



CARLA APARECIDA TAVARES RIMERIO

“DETECÇÕES MOLECULARES DE INFECÇÕES HERPÉTICAS EM  
PACIENTES IMUNOCOMPETENTES COM DISFUNÇÕES  
NEUROLÓGICAS”

CAMPINAS  
2015





---

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
Faculdade de Ciências Médicas

CARLA APARECIDA TAVARES RIMERIO

“DETECÇÕES MOLECULARES DE INFECÇÕES HERPÉTICAS EM  
PACIENTES IMUNOCOMPETENTES COM DISFUNÇÕES NEUROLÓGICAS”


ORIENTAÇÃO: PROF<sup>a</sup>. DR<sup>a</sup>. SANDRA HELENA ALVES BONON

CO-ORIENTAÇÃO: PROF<sup>a</sup>. DR<sup>a</sup>. ANAMARLI NUCCI

CO-ORIENTAÇÃO: PROF<sup>a</sup>. DR<sup>a</sup>. SANDRA CECÍLIA BOTELHO COSTA

Tese de Doutorado apresentada à Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP para obtenção de título de Doutora em Clínica Médica na área de concentração de Clínica Médica.

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À  
VERSÃO FINAL DA TESE DEFENDIDA POR  
CARLA APARECIDA TAVARES RIMERIO, E  
ORIENTADA PELA PROF<sup>a</sup>. DR<sup>a</sup>. SANDRA  
HELENA ALVES BONON



---

Assinatura da Orientadora

CAMPINAS  
2015

Ficha catalográfica  
Universidade Estadual de Campinas  
Biblioteca da Faculdade de Ciências Médicas  
Maristella Soares dos Santos - CRB 8/8402

R463d Rimerio, Carla Aparecida Tavares, 1981-  
Detecções moleculares de infecções herpéticas em pacientes  
imunocompetentes com disfunções neurológicas / Carla Aparecida Tavares  
Rimerio. – Campinas, SP : [s.n.], 2015.

Orientador: Sandra Helena Alves Bonon.  
Coorientadores: Anamarli Nucci e Sandra Cecilia Botelho Costa.  
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de  
Ciências Médicas.

1. Herpesviridae. 2. Reação em cadeia da polimerase. 3. Líquido  
cefalorraquidiano. 4. Sistema nervoso. 5. Plasