terminações de cadeia por dideoxynucleotídeos marcados por radioativos e fluoróforos, desenvolvido por Sanger (1975-1977), e que recebeu o nome de “Sequenciamento de primeira geração”. Nessa metodologia, as sequências nucleotídicas das fitas de DNA eram reveladas através de eletroforese em gel, que anos depois foi melhorado com a eletroforese capilar. Apesar

dos avanços, o método é trabalhoso e dispendioso (HU et al., 2021; SANGER; COULSON, 1976).

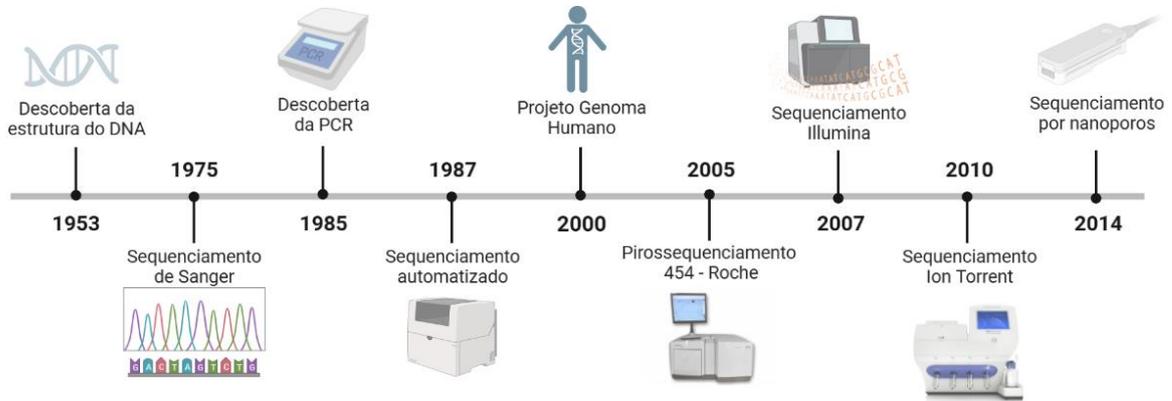


Figura 3: Cronologia do surgimento das tecnologias de sequenciamento após a descoberta da estrutura do DNA.

Fonte: Adaptado de BioRender.

O Projeto Genoma Humano (PGH) foi sem dúvidas a maior conquista científica, e um ponto de virada para a genética humana. O sequenciamento do genoma humano gerou aproximadamente 3 milhões de bases, representando todas as partes de cada cromossomo humano. A metodologia de sequenciamento descrita por Sanger foi essencial para a descoberta da sequência genômica humana, gerando custos de US\$2.7 bilhões para completar. Apesar dos avanços adicionais que permitiram o sequenciamento do genoma humano adicional por US\$ 10 milhões, a tecnologia tem alcançado seu prestígio por tempo e custo (GONZAGA-JAUREGUI; LUPSKI; GIBBS, 2012; NHGRI, 2021).

Com a crescente utilização do sequenciamento genômico em estudos genéticos e devido ao grande número de aplicações clínicas do NGS, o custo do sequenciamento diminuiu ao longo do tempo (fig. 2). Ainda assim, a metodologia de sequenciamento de Sanger continua sendo muito utilizada para aplicações em que não necessita de alta taxa de transferência. Como por exemplo para o sequenciamento de regiões de DNA específicas delimitadas por *primers* oligonucleotídeos, para verificar plasmídeos ou produtos de PCR (NHGRI, 2021; SLATKO et al., 2018).

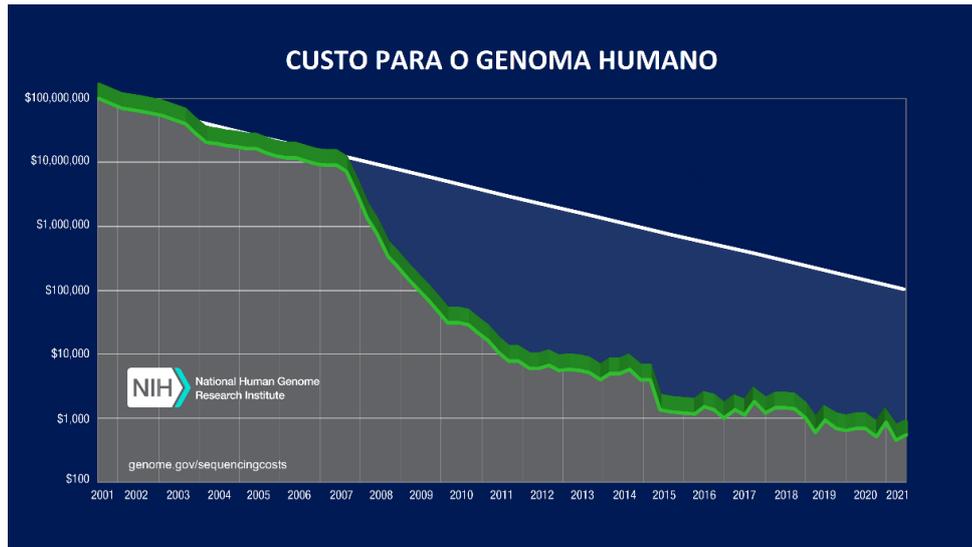


Figura 4: Comparação do custo (em dólar) do sequenciamento genômico por dados do genoma.

Fonte: Adaptado de NHGRI, 2021.

Embora bem descrito e necessário para o PGH, o sequenciamento de Sanger apresenta algumas desvantagens, principalmente o rendimento limitado, uma vez que é capaz de sequenciar apenas pequenos fragmentos de DNA, onde são separados e analisados por eletroforese em gel para determinar a sequência. Desta forma, novas abordagens de sequenciamento utilizando novas tecnologias foram desenvolvidas com base no sequenciamento de Sanger, transformando a investigação biomédica e resultando em um dramático aumento no sequenciamento (HU et al., 2021; METZKER, 2005).

2.6.1. TECNOLOGIAS DE SEQUENCIAMENTO DE NOVA GERAÇÃO

As tecnologias de sequenciamento de nova geração surgiram a partir de 2005 e evoluem constantemente. Também conhecidas como sequenciamento de alto rendimento, as plataformas de NGS são capazes de gerar bilhões de fragmentos de DNA que podem ser sequenciados simultânea e independentemente. Muitas são as aplicações do NGS na microbiologia clínica, principalmente na abordagem imparcial de detecção de patógenos (CARVALHO; SILVA, 2010; GU; MILLER; CHIU, 2019).

A primeira tecnologia de NGS comercializada foi a plataforma 454 (Roche), baseada no pirosequenciamento. A metodologia é fundamentada na detecção de pirofosfato após o acoplamento de um nucleotídeo na nova fita de DNA que está sendo sequenciada. Então, o pirofosfato é convertido em adenosina trifosfato (ATP), a qual leva à oxidação da luciferina, gerando um sinal de luz captado pelo instrumento. Esse sistema é capaz de sequenciar fragmentos de DNA de 300-800pb, e a biblioteca é feita através da ligação de adaptadores nas

extremidades 5' e 3' da fita complementar antes da realização do sequenciamento (RONAGHI et al., 1996).

Em comparação às demais tecnologias, a plataforma 454 é útil no sequenciamento de genomas pequenos, como de bactérias e de alguns eucariotos, permitindo a montagem do genoma de forma facilitada. A principal desvantagem dessa tecnologia é a falha no sequenciamento de homopolímeros, pois como a fluorescência aumenta de acordo com a ligação de nucleotídeos à fita, em sequências com mais de 3 repetições nucleotídicas a torna imprecisa. Também o alto custo de sequenciamento quando comparado à outras tecnologias (SLATKO et al., 2018).

A metodologia da plataforma Illumina/Solexa é baseada em uma técnica chamada de amplificação por ponte, onde fragmentos de DNA são marcados com adaptadores apropriados em suas extremidades e usados como molde para a reação de síntese de amplificação repetida. Os adaptadores permitem a fixação dos fragmentos no suporte de sequenciamento por hibridização a um adaptador fixado. Um dos principais problemas do sequenciamento Illumina é a perda da sincronia nas reações de síntese, onde pode haver interferência na sequência complementar precisa e redução dos números de ciclos de sequenciamento. Além disso, não é recomendada a sobrecarga da *flow cell*, por isso uma quantidade precisa da biblioteca de DNA deve ser aplicada na matriz (BRONNER et al., 2014; SLATKO et al., 2018).

Atualmente, a Illumina é a plataforma de sequenciamento dominante no mercado, e isso aconteceu nos últimos 5 anos onde houve uma ascensão de novas tecnologias e quedas de outras mais primitivas. Essa evolução na tecnologia permite a realização de sequenciamentos de larga escala do genoma, de forma que em pouco tempo o sequenciamento se tornará rotineiro, e irá permitir uma compreensão maior da diversidade genética dos organismos e na patogênese de algumas doenças (BRONNER et al., 2014).

Mais recentemente, a tecnologia Ion Torrent foi lançada baseada em uma reação de síntese de DNA, que quando há incorporação de um nucleotídeo complementar à fita base, a liberação de um íon hidrogênio (H^+) altera o pH da solução. Essas mudanças de pH são registradas por um sensor de íons. Quando não há incorporação de um nucleotídeo, não ocorre nenhum pico de tensão. Quando dois nucleotídeos iguais são incorporados sequencialmente, a tensão gerada é dobrada. Todos os picos são convertidos em uma sequência nucleotídica a partir de um chip semiconductor (ROTHBERG et al., 2011).

Antes do sequenciamento, o DNA é fragmentado em tamanhos de 200-1500pb e ligados a adaptadores. Esses fragmentos são ligados a *beads* e amplificados em um processo denominado PCR em emulsão. Isso permite que milhares de cópias dos fragmentos sejam sintetizados. O sequenciamento ocorre em milhões de poços existentes no chip semiconductor, de forma que cada *beads* entre em um poço individualmente. Nesse processo, não é necessário câmara ou fonte de luz, pois a incorporação dos nucleotídeos gera uma tensão, que posteriormente é convertida em informações de sequenciamento (SLATKO et al., 2018).

O dispositivo MinION foi lançado em 2014 pela Oxford Nanopore Technologies, com a capacidade de sequenciar genomas inteiros através de um sistema de sequenciamento de moléculas únicas de DNA e RNA, sem uma etapa prévia de PCR. Além da facilidade de transporte do equipamento, ele também permite o sequenciamento de moléculas longas de DNA com análise em tempo real. A tecnologia MinION é baseada em nanoporos presentes em uma *flowcell* individual onde é aplicada uma corrente e monitorada por um microchip. Cada nanoporo permite que apenas uma molécula de DNA ou RNA atravesse a membrana, e à medida que cada nucleotídeo passa pelo nanoporo uma mudança na corrente elétrica é detectada por um sensor. Essas mudanças elétricas são detectadas pelo *software* do computador e transformadas em sequências nucleotídicas (JAIN et al., 2016; KCHOUK et al., 2017).

O uso do MinION é vantajoso pois não há necessidade de expandir ou modificar instalações dos laboratórios, uma vez que o dispositivo é pequeno e portátil, a falta de eletricidade não afeta por completo o progresso do sequenciamento quando comparado a outras plataformas, a facilidade de execução das corridas de sequenciamento, sem necessidade de conhecimentos técnicos do equipamento, e o custo benefício é maior quando comparado com outras plataformas, com custo por amostra significativamente menor (WASSWA et al., 2022).

2.7.O USO DO SEQUENCIAMENTO DE NOVA GERAÇÃO NO DIAGNÓSTICO DE MENINGITE

O uso do mNGS como uma abordagem agnóstica tem mudado a forma de diagnóstico e exclusão de infecções neurológicas em pacientes com meningite e encefalite. Muitos estudos mostram que a etiologia das infecções neurológicas não é obtida em aproximadamente 50% dos casos, pois vários patógenos podem causar essa infecção e geralmente não são identificados, mesmo com o uso de muitos testes diagnósticos. O mNGS tem se mostrado útil na detecção desses patógenos, que também são confirmados, muitas das vezes, por testes convencionais. O LCR é o principal fluido para análise, pois sua localização e fluxo no SNC permitem

diagnosticar infecções em áreas restritas, como os ventrículos laterais, onde não é possível acessar com biópsias (GU; MILLER; CHIU, 2019; RAMACHANDRAN; WILSON, 2020).

Um estudo recente realizado na China avaliou o valor clínico do uso do NGS metagenômico na detecção de patógenos no LCR. Um total de 66 casos foram incluídos no estudo, e em 62,12% (41/66) destes foi detectado um agente etiológico, distribuídos em: 18 com infecção viral, 13 com infecção bacteriana, 3 casos de *Mycobacterium tuberculosis*, 5 com fungos e 2 com *Rickettsia*. Das 66 amostras analisadas, 37,88% (25/66) foram consideradas verdadeiramente positivas, ou seja, foram confirmadas também por testes laboratoriais convencionais (GU et al., 2022).

Outro estudo americano do tipo multicêntrico prospectivo avaliou a utilidade clínica do NGS metagenômico para o diagnóstico de encefalite e meningite. Foram testadas 204 amostras de LCR de pacientes com meningite idiopática, encefalite ou mielite, e destas a etiologia foi identificada em 50,9% dos pacientes, sendo que 27,9% eram de origem infecciosa. Dessa forma, o NGS metagenômico se mostra um potencial método de diagnóstico de infecções neuroinvasivas, para identificar os patógenos emergentes e que não são recuperados em metodologias convencionais disponíveis nos laboratórios clínicos (WILSON et al., 2019).

As dificuldades em avaliar casos de meningite e encefalite tem sido discutida em muitos estudos. Uma delas é a raridade de patógenos neuroinvasores, uma vez que muitos microrganismos podem causar essa invasão e os testes diagnósticos muitas vezes não são suficientes para dar um resultado preciso. Outro é a suscetibilidade de infecções invasivas por microrganismos incomuns, sobretudo em pacientes imunocomprometidos, que não fazem parte do diagnóstico padrão da equipe da neurologia. E por fim, a emergência e reemergência de patógenos como o vírus Ebola, Sarampo, Caxumba, entre outros (NATH, 2015; RAMACHANDRAN; WILSON, 2020).

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

Identificar a diversidade microbiana utilizando metagenômica em amostras de líquido cefalorraquidiano de pacientes com suspeita de neuroinfecção.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

I. Avaliar a diversidade microbiana a partir de amostras de líquido cefalorraquidiano utilizando o sequenciamento de nova geração (NGS);

II. Relacionar filogeneticamente os patógenos encontrados entre si e com outros genomas obtidos a partir de bancos de dados;

III. Correlacionar os agentes microbianos identificados com as características clínicas dos pacientes.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. DESENHO DO ESTUDO

Trata-se de um estudo observacional, descritivo e retrospectivo, onde foram selecionadas amostras de LCR no período de janeiro de 2020 a novembro de 2022. Para o estudo, as amostras foram divididas em: I) 4 amostras de LCR de pacientes com meningite bacteriana confirmada pelos testes laboratoriais e agente etiológico identificado por coloração de Gram, teste de aglutinação em látex ou cultura; II) 5 amostras de LCR de pacientes com encefalite herpética que tiveram o agente etiológico confirmado por métodos moleculares; III) 4 amostras de LCR de pacientes com sinais e sintomas clínicos sugestivo de meningite, com alteração liquórica, porém sem identificação do agente etiológico pelos métodos laboratoriais; IV) 4 amostras de LCR de pacientes com sinais e sintomas sugestivo de encefalite ou meningite, com alteração liquórica, e que não tiveram o agente etiológico identificado pelo diagnóstico diferencial.

As amostras de LCR foram coletadas mediante avaliação e indicação clínica médica. Os dados clínicos e sociodemográficos foram obtidos através de prontuário médico eletrônico (*iDoctor*), bem como as informações dos parâmetros liquóricos como dosagem de glicose, proteínas e lactato, e contagem global e diferencial de células brancas (Tabela 1-4). Foram selecionadas as amostras de pacientes imunodeprimidos e imunocompetentes, de ambos os sexos, de todas as idades, referenciadas ao laboratório da Gerência de Bacteriologia da Fundação de Medicina Tropical Doutor Heitor Vieira Dourado (GERBAC/FMT-HVD).

4.2. CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E EXCLUSÃO

Os critérios de elegibilidade foram: amostras de LCR referenciadas a GERBAC/FMT-HVD no período do estudo, que apresentaram alterações celulares e bioquímicas, e foram coletadas por punção lombar, mediante suspeita de infecção do SNC. Foram excluídas do estudo aquelas amostras que não tiveram volume suficiente para o teste (<200 μ L).

Os casos foram definidos de acordo com os critérios do Ministério da Saúde (BRASIL, 2017). Os casos confirmados foram considerados quando: I) o paciente apresentou um ou mais sinais e sintomas clínicos de infecção do SNC, como: febre, cefaleia, rigidez de nuca, vômito, convulsão, fraqueza, fadiga, rebaixamento do nível de consciência, entre outros; II) contagem celular global do LCR com mais de 5 células/mm³; III) alteração nos parâmetros bioquímicos com confirmação do agente etiológico, seja por coloração de Gram, cultura, látex ou método molecular.

Tabela 1: Características sociodemográficas, clínicas e laboratoriais dos pacientes com meningite bacteriana confirmada laboratorialmente por testes convencionais e moleculares.

| CÓD | SEXO | IDADE | SINTOMAS/ DIAGNÓSTICOS | PERFIL DO LCR | | | | DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL | | | | |
|------|------|---------|--|--------------------|----------------------|--------------------|---------------------------------------|-------------------------|------|--------------|----------------------------------|------------|
| | | | | GLICOSE (mg/dL) | PROTEÍNAS (mg/dL) | LACTATO (mg/dL) | CITOMETRIA (cels/mm ³) | PCR HERPES | GRAM | LÁTEX | CULTURA | PCR |
| AM-1 | F | 40 anos | Febre, cefaleia, rigidez de nuca | 166,0 | 203,5 | 105,1 | 4.197 | NR | DCGN | Nm. B (+) | NHCB | 16S (+) |
| AM-2 | M | 15 anos | Mastoidite, otite média, parestesia e plegia | 25,0 | 448,0 | 73,6 | 581 | NR | | Sp (+) | NHCB | 16S (+) |
| AM-3 | M | 4 meses | Febre, vômito, sonolência, rebaixamento do nível de consciência, crise convulsiva | 13,0 | 440,5 | 104,5 | 1.450 | NR | NEG | NR | <i>Proteus mirabilis</i> | 16S (+) |
| AM-4 | F | 65 anos | Convulsão, rebaixamento do nível da consciência | 0,0 | 1.212,0 | 109,7 | 506 | NR | BGN | NR | <i>Klebsiella pneumoniae</i> | 16S (+) |

BGN: bacilos Gram-negativos; DCGN: diplococos Gram-negativos; F: feminino; M: masculino; NEG: negativo; NHCB: não houve crescimento bacteriano; Nm. B: *Neisseria meningitidis* B; NR: não realizado; Sp: *Streptococcus pneumoniae*.

Tabela 2: Características sociodemográficas, clínicas e laboratoriais dos pacientes com encefalite herpética confirmada laboratorialmente por testes convencionais e moleculares.

| CÓD | SEXO | IDADE | SINTOMAS/ DIAGNÓSTICOS | PERFIL DO LCR | | | | DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL | | | |
|------|------|---------|--|--------------------|----------------------|--------------------|---------------------------------------|-------------------------|------|-------|---------|
| | | | | GLICOSE (mg/dL) | PROTEÍNAS (mg/dL) | LACTATO (mg/dL) | CITOMETRIA (cels/mm ³) | PCR HERPES | GRAM | LÁTEX | CULTURA |
| AM-5 | F | 44 anos | Cefaleia, paresia de MMII, rebaixamento do nível de consciência, confusão mental | 16,0 | 396,0 | 50,0 | 155 | EBV (+) | NEG | NR | NHCB |
| AM-6 | F | 68 anos | Rebaixamento do nível de consciência, afasia | NR | NR | NR | NR | HSV-1 (+) | NEG | NR | NHCB |
| AM-7 | M | 8 anos | Febre, vômito, cefaleia, rigidez de nuca | 63,0 | 59,0 | 35,4 | 906 | HSV-2 (+) | NEG | NR | NHCB |
| AM-8 | F | 77 anos | Lesões vesiculares em face, herpes zóster de face | 54,0 | 70,0 | 20,1 | 177 | VZV (+) | NEG | NR | NHCB |
| AM-9 | M | 17 anos | Febre, astenia, tontura, náuseas, cefaleia, paresia de MMII, fotofobia | 107,0 | 21,8 | 2,5 | 26 | CMV (+) | NEG | NR | NHCB |

F: feminino; M: masculino; MMII: membros inferiores; NEG: negativo; NHCB: não houve crescimento bacteriano; NR: não realizado.

Tabela 3: Características sociodemográficas, clínicas e laboratoriais dos pacientes que tiveram o líquido cefalorraquidiano sugestivo de infecção bacteriana, mas que não foram confirmados por testes convencionais e moleculares.

| CÓD | SEXO | IDADE | SINTOMAS | PERFIL DO LCR | | | | DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL | | | | |
|-------|------|---------|--|--------------------|----------------------|--------------------|---------------------------------------|-------------------------|------|-------|---------|---------|
| | | | | GLICOSE (mg/dL) | PROTEÍNAS (mg/dL) | LACTATO (mg/dL) | CITOMETRIA (cels/mm ³) | PCR HERPES | GRAM | LÁTEX | CULTURA | PCR |
| AM-10 | F | 20 anos | Febre, vômito, taquicardia, cefaleia, rebaixamento do nível de consciência, irritabilidade | 27,0 | 198,9 | 106,1 | 16 | NR | BGN | NR | NHCB | 16S (+) |
| AM-11 | M | 12 anos | Não informado | 0,0 | 2.856,0 | 3.491,0 | 1.408 | NR | NEG | NR | NHCB | 16S (+) |
| AM-12 | M | 8 meses | Febre, vômitos, irritabilidade, rigidez de nuca | 39,0 | 93,0 | 50,9 | 2.133 | NEG | NEG | NR | NHCB | 16S (+) |
| AM-13 | M | 3 meses | Febre, diarreia, vômito | 5,0 | 489,0 | 72 | 181 | NEG | DCGP | NEG | NHCB | 16S (+) |

F: feminino; M: masculino; NEG: negativo; NHCB: não houve crescimento bacteriano; NR: não realizado.

Tabela 4: Características sociodemográficas, clínicas e laboratoriais dos pacientes que tiveram o líquido cefalorraquidiano sugestivo de infecção viral, mas que não foram confirmados por testes convencionais e moleculares.

| CÓD | SEXO | IDADE | SINTOMAS | PERFIL DO LCR | | | | DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL | | | |
|-------|------|---------|---|--------------------|----------------------|--------------------|---------------------------------------|-------------------------|------|-------|---------|
| | | | | GLICOSE (mg/dL) | PROTEÍNAS (mg/dL) | LACTATO (mg/dL) | CITOMETRIA (cels/mm ³) | PCR HERPES | GRAM | LÁTEX | CULTURA |
| AM-14 | M | 5 meses | Não informado | 74,0 | 1898,0 | 169,0 | 42 | NEG | NEG | NR | NHCB |
| AM-15 | F | 5 meses | Diarreia, vômito, crise convulsiva | 61,0 | 159,0 | 11,9 | 5 | NEG | NEG | NR | NHCB |
| AM-16 | F | 49 anos | Cefaleia, rebaixamento do nível de consciência, febre | 59,0 | 201,0 | 40,1 | 28 | NEG | NEG | NR | NHCB |
| AM-17 | M | 5 anos | Não informado | 80,0 | 247,3 | 16,1 | 0 | NEG | NEG | NR | NHCB |

F: feminino; M: masculino; NEG: negativo; NHCB: não houve crescimento bacteriano; NR: não realizado.

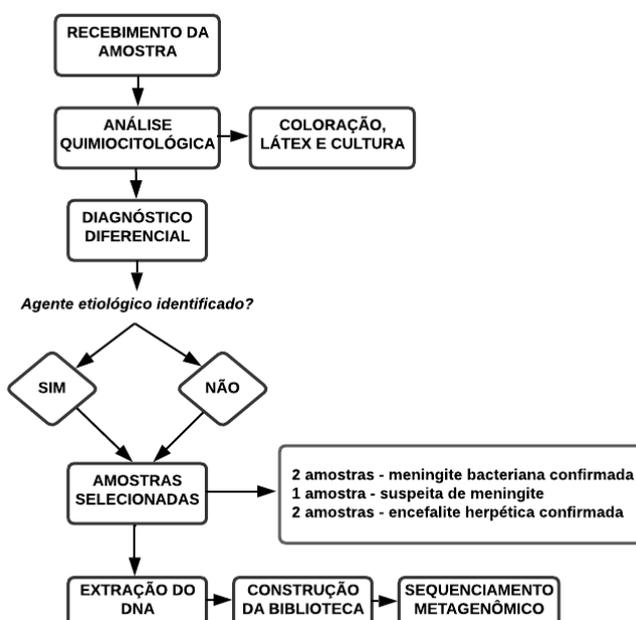
O caso suspeito foi definido quando: I) contagem celular global do LCR era superior a 5 células/mm³; II) na presença de um ou mais sinais e sintomas clínicos de infecção do sistema nervoso; III) e alteração nos parâmetros bioquímicos, porém sem confirmação do agente etiológico pelos métodos laboratoriais convencionais e moleculares.

4.3. ASPECTOS ÉTICOS

Este estudo faz parte de um projeto maior denominado “Monitoramento dos casos suspeitos de infecção viral no sistema nervoso em uma região endêmica para arbovírus durante a pandemia de COVID-19”, submetido e aprovado no Comitê de Ética em Pesquisa da FMT-HVD (CEP/FMT-HVD), através do parecer nº 5.453.362. É um dos objetivos específicos com a finalidade de analisar as amostras pela metodologia de sequenciamento de nova geração.

4.4. PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS DE LÍQUIDO CEFALORRAQUIDIANO

O Laboratório de Bacteriologia da GERBAC/FMT-HVD é referência na análise do LCR, recebendo amostras de LCR da demanda espontânea da própria instituição, e de outros hospitais e prontos socorros da cidade de Manaus. As amostras recebidas são analisadas e armazenadas caso necessitem de reanálise. Para a realização do painel viral, uma alíquota de no mínimo 200µL do LCR é estocada a -80°C para posterior análise (Fluxograma 1).



Fluxograma 1: Fluxo de trabalho para análise e seleção das amostras de líquido cefalorraquidiano incluídas no estudo, no período de janeiro de 2020 a novembro de 2022.

4.4.1. ANÁLISE BACTERIOLÓGICA

A análise do LCR inclui uma análise física, onde são observadas as características do LCR, como volume, cor, aspecto e presença ou ausência de coágulos. A análise bioquímica permite a dosagem dos níveis de glicose (glicorraquia), proteínas (proteinorraquia) e lactato (lactatorraquia). Em seguida, a análise citológica é realizada para contagem global de leucócitos na câmara de Fuchs-Rosenthal e diferenciação celular a partir de coloração hematológica. Por fim, a análise microbiológica, onde são realizadas lâminas contendo o sedimento do LCR, as quais são coradas pelo método de Gram para a realização da bacterioscopia, Coloração de Ziehl-Neelsen para pesquisa de BAAR e tinta da China (Nankin) para pesquisa de *Cryptococcus sp.*

4.4.2. DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL

Para a realização do diagnóstico diferencial, foi realizado o painel viral e as amostras estocadas foram submetidas a extração do DNA/RNA, através do kit comercial ReliaPrep™ TNA Viral Purification (Promega), seguindo as recomendações do fabricante. O DNA/RNA eluído foi utilizado para a realização de PCR em tempo real qualitativa (qPCR). Os agentes virais testados foram da família Herpesviridae, que incluiu Herpes Simplex tipo 1 e 2 (HSV-1 e 2), Varicela zoster vírus (VZV), Epstein-baar vírus (EBV) e citomegalovírus (CMV). Os oligonucleotídeos e condições de ciclagem utilizadas para a qPCR foram descritos previamente por outros autores (Tabela 5).

Tabela 5: Relação de *primers* (oligonucleotídeos) utilizados na qPCR para o diagnóstico diferencial das amostras de LCR no período de janeiro de 2020 a novembro de 2022.

| ALVO | OLIGONUCLEOTÍDEOS – 5'-3' | REFERÊNCIA |
|--------------------------------|---|-----------------------|
| Herpes simplex tipo 1 (HSV-1) | <i>Primer F</i> – CGGCCGTGTGACACTATCG <i>Primer R</i> – CTCGTAAAATGGCCCCTCC <i>Probe</i> – JOE- CCATACCGACCACACCGACGAACC-Iowa B®FQ | WEIDMANN et al., 2018 |
| Herpes simplex tipo 2 (HSV-2) | <i>Primer F</i> – CGCTCTCGTAAATGCTTCCCT <i>Primer R</i> – TCTACCCACAACAGACCCACG <i>Probe</i> – JOE-CGCGGAGACATTCGAGTACCAGATCG-IB®FQ | WEIDMANN et al., 2018 |
| Vírus da Varicela zoster (VZV) | <i>Primer F</i> – CGGCATGGCCCGTCTAT <i>Primer R</i> – TCGCGTGCTGCGGC <i>Probe</i> – FAM-ATTCAGCAATGGAAACACACGACGCC-DABCYL | WEIDMANN et al., 2018 |

| | | |
|-----------------------------|---|----------------------|
| Epstein-Baar vírus (EBV) | <i>Primer F</i> – GGAACCTGGTCATCCTTTGC <i>Primer R</i> – ATGGACCGGTTAATCCGATCT <i>Probe</i> – FAM-AGCGAGCAGTACGAGTGCCTGCG-TAMRA | SIDDIQI et al., 2014 |
| Citomegalovírus (CMV) | <i>Primer F</i> – CTTAACCACTACAGCAAAGGTACGA <i>Primer R</i> – ATGATAGCGGCGTTAGGTGACA <i>Probe</i> – FAM-TGCCCGAAACGAATAGCGTTGCC-TAMRA | SIDDIQI et al., 2014 |

Primer F: forward; *Primer R*: reverse; *Probe*: sonda marcada com fluorescência.

4.4.3. PCR DO GENE 16S rDNA BACTERIANO

A PCR do gene 16S rDNA bacteriano foi realizada para triagem das amostras suspeitas e confirmadas para meningite bacteriana. Para a detecção, foi realizada PCR convencional com os primers e condições de ciclagem previamente descritos (Tabela 6). A visualização das bandas foi realizada em gel de agarose 0,8% e o resultado foi positivo quando observado fragmento de DNA com tamanho de 214pb.

Tabela 6: *Primers* (oligonucleotídeos) utilizados na PCR convencional para a detecção do gene 16S rDNA nas amostras de LCR no período de janeiro de 2020 a novembro de 2022.

| ALVO | OLIGONUCLEOTÍDEOS – 5'-3' | REFERÊNCIA |
|----------|--|--------------------|
| 16S rDNA | <i>Primer F</i> – GAGGAAGGIGIGGAIGACGT <i>Primer R</i> – AGICCCGIGAACGTATTCAC | CHENG et al., 2006 |

Primer F: forward; *Primer R*: reverse.

4.5. ANÁLISE POR SEQUENCIAMENTO

Para esta etapa, foi utilizada a plataforma *Illumina MiSeq System* que realiza sequenciamento por síntese, baseada na ligação de fragmentos de DNA em *beads* que posteriormente são submetidas à purificação para uso em plataformas de sequenciamento.

4.5.1. QUANTIFICAÇÃO DO DNA

O DNA foi quantificado por fluorometria pelo kit *Qubit™ dsDNA HS Assay* (Invitrogen™), o qual fornece quantificação precisa e seletiva para DNA dupla fita, proteínas e nucleotídeos livres. Primeiro, a solução de trabalho foi preparada em uma diluição de 1:200 de *Qubit™ dsDNA HS Buffer* e adicionado a um tubo de microcentrífuga de 1,5mL um volume final de 200µL, conforme informado no protocolo do fabricante. Para as soluções, 190µL do *buffer* foram misturados a 10µL dos padrões e deixados a temperatura ambiente por 2 minutos. Para as amostras, 1µL de cada amostra foi adicionado a 199µL de *buffer* e incubados a temperatura ambiente. Após a leitura dos padrões no equipamento, as amostras foram quantificadas em ng/µL.

4.5.2. CONSTRUÇÃO E ANÁLISE DA BIBLIOTECA

Para a construção da biblioteca, o kit *Illumina DNAPrep* (Illumina) foi utilizado (Apêndice I) com as cinco amostras de LCR selecionadas para o estudo. O fluxo do kit permite a construção de biblioteca genômica a partir da fragmentação do DNA usando *beads* ligadas a transposons, onde o DNA é fragmentado em uma reação enzimática e marcado com adaptadores. Um *input* de DNA de 100-500ng do produto da extração de ácido nucleico foi utilizado para esta etapa, não ultrapassando 30µL de DNA. Em casos de volume menor que 30µL, foi completado com *Nuclease-free water* (NFW). O processo de fragmentação do DNA acontece a 55°C por 5 minutos, e resfriamento a 10°C.

Após esse processo, uma primeira limpeza foi realizada para lavagem do DNA marcado com adaptador, antes da amplificação por PCR. Essa etapa foi realizada com *beads* magnéticas disponíveis no kit. Uma incubação de 15 minutos a 37°C e resfriamento a 10°C é necessária. A amplificação do fragmento de DNA acontece usando um programa de PCR limitado por ciclos baseados na concentração do *input* de DNA. Nessa etapa, foram adicionados os adaptadores *index 1* (i7) e *index 2* (i5) nas sequências requeridas que geraram os clusters de sequenciamento.

Uma nova limpeza foi realizada por *beads* para purificar as bibliotecas amplificadas. Após a purificação, a biblioteca foi normalizada a 4nM com hidróxido de sódio (NaOH) 0,2M e o *pool* de bibliotecas foi preparado a partir da combinação de 5µL de cada biblioteca. A quantificação da biblioteca foi realizada pelo método de fluorometria para DNA dupla fita (Tópico 4.5.1). A normalização da biblioteca garante a qualidade e maior chance de sequenciar vários fragmentos de DNA, gerando uma ótima quantidade de *reads* para posterior análise.

4.5.3. SEQUENCIAMENTO E ANÁLISE BIOINFORMÁTICA

O sequenciamento metagenômico foi realizado na plataforma *Illumina MiSeq System*, para gerar até 5 milhões de *reads* por amostra, em *flowcell* com capacidade para 25 milhões de *reads*. Os arquivos *fastq* gerados pelo equipamento foram baixados e validados para análise de qualidade de *reads* visualizadas através do *q score*, que verifica a perda sobre cada leitura. Para isso, foi utilizada a plataforma *Galaxy* (*Galaxy Version 0.73*) e a ferramenta *Fastqc* (Versão 0.11.9) que fornecerá a verificação do controle de qualidade dos dados brutos provenientes do sequenciamento.

Para melhorar a qualidade dos *reads*, o pré-processamento das *reads* pela ferramenta *Trimmomatic* (Versão 0.38) consistiu em: (i) remoção dos nucleotídeos no início e final das

reads quando o *q score* < 25; (ii) remoção de bases das *reads* quando *q score* < 20 a cada 4 nucleotídeos; (iii) remoção de *reads* com qualidade média de *q score* < 25. Uma nova verificação da qualidade foi realizada pela ferramenta *Fastqc* (Versão 0.11.9). A análise da qualidade foi ainda confirmada pelo DRAGEN *germlines*, disponível no *BaseSpace* da Illumina (<https://basespace.illumina.com>). Esse pipeline permite uma análise secundária de ponta a ponta de arquivos *fastq* para dados de NGS. O DRAGEN é capaz de mapear, grafar e referenciar multigenomas.

Para análise da diversidade microbiana, foi utilizado o DRAGEN *metagenomics pipeline*, disponível no *BaseSpace* da *Illumina* (<https://basespace.illumina.com>). Essa plataforma provê uma análise precisa e abrangente de dados de sequenciamento de alta profundidade, além de reconhecer as sequências referentes ao genoma humano, e limpá-las antes da análise. Os microrganismos listados foram analisados conjuntamente aos achados clínicos e laboratoriais dos pacientes, para compreender a diversidade microbiana do fluido e o possível agente causador da infecção.

A ferramenta KRAKEN2 foi utilizada para classificar as sequências do arquivo *fastq* comparando com um banco de dados de organismos. Através dessa análise foi possível distinguir os organismos de interesse daqueles considerados contaminações. O banco de dados é uma lista de *kmers* que mapeiam e realizam as classificações taxonômicas. O KRAKEN2 divide as sequências do arquivo *fastq* para comparar com o banco de dados, e assim encontrar a taxonomia mais provável para tal.

4.6. FINANCIAMENTO

Este projeto foi submetido e aprovado ao Edital nº 010/20221 – CT&I Áreas prioritárias da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas (FAPEAM) sob o título “Estudo da diversidade microbiana no líquido cefalorraquidiano por sequenciamento de nova geração (NGS) no Amazonas”, sob número de protocolo 54217.UNI855.4061.22082021. Esse projeto conta com recurso para custeamento de materiais de consumo, materiais permanentes e bolsa de apoio técnico.

5. RESULTADOS

5.1. DADOS SOCIODEMOGRÁFICOS E CLÍNICOS DOS PACIENTES

Um total de 17 amostras foram selecionadas, sendo 9 delas pertencentes a homens e 8 mulheres. A idade média dos pacientes foi de 24 anos, variando de 3 meses a 77 anos. Os dados clínicos de apenas 14 pacientes foram recuperados a partir de prontuário médico eletrônico, pois os outros 3 não tinham informações. Os principais sintomas apresentados foram febre em 57,1% (8/14) dos pacientes, seguido de rebaixamento do nível de consciência em 42,8% (6/14) e vômito com 35,7% (5/14).

5.2. PROCESSAMENTO DOS DADOS

Das 17 amostras testadas, em apenas 5 (29,4%) foi possível recuperar os dados para análise, devido à baixa qualidade das sequências mesmo com quantificação de DNA suficiente para a construção da biblioteca. O sequenciamento retornou um total de 15.696.300 *reads* com conteúdo GC de 39-41%, onde incluiu informações das cinco amostras de LCR. No geral, a análise de qualidade dos *reads* foi de 86,10% para sequências de boa qualidade com *q score* ≥ 30 . Cada arquivo *fastq* das amostras incluídas na biblioteca também passou pela análise de qualidade na plataforma *Galaxy*, pela ferramenta *Fastqc*, onde tiveram *q score* ≥ 32 após processamento (Fig. 5).

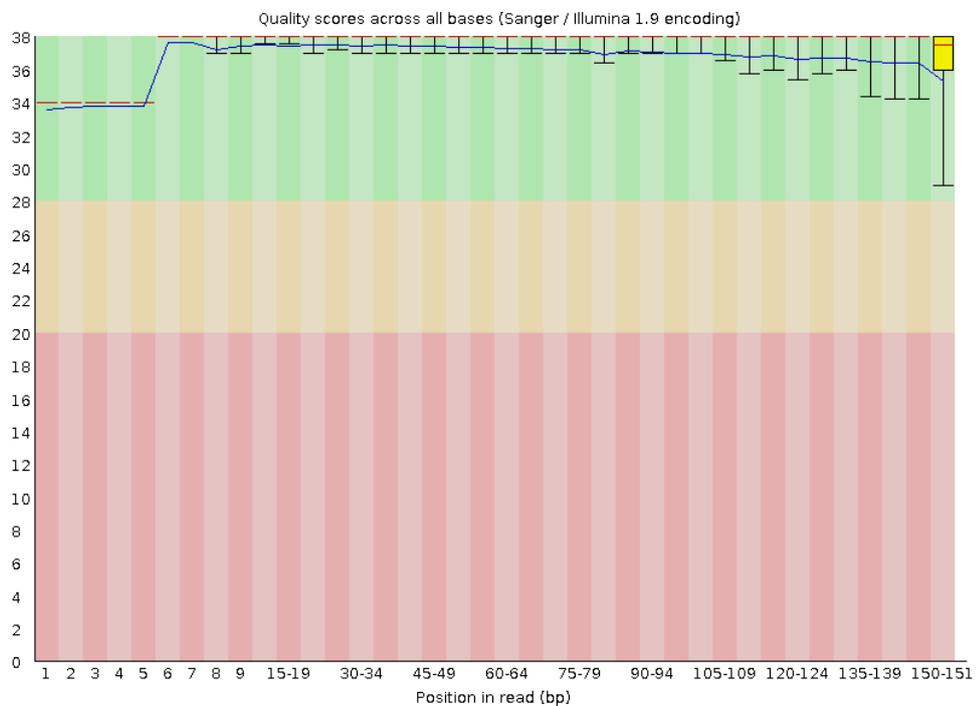


Figura 5: Visão geral dos valores de qualidade em todas as bases após processamento do arquivo pela ferramenta *Fastqc*.

5.3. MAPEAMENTO DAS AMOSTRAS

Os arquivos *fastq* foram submetidos ao pipeline de metagenômica DRAGEN e comparados com sequências de microrganismos depositadas em banco de dados para a análise taxonômica. Em média, um total de 1.399.082 de *reads* alinhadas (*hits*) eram referentes ao genoma do hospedeiro, e em cerca de 15,3% dos fragmentos foi possível classificar 167 espécies de microrganismos encontrados nas amostras (Tabela 7). Todas os arquivos das amostras foram analisados separadamente.

Tabela 7: Análise das *reads* das amostras incluídas na biblioteca e mapeamento das espécies identificadas.

| Amostra | Total de <i>reads</i> | Após retirada do genoma do hospedeiro (<i>reads</i>) | Fragmentos classificados | Fragmentos classificados (%) | Fragmentos não classificados | Total de espécies identificadas |
|---------------|-----------------------|--|--------------------------|------------------------------|------------------------------|---------------------------------|
| Caso 1 | 2.331.458 | 59.039 | 7.970 | 13,5 | 51.069 | 65 |
| Caso 2 | 1.390.647 | 16.232 | 3.345 | 20,6 | 12.887 | 41 |
| Caso 3 | 241.822 | 3.438 | 517 | 15,04 | 2.921 | 9 |
| Caso 4 | 1.799.063 | 12.518 | 1.791 | 14,31 | 10.727 | 31 |
| Caso 5 | 1.342.404 | 18.756 | 2.510 | 13,38 | 16.246 | 21 |

5.4. ANÁLISE DOS DADOS METAGENÔMICOS E CARACTERIZAÇÃO TAXONÔMICA

Das quatro amostras confirmadas laboratorialmente para bactérias e vírus, em 75% (3/4) o resultado da análise metagenômica corroborou com o achado microbiológico convencional e diferencial das amostras. No geral, a análise metagenômica mostrou a predominância do filo Proteobacteria (9,9%), Firmicutes (2,59%) e Actinobacteria (0,29%) (Fig. 6). Não houve diferença entre as amostras confirmadas ou suspeita para infecção viral ou bacteriana.

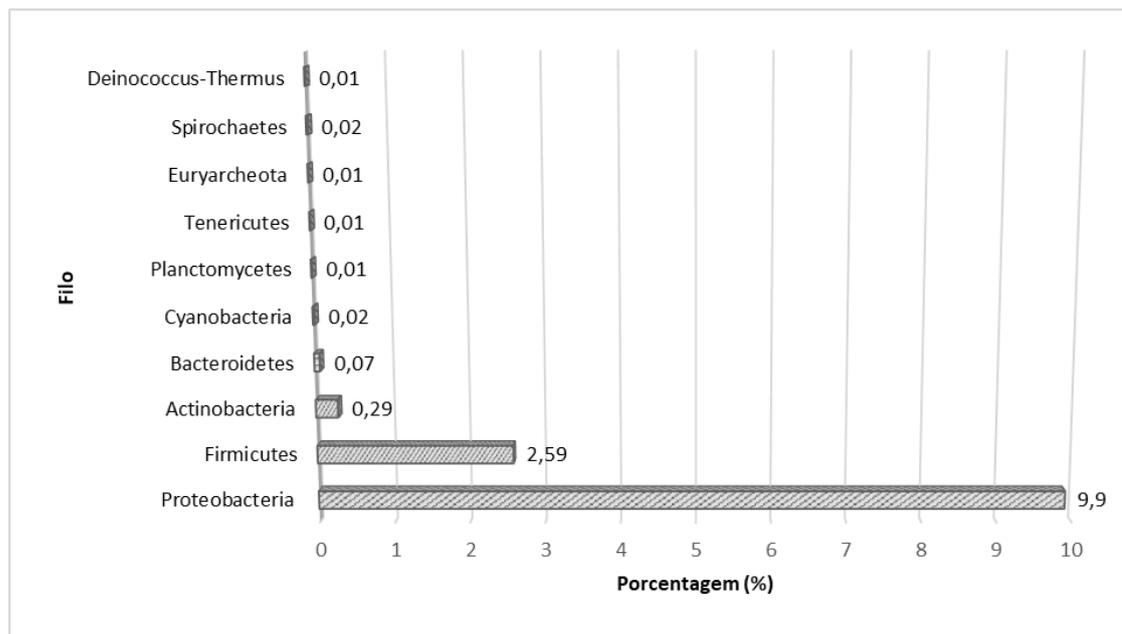


Figura 6: Distribuição dos filos bacterianos alinhados para as sequências das amostras de LCR analisadas no estudo.

5.4.1. CASO 1

Paciente do sexo feminino, 40 anos, deu entrada na unidade hospitalar devido a um quadro clínico de febre, cefaleia, dor na movimentação da região cervical, rigidez de nuca e presença de equimoses no corpo. Previamente ao quadro clínico, ela encontrava-se acompanhando seu filho, o qual estava internado na unidade de terapia intensiva (UTI) infantil por meningite bacteriana. Foi iniciado tratamento com ceftriaxona, 1g a cada 12 horas, por 7 dias, associado à dexametasona 4mg, uma vez por dia. A paciente evoluiu com melhora clínica e, após um período de internação de 8 dias, recebeu alta hospitalar.

Na análise das *reads* geradas para essa amostra, em 87% não houve alinhamento (*hits*) com nenhuma espécie (Fig. 7). Apenas 1% foi alinhado para genoma bacteriano, dos quais a maior porcentagem era referente ao filo Proteobacteria (0,9%). A classe mais frequente foi Betaproteobacteria, e os principais táxons alinhados foram dos gêneros *Staphylococcus* (0,69%), seguido de *Bacillus* (0,12%) e *Neisseria* (0,05%), das quais *S. cohnii* (0,67%), *B. litoralis* (0,02%) e *N. meningitidis* (0,03%) foram as espécies mais identificadas, respectivamente (Figura 8A e 8B). O achado corroborou com a microscopia e teste de aglutinação realizada na amostra que evidenciou a presença desta bactéria na amostra de LCR.

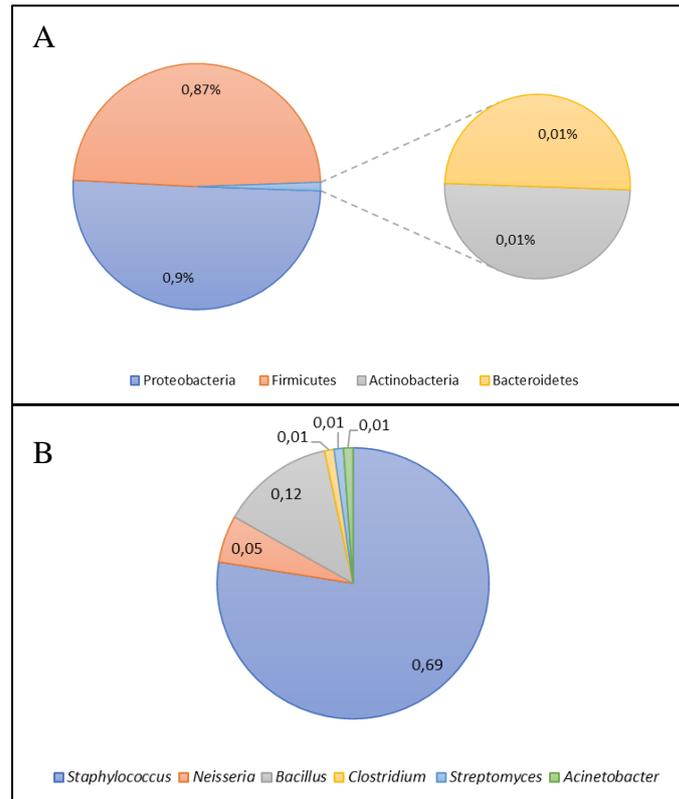


Figura 8: Distribuição da microbiota predominante a nível de filo (A) e gênero (B) na amostra de LCR do Caso 1 pelo KRAKEN2.

5.4.2. CASO 2

Paciente do sexo masculino, com 4 meses de idade, deu entrada na unidade hospitalar de São Gabriel da Cachoeira devido a um quadro clínico de choro frequente há 7 dias, associado à distensão abdominal e sonolência. Devido à falta de melhora clínica, foi transferido para a cidade de Manaus. No dia seguinte à internação, apresentou febre e vômitos, mantendo boa sucção durante a amamentação. O paciente apresentou piora clínica progressiva e foi transferido para a UTI em estado grave, onde foi realizada intubação orotraqueal e foi colocado em ventilação mecânica. O paciente evoluiu com sepse grave associada a choque séptico refratário, resultando em óbito.

Através da cultura do LCR no laboratório obteve-se crescimento da bactéria *P. mirabilis*, não sendo confirmada pela análise metagenômica. A análise das reads retornou 9% de sequências bacterianas (Fig. 9), das quais 8,64% pertenciam ao filo Proteobacteria, principalmente da classe Gammaproteobacteria (Fig. 10A). O gênero mais identificado foi *Salmonella* (7,59%), com sequências alinhadas para a espécie *Salmonella enterica* (4,25%), subespécie *S. enterica subsp. enterica serovar Javiana* (0,18%) (Fig. 10B). Além das bactérias, nessa amostra também foi identificado 0,01% de genoma viral, referente ao gênero *Alphatorquevírus*, espécie *Torque teno vírus 24* (0,01%).

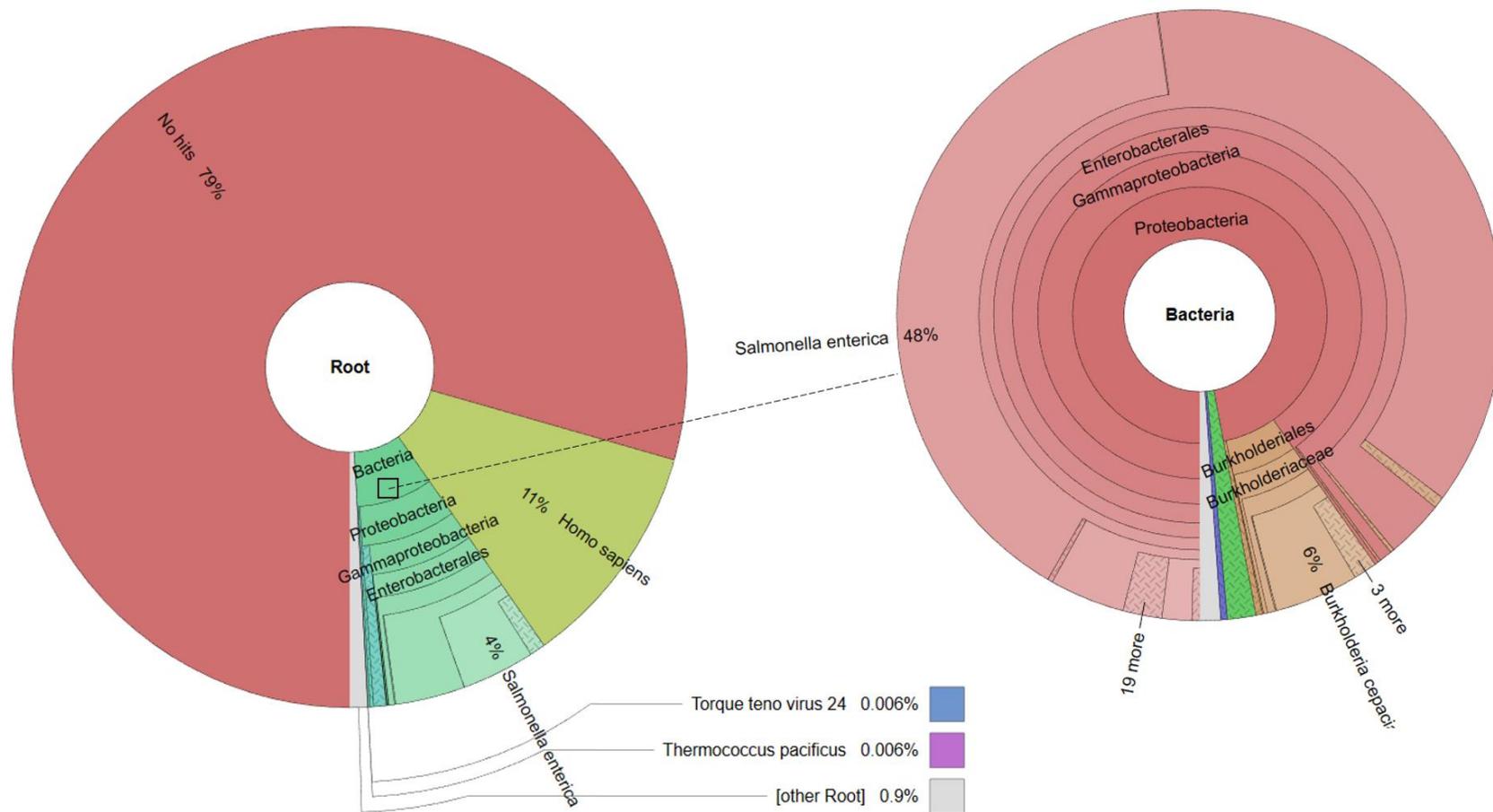


Figura 9: Visualização metagenômica interativa pelo software KRONA da amostra confirmada laboratorialmente e não confirmada pelo sequenciamento para *P. mirabilis*.

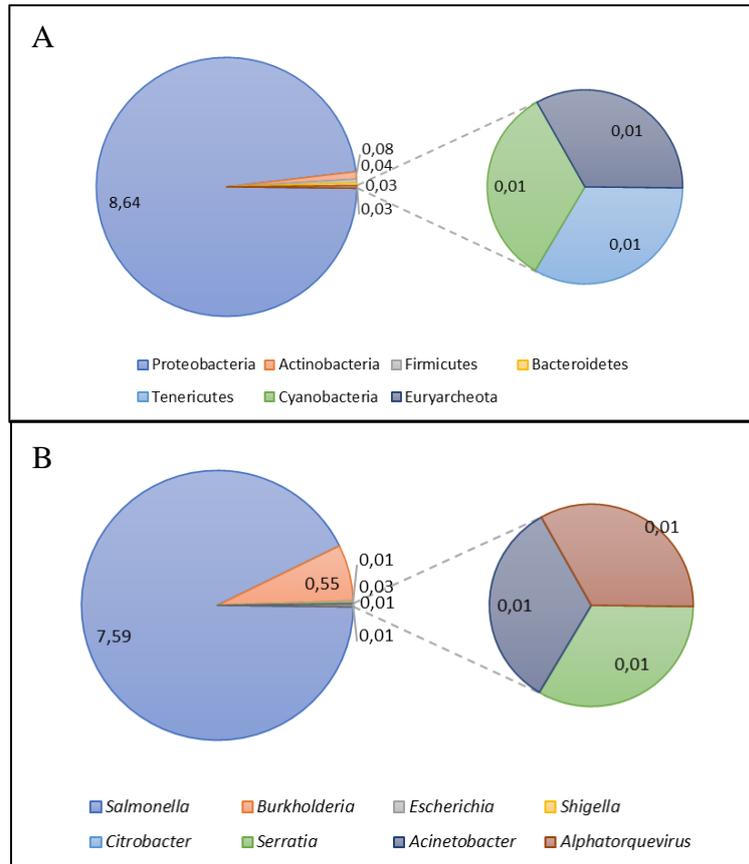


Figura 10: Distribuição da microbiota predominante a nível de filo (A) e gênero (B) na amostra de LCR do Caso 2 pelo KRAKEN2.

5.4.3. CASO 3

Paciente do sexo feminino, 68 anos, com quadro clínico de olhar vago, rebaixamento do nível de consciência, afasia, desorientação e síncope, deu entrada no Hospital e Pronto Socorro 28 de agosto, onde esteve internada durante 5 dias. Durante sua internação, manteve quadro de desorientação associado à febre e episódios de agitação psicomotora. Foi transferida para o Hospital Universitário Getúlio Vargas para investigação diagnóstica. Na sua chegada, permanecia afásica e não obedecia a comandos. Foi realizada punção lombar para análise de LCR, com resultado positivo para HSV-1, recebendo diagnóstico de encefalite herpética. Foi iniciado tratamento com aciclovir endovenoso, 10mg/kg a cada 8 horas, durante 34 dias. A paciente evoluiu com melhora clínica e, após um período de internação de 35 dias, recebeu alta.

Na análise das sequências, 0,35% das *reads* foram alinhadas ao genoma do gênero *Simplex vírus* (Fig. 11), dos quais 0,32% eram referentes ao HSV-1 (Fig. 12A e 12B). Além disso, o filo Proteobacteria foi o mais predominante (0,15%) entre as bactérias, principalmente para a classe Gammaproteobacteria, gênero *Acinetobacter* (0,12%), espécie *Acinetobacter calcoaceticus/baumannii complex* (0,03%), e *Cutibacterium* (0,06%).

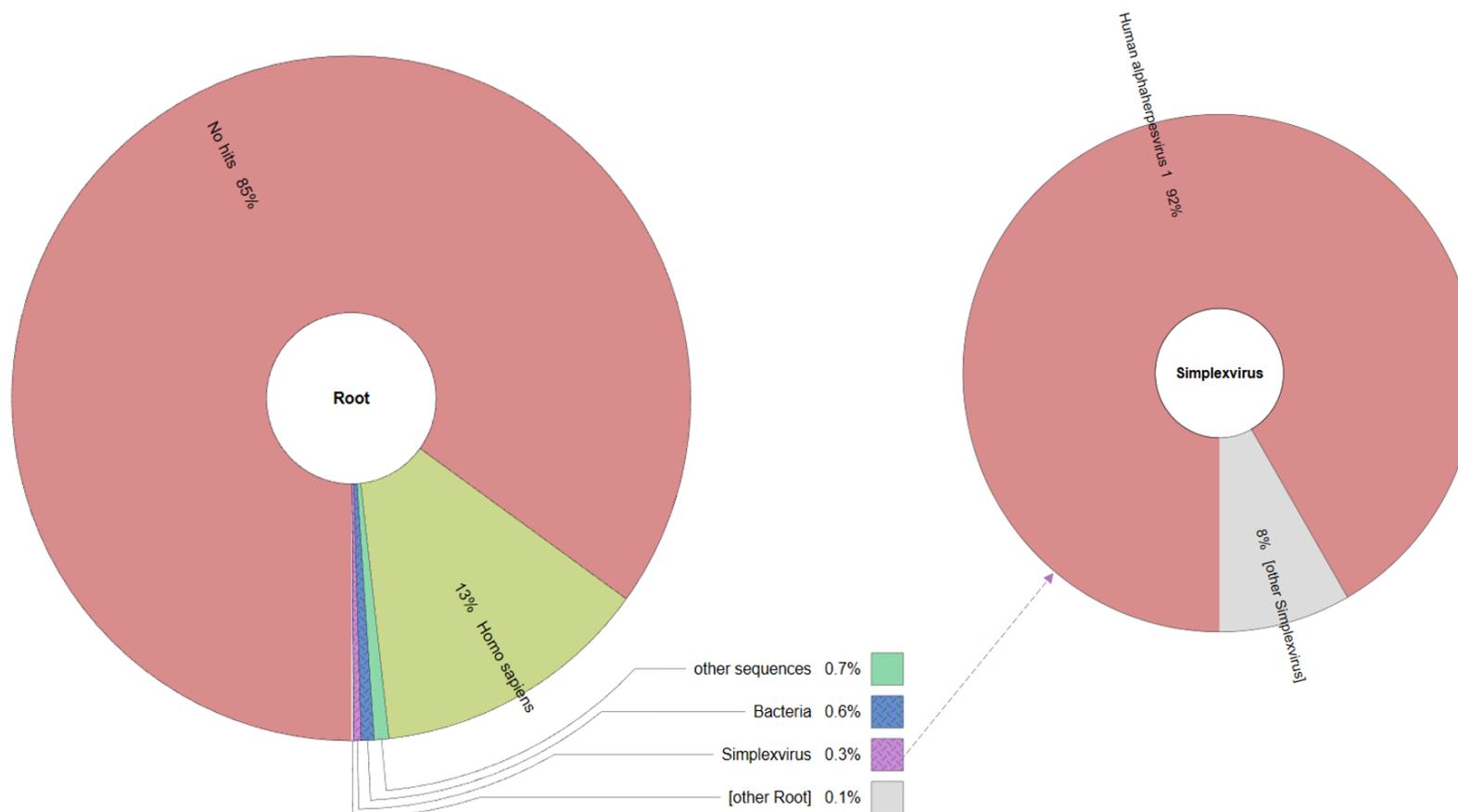


Figura 11: Visualização metagenômica interativa pelo software KRONA da amostra confirmada laboratorialmente e pelo sequenciamento para HSV-1.

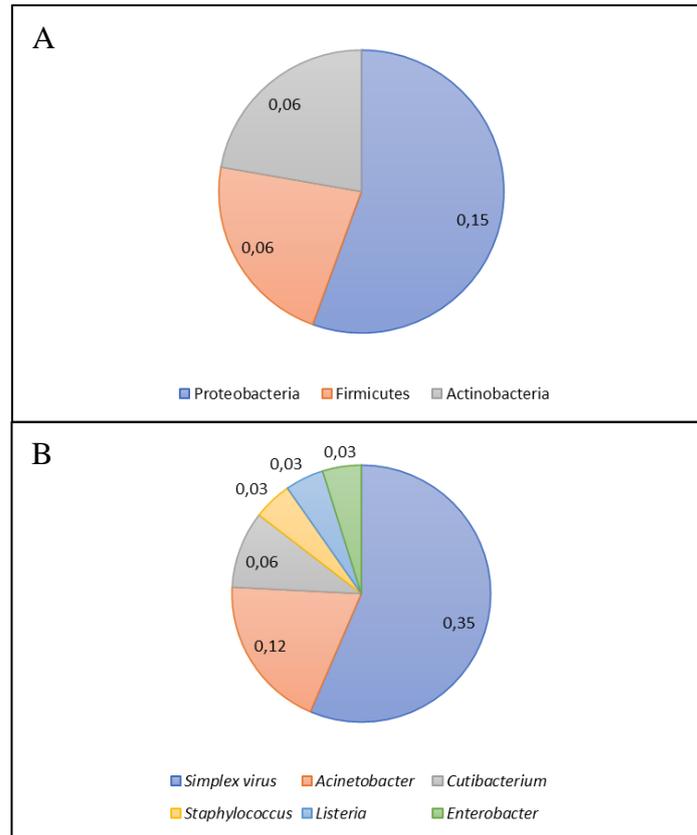


Figura 12: Distribuição da microbiota predominante a nível de filo (A) e gênero (B) na amostra de LCR do Caso 3 pelo KRAKEN2.

5.4.4. CASO 4

Paciente do sexo feminino, 77 anos, com antecedente de hipertensão arterial sistêmica, deu entrada no hospital devido à surgimento de lesões vesiculares em face associadas a dor do tipo ardência, recebendo diagnóstico de herpes zoster facial. Na análise de sequências, foi observada a predominância do gênero *Varicellovirus* (0,12%), correspondente à espécie VZV que foi alinhada em 0,12% das sequências obtidas (Fig. 13), corroborando com o diagnóstico realizado por qPCR.

Houve também alinhamento para o genoma bacteriano, sobretudo do filo Firmicutes (0,18%) e Proteobacteria (0,1%) (Fig. 14A). Dentre os gêneros mais frequentes, *Staphylococcus* (0,08%) e *Listeria* (0,04) foram os mais identificados para os filios Firmicutes e Proteobacteria, respectivamente (Fig. 14B). Os *S. aureus* (0,07%) e *S. epidermidis* (0,01%) foram as espécies mais frequentes do gênero *Staphylococcus*, e *L. monocytogenes* (0,04%) para o gênero *Listeria*.

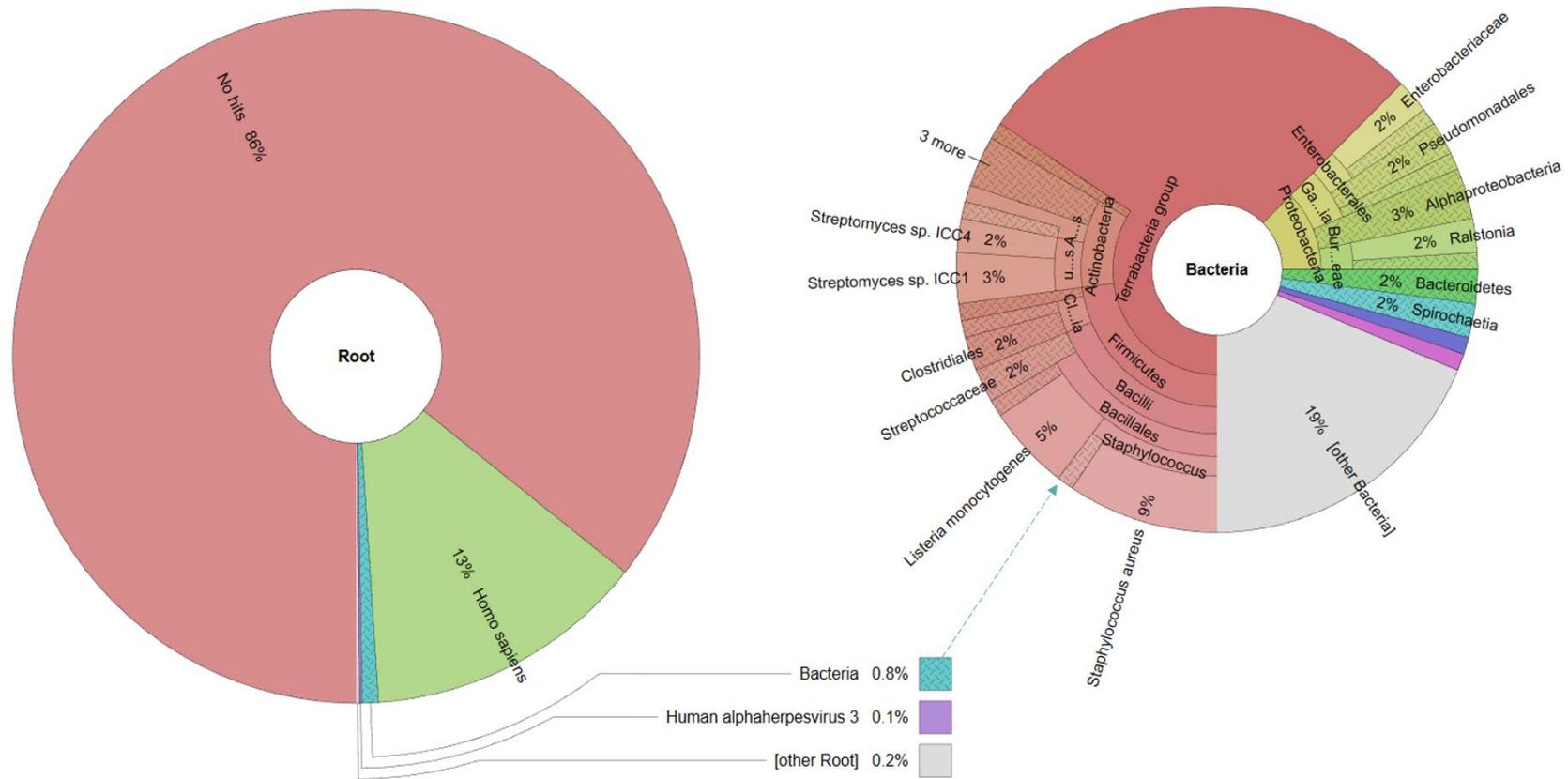


Figura 13: Visualização metagenômica interativa pelo software KRONA da amostra confirmada laboratorialmente e pelo sequenciamento para VZV.

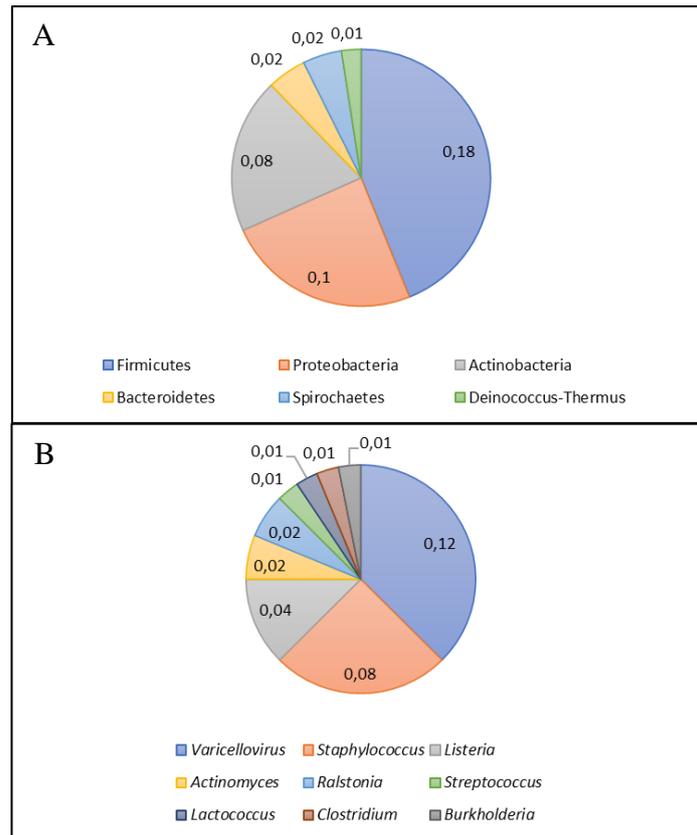


Figura 14: Distribuição da microbiota predominante a nível de filo (A) e gênero (B) na amostra de LCR do Caso 4 pelo KRAKEN2.

5.4.5. CASO 5

Paciente do sexo feminino, 20 anos, deu entrada no pronto socorro com quadro de agitação psicomotora e desorientação. Esta relatou quadro de otalgia com duas semanas de evolução associada a febre e cefaleia há uma semana. Fez uso de amoxicilina com ácido clavulânico (875mg/125mg) durante 7 dias, porém evoluiu sem melhora com vômito, excitação, irritabilidade, taquicardia e rebaixamento do nível de consciência. No pronto socorro, recebeu diagnóstico de mastoidite à direita, sendo necessária internação onde foi realizado tratamento com meropenem 500mg a cada 8 horas. A cultura do LCR foi negativa, a paciente evoluiu com melhora clínica e, após 14 dias de internação, recebeu alta hospitalar.

Nessa amostra, a análise das sequências identificou 2% de genoma bacteriano, principalmente do grupo Terrabacteria (Fig. 15). O filo Firmicutes (1,44%) foi predominante, seguido de Proteobacteria (0,11%) (Fig. 16A). Dentre o filo Firmicutes, os gêneros *Staphylococcus* (1,1%) e *Streptococcus* (0,33%) foram os mais alinhados. *Burkholderia* (0,07%) representou o principal gênero do filo Proteobacteria (Fig. 16B), dos quais as espécies *S. haemolyticus* (0,78%), *S. pneumoniae* (0,23%) e complexo *B. cepacia* (0,07%) foram os mais frequentes, respectivamente.

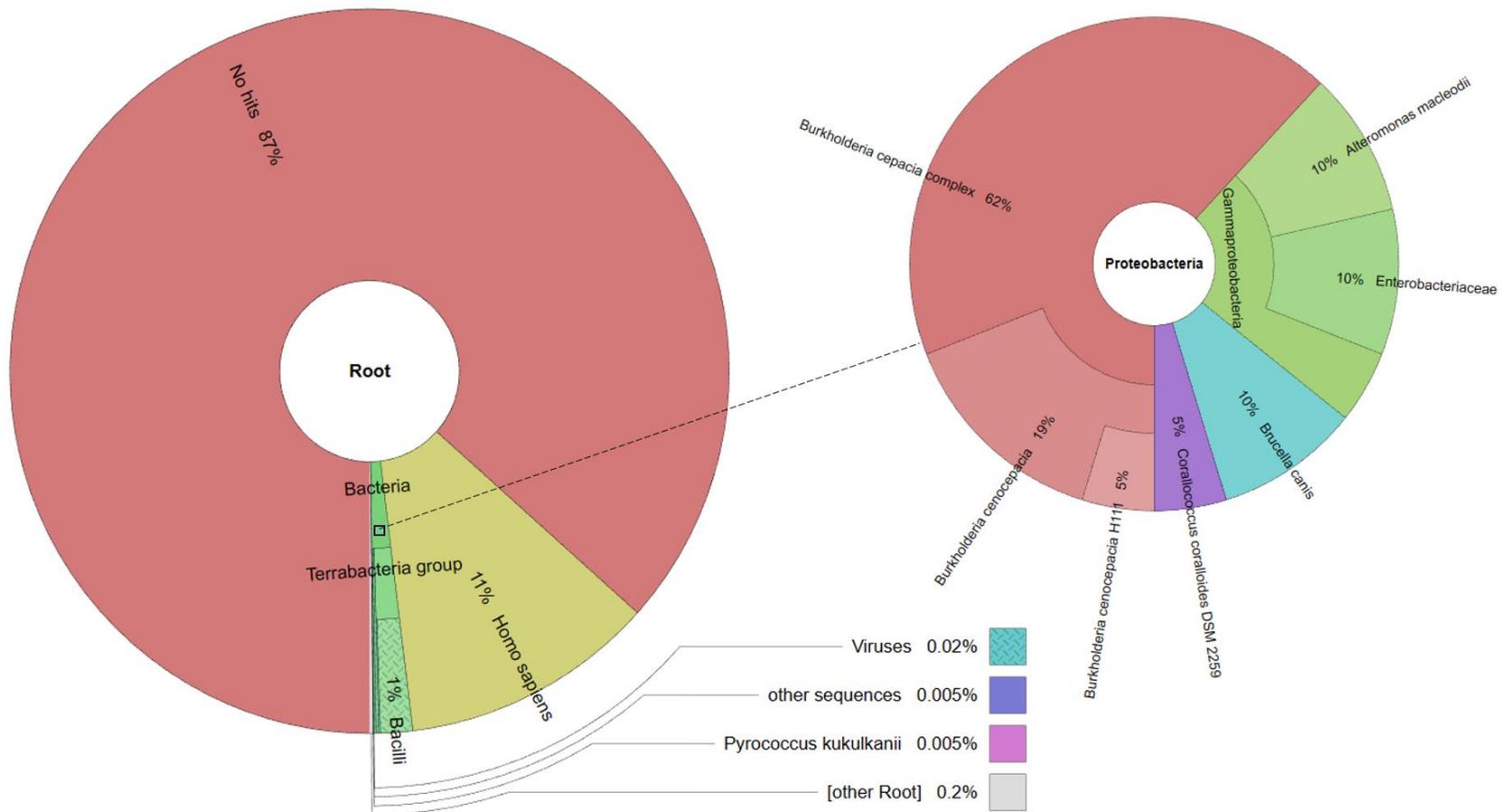


Figura 15: Visualização metagenômica interativa pelo software KRONA da amostra suspeita de infecção bacteriana.

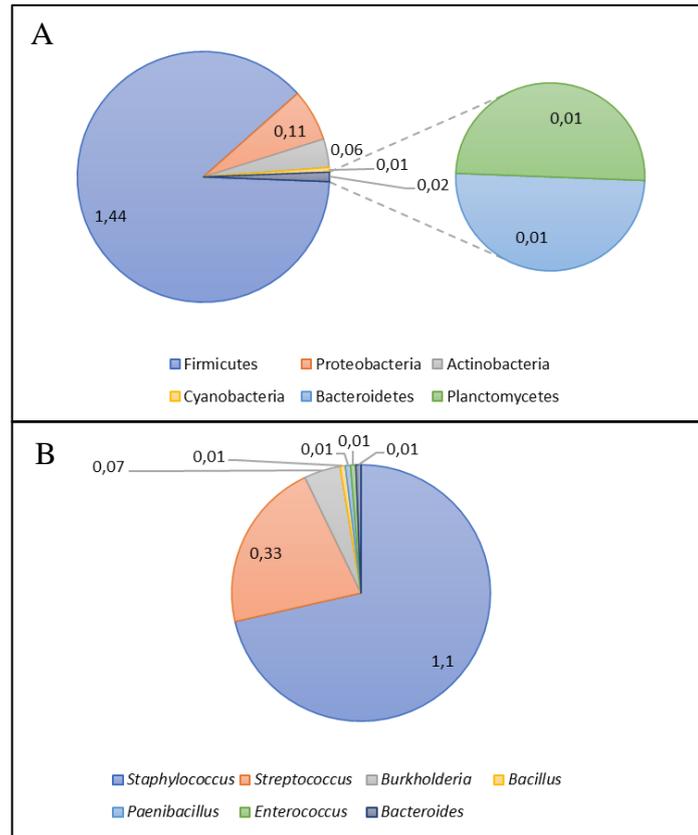


Figura 16: Distribuição da microbiota predominante a nível de filo (A) e gênero (B) na amostra de LCR do Caso 5 pelo KRAKEN2.

6. DISCUSSÃO

Este estudo mostrou a utilidade do mNGS para o conhecimento das comunidades microbianas presentes no LCR, sobretudo de bactérias e vírus, como ferramenta para identificação de potenciais patógenos causadores de infecções no SNC. A abordagem foi útil para identificar precisamente os patógenos em 5 das amostras de LCR que eram sabidamente positivas para vírus e bactérias. Em uma amostra que era desconhecida a etiologia da infecção do SNC, o mNGS retornou sequências que foram alinhadas a potenciais patógenos, relacionando-os ao estado clínico do paciente. Apesar dos desafios enfrentados na análise metagenômica, advindos desde a execução da construção da biblioteca até a análise de bioinformática, o mNGS é promissor para uso em laboratório clínico de rotina (PETERSEN et al. 2019).

As bactérias são as principais causas de infecções do SNC e responsáveis por altas taxas de mortalidade e morbidade, especialmente na população pediátrica. Em nosso estudo, duas amostras de LCR com diagnóstico de infecção bacteriana por *N. meningitidis* e *P. mirabilis* foram testadas, e em apenas uma o resultado foi concordante com a análise por mNGS. A amostra de LCR analisada para meningite meningocócica pertencia a uma paciente com histórico de contato com indivíduo infectado, a qual recebeu antibioticoterapia e evoluiu com alta. A *N. meningitidis* é um patógeno comensal colonizador da mucosa orofaríngea e transmitido através de secreções respiratórias passadas pelo contato com indivíduos infectados. Alguns estudos observacionais avaliaram o efeito das vacinas na transmissão de *N. meningitidis*, onde para os sorogrupos A e B a transmissão foi significativamente reduzida. No presente estudo, não foi possível avaliar se a paciente ou contactante estavam com o esquema vacinal completo contra *N. meningitidis* (ASTURIAS et al., 2022; BALMER et al., 2018; SUTHAR; SANKHYAN, 2019).

A maioria das *reads* obtidas dessa amostra de LCR não foram alinhadas ao gênero *Neisseria*, e sim para *Staphylococcus* e *Bacillus*. *S. cohnii* é um estafilococo coagulase-negativa que já foi reportado como agente causador de infecção em duas amostras de LCR analisadas por métodos diagnósticos convencionais, como coloração de Gram, cultura, teste de catalase, fermentação de glicose e ausência da coagulase. Vale ressaltar que há uma dificuldade em considerar estafilococos coagulase-negativa como patógenos verdadeiros, uma vez que estes fazem parte da microbiota normal do hospedeiro. *B. litoralis* é um bacilo Gram-positivo ou Gram-variável que habita solo e poeira. Com exceção do *B. anthracis*, agente etiológico do antrax, as espécies do gênero *Bacillus* são organismos de baixa virulência e raramente capazes de causar infecções em hospedeiros humanos. Um relato de caso de pseudomeningite por

espécie de *Bacillus* em um hospedeiro normal já foi reportado, porém o microrganismo foi considerado como contaminante do meio onde o LCR foi cultivado. Ainda que as *reads* não tenham sido majoritariamente alinhadas para o gênero *Neisseria*, acreditamos que os táxons predominantes podem estar relacionados à contaminação do fluido com a microbiota do hospedeiro e que foram identificados dada a alta sensibilidade do teste. (BECKER; HEILMANN; PETERS, 2014; BERNER et al., 1997; CUNHA; SCHOCH; BONOAN, 1997; LEBESSI et al., 2009; SMITH et al., 1982)

A segunda amostra de LCR analisada foi positiva na cultura para *P. mirabilis*, porém nenhuma das *reads* obtidas para essa amostra foi alinhada ao gênero *Proteus*. Ademais, houve predominância do filo Proteobacteria, com 7,59% de *hits* para o gênero *Salmonella*. Esse gênero comporta atualmente duas espécies que são *S. enterica*, subdividida em 6 subespécies, e *S. bangori*. As subespécies de *S. enterica* abrigam todas as *Salmonella* capazes de causar infecções em humanos. A meningite por *Salmonella* é rara, porém dentre todas as enterobactérias elas têm maior probabilidade de atravessar a BHE de forma intacta, sem que sejam eliminadas pelo sistema imune do hospedeiro. Infecções invasivas por *Salmonella* não-tifoide multirresistentes já foram relatadas na literatura, sobretudo em crianças com menos de 6 meses de idade, com taxas de mortalidade de 20%. Em nosso estudo, o paciente relatado com meningite tinha 4 meses de idade, e evoluiu à óbito devido à uma piora no seu quadro durante a internação (FIERER, 2022; TAPIA et al., 2015; WEN; BEST; NOURSE, 2017).

A subespécie *S. enterica subsp. enterica serovar Javiana* é o quarto sorotipo mais relatado para infecções em humanos nos EUA. Um estudo avaliou 50 amostras ambientais, alimentares e clínicas positivas para *S. enterica serovar Javiana*, das quais 46/50 foram sensíveis à cloranfenicol, gentamicina, canamicina, ácido nalidíxico e sulfisoxazol. Baixas frequências de resistência foram encontradas à tetraciclina e ampicilina. Além disso, em uma análise de expressão de genes de virulência, os autores observaram que todas as amostras foram positivas para o gene *cdtB*, que expressa a toxina distendente citoletal B, considerada uma toxina tifoide que não é comum em subespécies de *S. enterica*. Esses relatos nos alertam para realização de futuras análises que permitam a identificação de genes de resistência e virulência através da análise de bioinformática, como ferramenta para vigilância genômica de resistência antimicrobiana (HUDSON et al., 2020; MEZAL; STEFANOVA; KHAN, 2013).

Além de *Salmonella*, nessa amostra também houve alinhamento de genoma viral em 0,01% das *reads*, referentes ao gênero *Alphatorquevirus*. O *Torque teno vírus* (TTV) pertence à família *Anelloviridae* que foi recentemente adicionada à lista de agente virais que podem

causar infecções em humanos. Porém, a relação que esses patógenos estabelecem com o SNC de hospedeiros infectados ainda não está bem esclarecido. Um estudo avaliou 32 amostras pareadas de soro e LCR de pacientes com desordens neurológicas, incluindo encefalites e meningites. Dentre estes, 24/32 testaram positivo para TTV no soro, dos quais 3/24 foram positivos também no LCR. Os autores relataram uma baixa prevalência de TTV no LCR, indicando que a presença do vírus no LCR de pessoas com TTV confirmada no soro é pouco frequente (12,5%). Nós não podemos inferir de que forma o TTV pode ter contribuído para o mau prognóstico do paciente, uma vez que estudos mais aprofundados para o entendimento da patogênese do TTV no SNC são necessários (IKUTA et al., 2019; MAGGI et al., 2001; MAGGI; BENDINELLI, 2010).

As infecções virais continuam sendo importantes causas de infecções do SNC, e estão associadas a altas taxas de mortalidade e sequelas a longo prazo. Dentre as amostras de LCR aqui estudadas, duas eram positivas para os vírus da família *Herpesviridae*. Um estudo na Suécia incluiu 21 amostras de LCR em uma análise metagenômica, as quais tinham qPCR positiva para HSV-1, EBV, VZV e/ou vírus John Cunningham (JCV). Dentre estas, apenas em sete amostras não foram identificadas sequências virais, mostrando a alta sensibilidade do mNGS na detecção de vírus no SNC. Em nossa análise, o mNGS foi capaz de detectar as sequências virais de DNA presentes nas amostras de LCR e os *pipelines* de bioinformática permitiram a identificação taxonômica, ainda que em pouca quantidade, levando em consideração as frequências absolutas apresentadas (KAKOOZA-MWESIGE; TSHALA-KATUMBAY; JULIANO, 2019; OLAUSSON et al., 2022).

De fato, o mNGS apresenta uma forma de processamento mais simples de amostras biológicas, o qual permite detectar patógenos raros e não-cultiváveis. Apesar dos esforços nas metodologias convencionais em chegar à conclusão da etiologia da infecção no SNC, em alguns casos esse resultado não é possível. Em nosso estudo, incluímos na análise uma amostra de LCR que não tinha diagnóstico etiológico pelas vias convencionais laboratoriais. A paciente foi diagnosticada com mastoidite, que é uma complicação relativamente rara da otite média, causada principalmente por *S. pneumoniae*, *S. pyogenes* e *S. aureus*. As sequências obtidas para essa amostra foram alinhadas principalmente a espécies dos gêneros *Staphylococcus*, *Streptococcus* e *Burkholderia* (LEBER et al., 2016; ZHANG et al., 2020).

Alguns casos de meningite por *S. haemolyticus* já foram descritos na literatura, porém nenhum deles foi associado à mastoidite ou como consequência de otite média. Em vez disso, estão relacionados às infecções nosocomiais, pós-cirúrgicas ou ao uso de cateteres. Entretanto,

um caso de meningite por *S. pneumoniae* devido à mastoidite aguda foi relatado em um homem de 63 anos, que deu entrada ao pronto-socorro e evoluiu rapidamente com sintomas neurológicos, sendo submetido à intubação orotraqueal e transferido para UTI. Após tratamento com antimicrobianos e corticoides, o paciente apresentou melhora e evoluiu com alta. Nossos dados sugerem que apesar de ser um patógeno comum associado à meningite e mastoidite, o *S. pneumoniae* não tenha sido o principal causador da infecção no LCR da paciente do caso 5, uma vez que os achados microscópicos pela coloração de Gram afirmaram a presença de bacilos Gram-negativos, característica que não pertence a essa espécie. No entanto, não podemos descartar a possibilidade de que *S. pneumoniae* também tenha participado do processo infeccioso (MATHERN; CALESTINO, 2020; MIZUNO et al., 2023; VIJAYAN et al., 2019).

O complexo *B. cepacia* é formado por diferentes espécies Gram-negativas patogênicas e emergentes que causam infecções fatais, sobretudo em pacientes com fibrose cística. Até o presente momento, não há estudos relatando casos de meningite por *B. cepacia* devido à mastoidite ou otite média. Em contrapartida, dois pacientes já foram descritos com infecção no SNC por esse patógeno, no qual um deles era uma criança de três anos que deu entrada em um hospital na República Centro-Africana com sinais meníngeos, e a infecção no LCR foi confirmada por cultura e sequenciamento do gene 16S rDNA. O outro caso relatado foi de uma infecção por um membro do complexo, *B. multivorans*, em um homem de 55 anos com dois episódios de infecções da corrente sanguínea devido ao uso de catéter venoso central. A paciente relatada em nosso estudo evoluiu com alta após 14 dias de internação, onde fez uso de antibiótico de amplo espectro que foi efetivo para eliminar a infecção (FRANK et al., 2019; PERALTA et al., 2018; SFEIR, 2018).

O estudo teve algumas limitações, pois alguns dados não puderam ser recuperados devido à sua natureza retrospectiva. As técnicas de sequenciamento e análise de sequências para classificação taxonômica representaram um desafio por ser o primeiro estudo realizado na instituição utilizando tecnologia de NGS em amostras de LCR. Além disso, algumas sequências não puderam ser analisadas por requerer máquina com grande capacidade de armazenamento de dados, impossibilitando a execução de *pipelines* para análise das sequências e aprimoramento das que foram realizadas.

7. CONCLUSÃO

A abordagem mNGS permitiu caracterizar taxonomicamente os patógenos que potencialmente podem causar infecções no SNC em humanos, principalmente na amostra que não teve a identificação etiológica pelos testes convencionais. Nesse estudo, até o presente momento, foi relatado o primeiro caso de meningite pelo complexo *B. cepacia* devido à mastoidite apresentada em decorrência de uma otite média. Além disso, o mNGS foi altamente sensível na detecção de vírus e bactérias nas amostras positivas em culturas, látex ou qPCR.

A detecção molecular para os vírus da família *Herpesviridae* corroborou 100% com a análise das *reads* obtidas para as duas amostras positivas, mostrando que a técnica de PCR é particularmente útil para tal diagnóstico. No entanto, a utilização do mNGS como suporte à PCR pode aumentar a chance de encontrar patógenos raros, os quais não seriam identificados pela PCR, uma vez que os oligonucleotídeos utilizados na reação são específicos para determinado alvo.

Dessa maneira, esse estudo pode gerar pesquisas futuras que permitam explorar as *reads* obtidas para cada amostra, sobretudo aquelas que não tiveram *hits* com nenhum grupo taxonômico, de forma a aumentar ainda mais a sensibilidade do teste. Além do mais, utilizar outros *softwares* e *pipelines* de bioinformática que confirmem os patógenos identificados na caracterização taxonômica, para que melhore a sensibilidade analítica do mNGS na detecção de microrganismos infecciosos e não infecciosos no SNC.

Portanto, o mNGS associado à PCR e testes convencionais para detecção de microrganismos no LCR é importante para prover uma maior prospecção e eficiência destes patógenos no fluido. Para isso, é necessário que haja uma padronização nos ensaios metagenômicos para o LCR, de forma a contribuir para o desenvolvimento de metodologias de diagnóstico e detecção de potenciais patógenos causadores de infecção no SNC.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAM, P. et al. Cerebrospinal fluid. **Advances in Clinical Chemistry**, v. 36, p. 1–62, 2001.
- ASTURIAS, E. J. et al. Meningococcal disease in North America: Updates from the Global Meningococcal Initiative. **Journal of Infection**, v. 85, n. 6, p. 611–622, 2022.
- BALMER, P. et al. Impact of meningococcal vaccination on carriage and disease transmission: A review of the literature. **Human Vaccines and Immunotherapeutics**, v. 14, n. 5, p. 1118–1130, 2018.
- BECKER, K.; HEILMANN, C.; PETERS, G. Coagulase-negative staphylococci. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 27, n. 4, p. 870–926, 2014.
- BENNINGER, F.; STEINER, I. CSF in acute and chronic infectious diseases. Em: **Handbook of Clinical Neurology**. [s.l.] Elsevier B.V., 2017. v. 146p. 3–20.
- BERNER, R. et al. Ventricular Shunt Infection and Meningitis Due to *Bacillus Cereus*. **Neuropediatrics**, v. 28, n. 1, p. 333–334, 1997.
- BHARUCHA, T.; HOULIHAN, C. F.; BREUER, J. Herpesvirus Infections of the Central Nervous System. **Seminars in Neurology**, v. 39, n. 3, p. 369–382, 2019.
- BHIMRAJ, A. Acute community-acquired bacterial meningitis in adults: An evidence-based review. **Cleveland Clinic Journal of Medicine**, v. 79, n. 6, p. 393–400, 2012.
- BODILSEN, J. et al. Enterovirus Meningitis in Adults: A Prospective Nationwide Population-Based Cohort Study. **Neurology**, v. 97, n. 5, p. e454-e463, 2021.
- BORON, W. F.; BOULPAEP, E. L. **Fisiologia médica**. 2 ed. Rio de Janeiro: Elsevier Editora Ltda, 2015.
- BOTHWELL, S. W.; JANIGRO, D.; PATABENDIGE, A. Cerebrospinal fluid dynamics and intracranial pressure elevation in neurological diseases. **Fluids and Barriers of the CNS**, v. 16, n. 1, p. 1–18, 2019.
- BRONNER, I. F. et al. Improved protocols for Illumina sequencing. **Current Protocols in Human Genetics**, p. 18.2.1-18.2.42, 2014.
- CARVALHO, M. C. DA C. G.; SILVA, D. C. G. Sequenciamento de DNA de nova geração e suas aplicações na genômica de plantas. **Ciência Rural**, v. 40, n. 3, p. 735–744, 2010.
- CENTER FOR DISEASES CONTROL AND PREVENTION (CDC). Meningitis. **Disponível em**: <<https://www.cdc.gov/meningitis/bacterial.html>>. Acesso em 13 de setembro de 2022

CENTER FOR DISEASES CONTROL AND PREVENTION (CDC). Métodos laboratoriais para o diagnóstico de meningite. **Disponível em:** < <https://www.cdc.gov/meningitis/lab-manual/chpt02-epi.html>> Acesso em 13 de setembro de 2022

COMAR, S. R. et al. Análise citológica do líquido cefalorraquidiano. **Estud Biol.**, v. 31, n. 73/74/75, p. 93–102, 2009.

CUNHA, B. A.; SCHOCH, P. E.; BONOAN, J. T. Bacillus species pseudomeningitis. **Heart Lung**, v. 26, n. 3, p. 249-251, 1997.

DASGUPTA, K.; JEONG, J. Developmental biology of the meninges. **Genesis**, v. 57, n. 5, 1 maio 2019.

DE JONG, E. P. et al. Epidemiology of sepsis-like illness in young infants: Major role of enterovirus and human parechovirus. **Pediatric Infectious Disease Journal**, v. 37, n. 2, p. 113–118, 2018.

DEPREITERE, B.; BRUYNINCKX, D.; GÜIZA, F. Monitoring of intracranial pressure in meningitis. **Acta Neurochirurgica Supplement**, v. 122, p. 101–104, 1 maio 2016.

DI TERLIZZI, R.; PLATT, S. The function, composition and analysis of cerebrospinal fluid in companion animals: Part I - Function and composition. **Veterinary Journal**, v. 172, n. 3, p. 422–431, 2006.

DORAN, K. S. et al. Host–pathogen interactions in bacterial meningitis. **Acta Neuropathologica**, v. 131, n. 2, p. 185–209, 2016.

ENGELHARDT, B.; SOROKIN, L. The blood-brain and the blood-cerebrospinal fluid barriers: Function and dysfunction. **Seminars in Immunopathology**, v. 31, n. 4, p. 497–511, nov. 2009.

FIERER, J. Invasive Non-typhoidal Salmonella (iNTS) Infections. **Clinical Infectious Diseases**, v. 75, n. 4, p. 732–738, 2022.

FRANK, T. et al. Burkholderia cepacia meningitis in the central African Republic. **Pan African Medical Journal**, v. 32, n. 12, p. 1–4, 2019.

GIOVANE, R. A.; LAVENDER, P. D. Central Nervous System Infections. **Primary Care - Clinics in Office Practice**, v. 45, n. 3, p. 505–518, 2018.

GONZAGA-JAUREGUI, C.; LUPSKI, J. R.; GIBBS, R. A. Human genome sequencing in health and disease. **Annual Review of Medicine**, v. 63, p. 35–61, 2012.

GU, J. et al. A Retrospective Analysis of Metagenomic Next Generation Sequencing (mNGS) of Cerebrospinal Fluid from Patients with Suspected Encephalitis or Meningitis Infections. **Journal of Healthcare Engineering**, v. 2022, p. 1–6, 2022.

GU, W.; MILLER, S.; CHIU, C. Y. Clinical Metagenomic Next-Generation Sequencing for Pathogen Detection. **Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease**, v. 14, p. 319–338, 2019.

HEPNAR, D. et al. Recommendations for cerebrospinal fluid analysis. **Folia Microbiologica**, v. 64, n. 3, p. 443–452, 2019.

HOLMQUIST, L.; RUSSO, C. A.; ELIXHAUSER, A. Meningitis-Related Hospitalizations in the United States. *In: Healthcare Cost and Utilization Project (HCUP) Statistical Briefs [Internet]*. Rockville: Agency for Healthcare Research and Quality (US), 2006.

HRISHI, A. P.; SETHURAMAN, M. Cerebrospinal fluid (CSF) analysis and interpretation in neurocritical care for acute neurological conditions. **Indian Journal of Critical Care Medicine**, v. 23, p. S115–S119, 2019.

HU, T. et al. Next-generation sequencing technologies: An overview. **Human Immunology**, v. 82, n. 11, p. 801–811, 2021.

HUDSON, L. K. et al. Genomic characterization and phylogenetic analysis of *Salmonella enterica* serovar Javiana. **PeerJ**, v. 8, n. e10256, 2020.

IKUTA, Y. et al. Aseptic meningitis caused by torque teno virus in an infant: A case report. **Journal of Medical Case Reports**, v. 13, n. 1, 2019.

JAIN, M. et al. The Oxford Nanopore MinION: delivery of nanopore sequencing to the genomics community. **Genome Biology**, v. 17, n. 1, 2016.

KAKOOZA-MWESIGE, A.; TSHALA-KATUMBAY, D.; JULIANO, S. L. Viral infections of the central nervous system in Africa. **Brain Research Bulletin**, v. 145, p. 2–17, 2019.

KAUR, H. et al. Aseptic meningitis. *In: StatPearls [Internet]*. Treasure Island (FL): **StatPearls Publishing**, 2023. p. 1-12. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK557412/>.

KCHOUK, M.; GIBRAT, J. F.; ELLOUMI, M. Generations of Sequencing Technologies: From First to Next Generation. **Biology and Medicine**, v. 09, n. 03, 2017.

- KIM, J. V. et al. Myelomonocytic cell recruitment causes fatal CNS vascular injury during acute viral meningitis. **Nature**, v. 457, n. 7226, p. 191–195, 2009.
- KOHIL, A. et al. Viral meningitis: an overview. **Archives of Virology**, v. 166, n. 2, p. 335–345, 2021.
- LEBER, A. L. et al. Multicenter evaluation of biofire filmarray meningitis/encephalitis panel for detection of bacteria, viruses, and yeast in cerebrospinal fluid specimens. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 54, n. 9, p. 2251–2261, 2016.
- LEBESSI, E. et al. Bacillus cereus meningitis in a term neonate. **Journal of Maternal-Fetal and Neonatal Medicine**, v. 22, n. 5, p. 458–461, 2009.
- LOGAN, S. A. E.; MACMAHON, E. Viral meningitis. **BMJ**, v. 336, n. 7634, p. 36–40, 2008.
- MACAULAY, N.; KEEP, R. F.; ZEUTHEN, T. Cerebrospinal fluid production by the choroid plexus: a century of barrier research revisited. **Fluids and Barriers of the CNS**, v. 19, n. 1, 1 dez. 2022.
- MACE, S. E. Acute Bacterial Meningitis. **Emergency Medicine Clinics of North America**, v. 26, n. 2, p. 281–317, 2008.
- MAGGI, F. et al. Low Prevalence of TT Virus in the Cerebrospinal Fluid of Viremic Patients With Central Nervous System Disorders. **Journal of Medical Virology**, v. 65, n. 1, p. 418–422, 2001.
- MAGGI, F.; BENDINELLI, M. Human anelloviruses and the central nervous system. **Reviews in Medical Virology**, v. 20, n. 6, p. 392–407, 2010.
- MATHERN, R.; CALESTINO, M. An unusual presentation of hemiparesis: Rapidly progressing Streptococcal pneumoniae meningitis secondary to acute mastoiditis. **IDCases**, v. 21, n. e00831, p. 1–4, 2020.
- MATTHEWS, E. et al. Herpesvirus-Associated Encephalitis: an Update. **Current Tropical Medicine Reports**, v. 9, n. 3, p. 92–100, 2022.
- MCGILL, F. et al. Acute bacterial meningitis in adults. **The Lancet**, v. 388, n. 10063, p. 3036–3047, 2016.
- METZKER, M. L. Emerging technologies in DNA sequencing. **Genome Research**, v. 15, n. 12, p. 1767–1776, 2005.

MEZAL, E. H.; STEFANOVA, R.; KHAN, A. A. Isolation and molecular characterization of *Salmonella enterica* serovar Javiana from food, environmental and clinical samples. **International Journal of Food Microbiology**, v. 164, n. 1, p. 113–118, 2013.

MIZUNO, S. et al. Nosocomial meningitis caused by *Staphylococcus haemolyticus* in a child with neutropenia in the absence of intracranial devices: a case report. **BMC Infectious Diseases**, v. 23, n. 1, p. 1–4, 2023.

MORAES, J. C.; BARATA, R. B. A doença meningocócica em São Paulo, Brasil, no século XX: características epidemiológicas. **Caderno de Saúde Pública**, v. 21, n. 5, p. 1458–1471, 2005.

MOUNT, H. R.; BOYLE, S. D. Aseptic and Bacterial Meningitis: Evaluation, Treatment, and Prevention. **American Family Physician**, v. 96, n. 5, p. 314–322, 2017.

NATH, A. Neuroinfectious diseases: A crisis in neurology and a call for action. **JAMA Neurology**, v. 72, n. 2, p. 143–144, 2015.

NHGRI. The Cost of Sequencing a Human Genome. **Disponível em:** <<https://www.genome.gov/about-genomics/fact-sheets/Sequencing-Human-Genome-cost>>. Acesso em 18 de setembro de 2022.

OLAUSSON, J. et al. Optimization of cerebrospinal fluid microbial DNA metagenomic sequencing diagnostics. **Scientific Reports**, v. 12, n. 1, 2022.

OLUKOGA, A. O.; BOLODEOKU, J.; DONALDSON, D. Cerebrospinal fluid analysis in clinical diagnosis. **J Clin Pathol**, v. 50, p. 187–192, 1997.

PARDRIDGE, W. M. CSF, blood-brain barrier, and brain drug delivery. **Expert Opinion on Drug Delivery**, v. 13, n. 7, p. 963–975, 2 jul. 2016.

PARIKH, S. R. et al. The everchanging epidemiology of meningococcal disease worldwide and the potential for prevention through vaccination. **Journal of Infection**, v. 81, n. 4, p. 483–498, 2020.

PERALTA, D. P. et al. *Burkholderia multivorans*: A rare yet emerging cause of bacterial meningitis. **IDCases**, v. 11, p. 61–63, 2018.

PETER, J.; BURBACH, H. Neuropeptides and cerebrospinal fluid. **Ann Clin Biochem**, v. 19, p. 269–277, 1982.

PETERSEN, L. M. et al. Third-Generation Sequencing in the Clinical Laboratory: Exploring the Advantages and Challenges of Nanopore Sequencing. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 58, n. 1, p. 1–10, 2019.

PIZZA, M.; BEKKAT-BERKANI, R.; RAPPUOLI, R. Vaccines against meningococcal diseases. **Microorganisms**, v. 8, n. 10, p. 1–21, 2020.

POPLIN, V.; BOULWARE, D. R.; BAHR, N. C. Methods for rapid diagnosis of meningitis etiology in adults. **Biomarkers in Medicine**, v. 14, n. 6, p. 459–479, 2020.

PUCCIONI-SOHLER, M. **Diagnóstico de neuroinfecção**: com abordagem dos exames do líquido cefalorraquidiano e neuroimagem. Rio de Janeiro: Editora Rubio, 2008.

RAMACHANDRAN, P. S.; WILSON, M. R. Metagenomics for neurological infections — expanding our imagination. **Nature Reviews Neurology**, v. 16, n. 10, p. 547–556, 2020.

RAMILO, O. et al. Detection of interleukin 1 β but not tumor necrosis factor- α in Cerebrospinal fluid of children with aseptic meningitis. **Archives of Pediatrics & Adolescent Medicine**, v. 144, n. 3, p. 349–352, 1990.

REDZIC, Z. Molecular biology of the blood-brain and the blood-cerebrospinal fluid barriers: Similarities and differences. **Fluids and Barriers of the CNS**, v. 8, n. 1, 18 jan. 2011.

RONAGHI, M. et al. Real-Time DNA Sequencing Using Detection of Pyrophosphate Release. **Analytical Biochemistry**, v. 242, p. 84–89, 1996.

ROOS, K. L. Acute Bacterial Meningitis. **Seminars in Neurology**, v. 20, n. 3, p. 293–306, 2000.

ROTHBERG, J. M. et al. An integrated semiconductor device enabling non-optical genome sequencing. **Nature**, v. 475, n. 7356, p. 348–352, 2011.

RUMBOLDT, Z.; THURNHER, M. M.; GUPTA, R. K. Central Nervous System Infections. **Seminars in Roentgenology**, v. 42, n. 2, p. 62–91, abr. 2007.

SÁFADI, M. A. P.; BARROS, A. P. Meningococcal conjugate vaccines: Efficacy and new combinations. **Jornal de Pediatria**, v. 82, n. 3, 2006.

SAKKA, L.; COLL, G.; CHAZAL, J. Anatomy and physiology of cerebrospinal fluid. **European Annals of Otorhinolaryngology, Head and Neck Diseases**, v. 128, n. 6, p. 309–316, 2011.

SANGER, F.; COULSON, A. R. A Rapid Method for Determining Sequences in DNA by Primed Synthesis with DNA Polymerase. **J. Mol. Biol.**, v. 94, p. 441–448, 1975.

SARAIVA, M. D. G. G. et al. Epidemiology of infectious meningitis in the state of Amazonas, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 48, p. 79–86, 2015.

SAUNDERS, N. R. et al. The rights and wrongs of blood-brain barrier permeability studies: A walk through 100 years of history. **Frontiers in Neuroscience**, v. 8, n. 404, 2014.

SCHELD, W. M.; WHITLEY, R. J.; MARRA, C. M. Infections of the Central Nervous System. Em: WORMSER, G. P. (Ed.). **Clinical Infectious Diseases**. 3^a ed ed. [s.l: s.n.]. v. 40p. 638–641.

SEGAL, M. B. The Choroid Plexuses and the Barriers Between the Blood and the Cerebrospinal Fluid. **Cellular and Molecular Neurobiology**, v. 20, n. 2, p. 183–196, 2000.

SFEIR, M. M. Burkholderia cepacia complex infections: More complex than the bacterium name suggest. **Journal of Infection**, v. 77, n. 3, p. 166–170, 2018.

SIDDIQI, O. K. et al. Molecular diagnosis of central nervous system opportunistic infections in HIV-infected zambian adults. **Clinical Infectious Diseases**, v. 58, n. 12, p. 1771–1777, 2014.

SLACK, M. P. E. et al. Invasive Haemophilus influenzae infections after 3 decades of Hib protein conjugate vaccine use. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 34, n. 3, p. e00028-21, 1 jul. 2021.

SLATKO, B. E.; GARDNER, A. F.; AUSUBEL, F. M. Overview of Next-Generation Sequencing Technologies. **Current Protocols in Molecular Biology**, v. 122, n. 1, 2018.

SMITH, D. J. et al. Speciation and Antibiotic Susceptibility Patterns of Coagulase-Negative Staphylococci. **Eur. J. Clin. Microbiol**, v. 1, n. 4, p. 228–232, 1982.

SPECTOR, R.; ROBERT SNODGRASS, S.; JOHANSON, C. E. A balanced view of the cerebrospinal fluid composition and functions: Focus on adult humans. **Experimental Neurology**, v. 273, p. 57–68, 2015.

STOFFEL, L. et al. Striking Decrease of Enteroviral Meningitis in Children During the COVID-19 Pandemic. **Open Forum Infectious Diseases**, v. 8, n. 6, 2021.

SUTHAR, R.; SANKHYAN, N. Bacterial Infections of the Central Nervous System. **Indian Journal of Pediatrics**, v. 86, n. 1, p. 60–69, 2019.

- SWANSON, D. Meningitis. **Pediatrics in Review**, v. 36, n. 12, p. 514–528, 2015.
- TAPIA, M. D. et al. Invasive nontyphoidal salmonella infections among children in Mali, 2002–2014: Microbiological and epidemiologic features guide vaccine development. **Clinical Infectious Diseases**, v. 61, p. S332–S338, 2015.
- THOMPSON, E. J. Cerebrospinal fluid. **Journal of Neurology**, v. 59, p. 349–357, 1995.
- TUMANI, H.; HUSS, A.; BACHHUBER, F. The cerebrospinal fluid and barriers – anatomic and physiologic considerations. Em: **Handbook of Clinical Neurology**. [s.l.] Elsevier B.V., 2017. v. 146p. 3–20.
- TUPPENY, M. Viral meningitis and encephalitis. **Critical Care Nursing Clinics of North America**, v. 25, n. 3, p. 363–380, 2013.
- UENO, M. et al. Blood–brain barrier and blood–cerebrospinal fluid barrier in normal and pathological conditions. **Brain Tumor Pathology**, v. 33, n. 2, p. 89–96, 1 abr. 2016.
- UNIVERSIDADE ABERTA DO SUS (UNASUS). **PNI: entenda como funciona um dos maiores programas de vacinação do mundo**. Disponível em: <<https://www.unasus.gov.br/noticia/pni-entenda-como-funciona-um-dos-maiores-programas-de-vacinacao-do-mundo>> Acesso em 14 de setembro 2022
- VENKATESAN, A.; MURPHY, O. C. Viral Encephalitis. **Neurologic Clinics**, v. 36, n. 4, p. 705–724, 2018.
- VIJAYAN, P. et al. Device-Associated meningitis by linezolid-resistant staphylococcus haemolyticus in a vancomycin-hypersensitive patient. **Journal of Neurosciences in Rural Practice**, v. 10, n. 4, p. 718–720, 2019.
- WALL, E. C. et al. Acute bacterial meningitis. **Current Opinion in Neurology**, v. 35, n. 3, p. 386–395, 2021.
- WASSWA, F. B. et al. MinION Whole-Genome Sequencing in Resource-Limited Settings: Challenges and Opportunities. **Current Clinical Microbiology Reports**, v. 9, n. 4, p. 52–59, 2022.
- WEIDMANN, M.; ARMBRUSTER, K.; HUFERT, F. T. Challenges in designing a Taqman-based multiplex assay for the simultaneous detection of herpes simplex virus types 1 and 2 and Varicella-zoster virus. **Journal of Clinical Virology**, v. 42, n. 4, p. 326–334, 2008.

WEN, S. C. H.; BEST, E.; NOURSE, C. Non-typhoidal Salmonella infections in children: Review of literature and recommendations for management. **Journal of Paediatrics and Child Health**, v. 53, n. 10, p. 936–941, 2017.

WILSON, M. R. et al. Clinical Metagenomic Sequencing for Diagnosis of Meningitis and Encephalitis. **New England Journal of Medicine**, v. 380, n. 24, p. 2327–2340, 2019.

WRIGHT, B. L. C.; LAI, J. T. F.; SINCLAIR, A. J. Cerebrospinal fluid and lumbar puncture: A practical review. **Journal of Neurology**, v. 259, n. 8, p. 1530–1545, 2012.

WRIGHT, W. F. et al. Viral (aseptic) meningitis: A review. **Journal of the Neurological Sciences**, v. 398, p. 176–183, 2019.

YAMADA, S. et al. Influence of respiration on cerebrospinal fluid movement using magnetic resonance spin labeling. **Fluids and Barriers of the CNS**, v. 10, n. 36, p. 1–7, 2013.

YAMADA, S. Cerebrospinal fluid dynamics. **Croatian Medical Journal**, v. 62, n. 4, p. 399–410, 2021.

ZHANG, Y. et al. Clinical application and evaluation of metagenomic next-generation sequencing in suspected adult central nervous system infection. **Journal of Translational Medicine**, v. 18, n. 1, 2020.

9. CRONOGRAMA

| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 | 19 | 20 | 21 | 22 | 23 | 24 | |
|-----|---|---|---|---|---|---|---|---|---|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|---|
| A-1 | X | X | X | X | X | X | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| A-2 | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | | | | | | | |
| A-3 | | | | | | | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | | | | | | | | | |
| A-4 | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | | | | | | | |
| A-5 | | | | | | | | | | | | | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X |
| A-6 | | | | | | | | | | | | | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X |
| A-7 | | | | | | | | | | | | | | | | | | X | X | X | X | X | X | X | X |
| A-8 | | | | | | | | | | | | | | | | | | X | X | X | X | X | X | X | X |
| A-9 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | X | X | X | X | X | X |

A-1: Submissão ao órgão regulamentador (Comitê de Ética em pesquisa – CEP);

A-2: Revisão da literatura;

A-3: Compra do material;

A-4: Seleção das amostras para sequenciamento;

A-5: Relacionar os achados obtidos com outros bancos de dados;

A-6: Analisar as características clínicas dos pacientes e correlacionar ao patógeno;

A-7: Análise final dos resultados;

A-8: Submissão de produção bibliográfica/tecnológica;

A-9: Apresentação e defesa da dissertação.

10.APÊNDICE

APÊNDICE I: Protocolo de fluxo de trabalho do Illumina DNA Prep.

Laboratório de Bacteriologia – Gerência de Bacteriologia
 Laboratório de Estudos em Neuroinfecções e Resistência Bacteriana - LENRESB
 Fundação de Medicina Tropical Doutor Heitor Vieira Dourado – FMT-HVD
 Av. Pedro Teixeira, s/n
 Manaus - AM - Brasil CEP: 69.040-000
 Tel.: +55 92 2127-3454
 E-mail: lonresh.fmt@gmail.com



PROCOLO DO FLUXO DE TRABALHO DO ILLUMINA DNA PREP

1- TAGMENTAÇÃO DO DNA GENÔMICO

Esta etapa usa uma **bead ligada ao transposon (BLT, Bead-linked Transposomes)** para tagmentar o DNA, que é um processo que fragmenta e marca o DNA com sequências adaptadoras.

Materials necessários:

- Bead-linked transposomes (BLT)
- Tagment Buffer 1 (TB1)
- Água livre de nuclease (Nuclease-free water)
- Placa de 96 poços
- Tubos de microcentrífuga de 1,7mL
- Tiras de 8 poços
- Selante de placas
- Pipetas: multicanal de 20µL e 200µL

Sobre os reagentes:

BLT → deve ser armazenado de 2°C a 8°C. Quando for utilizar, deixar à temperatura ambiente. Vortex para misturar, mas não pode centrifugar antes de pipetar.

TB1 → deve ser armazenado de -25°C a -15°C. Quando for utilizar, deixar à temperatura ambiente. Vortex para misturar.

Programar no termociclador:

Escolha a opção de tampa pré-aquecida a 100°C. Defina o volume de reação final para 50µL. Temperatura de 55°C por 15 minutos, e resfriamento a 10°C hold.

Procedimento:

- I. Adicionar 2-30µL de DNA em cada poço da placa de 96 poços para que a quantidade total de entrada seja 100-500ng.

Laboratório de Bacteriologia – Gerência de Bacteriologia
 Laboratório de Estudos em Neuroinfecções e Resistência Bacteriana - LENRESB
 Fundação de Medicina Tropical Doutor Heitor Vieira Dourado – FMT-HVD
 Av. Pedro Teixeira, s/n
 Manaus - AM - Brasil CEP: 69.040-000
 Tel.: +55 92 2127-3454
 E-mail: lenresb.fmt@gmail.com



- II. Se o volume de DNA for <math><30\mu\text{L}</math>, adicione nuclease-free water para as amostras de DNA alcançar o volume total de - III. Vortex o BLT (capa amarela) vigorosamente por 10 segundos para ressuspender. Repita se necessário.
- IV. Combine os seguintes volumes para preparar o Master Mix da Tagmentação. Multiplique cada volume pelo número de amostras que será processada.
 BLT - $11\mu\text{L}</math>
 TB1 - $11\mu\text{L}</math>
 NOTA: Estes volumes produzem $22\mu\text{L}</math> de Master Mix de Tagmentação por amostra, que inclui um volume extra para pipetagem precisa.$$$
- V. Vortex o Master Mix de Tagmentação vigorosamente para ressuspender.
- VI. Divida o Master Mix de Tagmentação em volumes iguais para os 7 poços da tira.
- VII. Usando uma pipeta multicanal de $200\mu\text{L}</math>, transfira $20\mu\text{L}</math> do Master Mix de Tagmentação das tiras para cada poço da placa contendo a amostra.
 Use ponteiras limpas para cada coluna de amostras.$$
- VIII. Descarte a tira depois que o Master Mix de Tagmentação tiver sido adicionado.
- IX. Pipete cada amostra 10x para ressuspender.
- X. Coloque no termociclador programado e inicie a corrida programada.

2- LIMPEZA PÓS-TAGMENTAÇÃO

Essa etapa lava o DNA marcado com adaptador na BLT antes da amplificação por PCR.

Material necessário:

- Tagment Stop Buffer (TSB)
- Tagment Wash Buffer (TWB)
- Placa de 96 poços magnética
- Selante de placa
- Pipetas: multicanal de $20\mu\text{L}</math> e $200\mu\text{L}</math>$$

Sobre os reagentes:

Laboratório de Bacteriologia – Gerência de Bacteriologia
 Laboratório de Estudos em Neuroinfecções e Resistência Bacteriana - LENRESB
 Fundação de Medicina Tropical Doutor Heitor Vieira Dourado – FMT-HVD
 Av. Pedro Teixeira, s/n
 Manaus - AM - Brasil CEP: 69.040-000
 Tel.: +55 92 2127-3454
 E-mail: lenresb.fmt@gmail.com



TSB → armazenar a temperatura ambiente. Se um precipitado for observado, aqueça a 37°C por 10 minutos, e após isso vártex até o precipitado ser dissolvido.

TWB → armazenar a temperatura ambiente. Usá-lo à temperatura ambiente.

Programar no termociclador:

Escolha a opção de tampa pré-aquecida a 100°C. Defina o volume de reação final para 60µL. Temperatura de 37°C por 15 minutos, e resfriamento a 10°C hold.

Procedimento:

- I. Adicione 10µL de TSB na placa.
- II. Pipete lentamente cada poço 10x para ressuspender as beads, e após isso sele a placa.
- III. Coloque no termociclador programado e inicie a corrida.
- IV. Coloque a placa de 96 poços na placa magnética e espere até que o líquido fique claro (~3 minutos)
- V. Usando uma pipeta multicanal, remova e descarte o sobrenadante.
- VI. Lave duas vezes como a seguir:
 - a. Remova a placa de amostra da placa magnética e use uma técnica de pipetagem deliberadamente lenta para adicionar 100µL de TWB diretamente sobre as beads. Uma pipetagem lenta minimiza a formação de espuma pelo TWB para evitar volumes incorretos de aspiração e mistura incompleta.
 - b. Pipete lentamente até as beads estarem completamente ressuspensas.
 - c. Coloque a placa na placa magnética e espere até que o líquido fique claro (~3 minutos).
 - d. Usando uma pipeta multicanal, remova e descarte o sobrenadante.
 - e. Repita o processo.
- VII. Remova a placa da placa magnética e pipete lentamente 100µL de TWB diretamente sobre as beads.
- VIII. Pipete cada poço lentamente para ressuspender as beads.
- IX. Sele a placa e como na placa magnética até que o líquido fique claro (~3 minutos). Mantenha a placa de amostras sobre a placa magnética até a etapa 4 da seção *Procedimentos em Amplificação do DNA Tagmentado*.

O TWB permanece nos poços para prevenir a secagem excessiva das beads

Laboratório de Bacteriologia – Gerência de Bacteriologia
 Laboratório de Estudos em Neuroinfecções e Resistência Bacteriana - LENRESB
 Fundação de Medicina Tropical Doutor Heitor Vieira Dourado – FMT-HVD
 Av. Pedro Teixeira, s/n
 Manaus - AM - Brasil CEP: 69.040-000
 Tel.: +55 92 2127-3454
 E-mail: lenresb.fmt@gmail.com



3- AMPLIFICAÇÃO DO DNA TAGMENTADO

Esta etapa amplifica o DNA tagmentado usando um programa de PCR limitado por ciclos. A etapa de PCR adiciona os adaptadores Index 1 (i7), Index 2 (i5), e as sequências requeridas para gerar os clusters de sequenciamento.

Materials necessários:

- Enhanced PCR Mix (EPM)
- Adaptadores Index (tubos ou placas)
- Água livre de nuclease (Nuclease-free water)
- Tubos de microcentrífuga de 1,7mL
- Selante de placas
- Pipetas: multicanal de 20 µL e 200µL.

Sobre os reagentes:

Placas de adaptadores Index → uma placa pode conter >10µL de adaptadores Index. Não adicione amostras na placa de adaptadores Index. Cada poço da placa de index é de uso único.

Tubos de adaptadores Index → abra o tubo somente uma vez para prevenir extraviar a tampa. Alternativamente, use tampas limpas após abrir cada tubo.

EPM → armazenar de -25°C a -15°C. Descongelar no gelo. Inverter para misturar, após centrifugar brevemente.

Index Adapters → armazenar de -25°C a -15°C. Descongelar à temperatura ambiente. Se for tubo, vórtex para misturar, e após centrifugar brevemente. Se for placa, dar spin brevemente antes de usar.

Programar no termociclador:

| | | |
|----------------------|---|----------|
| 68°C por 3 minutos | } | X ciclos |
| 98°C por 3 minutos | | |
| 98°C por 45 segundos | | |
| 62°C por 30 segundos | | |
| 68°C por 2 minutos | | |

Laboratório de Bacteriologia – Gerência de Bacteriologia
 Laboratório de Estudos em Neuroinfecções e Resistência Bacteriana - LENRESB
 Fundação de Medicina Tropical Doutor Heitor Vieira Dourado – FMT-HVD
 Av. Pedro Teixeira, s/n
 Manaus - AM - Brasil CEP: 69.040-000
 Tel.: +55 92 2127-3454
 E-mail: lenresb.fmt@gmail.com



68°C por 1 minutos

Hold a 10°C

O número de ciclos depende da concentração de DNA de entrada:

| Total de DNA de entrada (ng) | Número de ciclos da PCR (X) |
|------------------------------|-----------------------------|
| 1-9 | 12 |
| 10-24 | 8 |
| 25-49 | 6 |
| 50-99 | 5 |
| 100-500 | 5 |
| Sangue/Saliva | 5 |

Procedimento:

- I. Combine os seguintes volumes para preparar o Master Mix da PCR. Multiplique cada volume pelo número de amostras que serão processadas.

EPM (22µL)

Nuclease-free water (22µL)

NOTA: o excesso de reagente é incluído no volume para garantir uma pipetagem precisa.

- II. Vortex, e após centrifugue o Master Mix da PCR a 280 x g por 10 segundos.
- III. Com a placa de amostras na placa magnética, use uma pipeta multicanal de 200µL para remover e descartar o sobrenadante.
A espuma que permanecer na parede do poço não afeta a biblioteca.
- IV. Remova a placa de amostras da placa magnética.
- V. Imediatamente adicione 40µL do Master Mix da PCR diretamente sobre as beads em cada poço de amostra.
- VI. Imediatamente pipete para misturar até as beads serem completamente ressuspendidas.
Alternativamente, sele a placa e use um shaker de placa a 1600rpm por 1 minuto.
- VII. Sele a placa de amostras e centrifugue a 280 x g por 3 segundos.
- VIII. Adicione o adaptador index apropriado para cada amostra

| Tipo de kit Index | Configuração do kit | Volume de index por amostra |
|----------------------|---------------------|-----------------------------|
| 24 plex (dual index) | Tubos individuais | 5µL do adaptador i7 |

Laboratório de Bacteriologia – Gerência de Bacteriologia
 Laboratório de Estudos em Neuroinfecções e Resistência Bacteriana - LENRESB
 Fundação de Medicina Tropical Doutor Heitor Vieira Dourado – FMT-HVD
 Av. Pedro Teixeira, s/n
 Manaus - AM - Brasil CEP: 69.040-000
 Tel.: +55 92 2127-3454
 E-mail: lenresb.fmt@gmail.com



| | | 5µL do adaptador i5 |
|----------------------|-------------------|--|
| 96 plex (dual index) | Placa de 96 poços | 10µL dos adaptadores pré-pareados i7 e i5. |

- IX. Usando uma pipeta calibrada em 40µL, pipete 10x para misturar. Alternativamente, sele a placa e use um shaker de placa a 1600rpm por 1 minuto.
- X. Sele a placa com "Microseal B", e após centrifugue a 280 x g por 30 segundos.
- XI. Coloque a placa no termociclador programado e inicie a corrida.

NOTA: Se você for parar nessa etapa, guarde a placa de 2°C a 8°C por até 30 dias.

4- LIMPEZA DA BIBLIOTECA

Esta etapa usa purificação por bead dupla-face para purificar as bibliotecas amplificadas.

Materials necessário:

- Illumina Purification Beads (IPB)
- Ressuspension Buffer (RSB)
- Etanol 80% preparado recentemente
- Água livre de nuclease (Nuclease free-water)
- Placa de armazenamento Deepwell de prolipropileno de 96 poços 0,8mL (Placa MIDI)
- Placa de 96 poços para PCR
- Tubos de microcentrifuga de 1,7mL
- Selante de placa 'Microseal B'
- Selante de placa 'Microseal F' (laminado)

Sobre os reagentes:

IPB → deve estar à temperatura ambiente antes do uso. Vortex antes de cada uso. Vortex frequentemente ter certeza que as beads estão uniformemente distribuídas. Aspirar e dispensar lentamente devido à viscosidade da solução. Deve ser armazenada à temperatura ambiente. Vortex e inversão para misturar.

RSB → armazenar em -25°C a -15°C. Descongelar e usar a temperatura ambiente. Vortex para misturar.

Etanol 80% → prepara recentemente de etanol absoluto.

Laboratório de Bacteriologia – Gerência de Bacteriologia
 Laboratório de Estudos em Neuroinfecções e Resistência Bacteriana - LENRESB
 Fundação de Medicina Tropical Doutor Heitor Vieira Dourado – FMT-HVD
 Av. Pedro Teixeira, s/n
 Manaus - AM - Brasil CEP: 69.040-000
 Tel.: +55 92 2127-3454
 E-mail: lenresb.fmt@gmail.com



Procedimento:

- I. Centrifugue a 280 x g por 1 minuto para coletar o conteúdo no fundo do poço.
- II. Coloque a placa de amostras na placa magnética e espere até que o líquido fique claro (~5 minutos).
- III. Transfira 45µL do sobrenadante de cada poço da placa de PCR para o poço correspondente de uma nova placa MIDI.
- IV. Vortex e inverta o IPB múltiplas vezes para ressuspender.
- V. Para entrada de DNA padrão, faça o seguinte:
 - a. Adicione 40µL de nuclease-free water em cada poço contendo o sobrenadante.
 - b. Adicione 45µL de IPB em cada poço contendo sobrenadante.
 - c. Pipete cada poço 10x para misturar. Alternativamente, sele a placa e use um shaker de placa a 1600rpm por 1 minuto.
 - d. Sele a placa e incube a temperatura ambiente por 5 minutos.
 - e. Coloque sobre a placa magnética e espere até que o líquido fique claro (~5 minutos).
 - f. Durante a incubação, vórtex completamente o IPB (tubo de estoque não diluído) e, em seguida, adicione 15µL em cada poço de uma nova placa MIDI.
 - g. Transfira 125µL do sobrenadante de cada poço da primeira placa MIDI para a nova placa MIDI contendo 15µL de IPB não diluído nos poços correspondentes.
 - h. Pipete cada poço na placa MIDI por 10x para misturar. Alternativamente, sele a placa e use um shaker de placa a 1600rpm por 1 minuto.
 - i. Descarte a primeira placa.
- VI. Para entrada de amplicons de PCR pequenos, realize as seguintes etapas:
 - a. Adicione 81µL de IPB para cada poço da placa MIDI contendo o sobrenadante.
 - b. Pipete cada poço 10x para misturar. Alternativamente, sele a placa e use um shaker de placa a 1600rpm por 1 minuto.
- VII. Incube a placa MIDI selada a temperatura ambiente por 5 minutos.
- VIII. Coloque na placa magnética e espere até que o líquido fique claro (~5 minutos).
- IX. Sem perturbar as beads, remova e descarte o sobrenadante.
- X. Lave 2x como a seguir:
 - a. Com a placa MIDI na placa magnética, adicione 200µL de etanol 80% sem misturar.

Laboratório de Bacteriologia – Gerência de Bacteriologia
 Laboratório de Estudos em Neuroinfecções e Resistência Bacteriana - LENRESB
 Fundação de Medicina Tropical Doutor Heitor Vieira Dourado – FMT-HVD
 Av. Pedro Teixeira, s/n
 Manaus - AM - Brasil CEP: 69.040-000
 Tel.: +55 92 2127-3454
 E-mail: lenresb.fmt@gmail.com



- b. Incube por 30 segundos.
- c. Sem perturbar as beads, remova e descarte o sobrenadante.
- XI. Use uma pipeta de 20µL para remover e descartar o resíduo de etanol.
- XII. Seque na placa magnética por 5 minutos.
- XIII. Remova da placa magnética.
- XIV. Adicione 32µL de RSB nas beads.
- XV. Incube a temperatura ambiente por 2 minutos.
- XVI. Coloque a placa MIDI na placa magnética e espere até que o líquido fique claro (~2 minutos).
- XVII. Transfira 30µL do sobrenadante para uma nova placa de PCR de 96 poços.

NOTA: Se for parar nesta etapa, sele a placa com selante 'Microseal B' ou 'Microseal F', e armazene em -25°C a -15°C por até 30 dias.

5- POOL DA BIBLIOTECA

Quando o DNA de entrada é de 100-500ng, quantificar e normalizar a biblioteca individual gerada no mesmo experimento não é necessário. Portanto, o rendimento final das bibliotecas geradas em experimentos separados pode variar um pouco.

Para alcançar uma ótima densidade de cluster, reúna volumes de bibliotecas iguais e quantifique o conjunto antes do sequenciamento.

Para entrada de DNA de 100-500ng:

- I. Combine 5µL de cada biblioteca (até 384 bibliotecas) em um tubo de microcentrifuga de 1,7mL.
- II. Vortex para misturar, e após centrifuge.
- III. Quantifique a biblioteca usando um método de fluorescência para DNA dupla fita, como Qubit ou PicoGreen.

Para entrada de DNA <100ng

- I. Quantifique cada biblioteca individualmente usando Qubit ou PicoGreen.

6- CHECAR A QUALIDADE DA BIBLIOTECA (OPCIONAL)

Laboratório de Bacteriologia – Gerência de Bacteriologia
 Laboratório de Estudos em Neuroinfecções e Resistência Bacteriana - LENRESB
 Fundação de Medicina Tropical Doutor Heitor Vieira Dourado – FMT-HVD
 Av. Pedro Teixeira, s/n
 Manaus - AM - Brasil CEP: 69.040-000
 Tel.: +55 92 2127-3454
 E-mail: lenresb.fmt@gmail.com



- I. Avalie a qualidade de 1 μ L da biblioteca ou de um pool de bibliotecas usando um dos seguintes métodos:
 - a. Adicione 1 μ L de RSB na biblioteca ou pool de bibliotecas, e após analise 2 μ L do volume usando o Analisador de Fragmento Analítico Avançado (Advanced Analytical Fragment Analyzer) com o kit HS-NGS High Sensitivity 474.
 - b. Analise 1 μ L da biblioteca usando o Agilent 2100 BioAnalyzer com um kit High Sensitivity DNA. As figuras a seguir mostram os perfis de tamanhos de bibliotecas com uma média de tamanho de fragmento de 600pb quando analisados com uma variação de tamanho de 150-1500pb.

Figure 2 Example Fragment Analyzer Trace

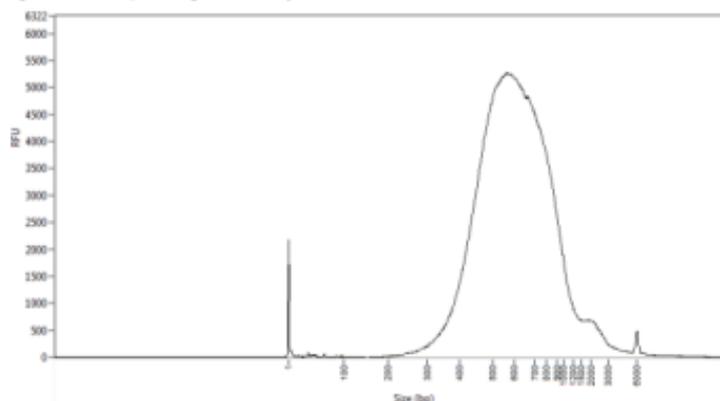
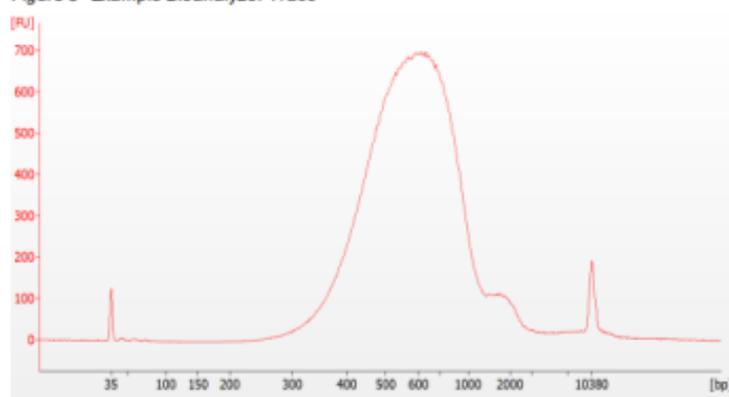


Figure 3 Example Bioanalyzer Trace



Anexo I: Certificado de capacitação em sequenciamento de nova geração pela plataforma *Illumina* no Instituto de Medicina Tropical da Faculdade de Medicina de São Paulo (IMT/SP).



CERTIFICADO

Certificamos que **Ewerton da Silva Ferreira** participou da capacitação para sequenciamento NGS pela tecnologia Illumina, realizado de 28 de novembro a 09 de dezembro de 2022 no Laboratório de Genética Aplicada à Doenças Infecciosas do Instituto de Medicina Tropical da Faculdade de Medicina da USP, com carga horária de 80 h (oitenta horas).

São Paulo, 09 de dezembro de 2022.



Prof.ª Dr.ª Ester Cerdeira Sabino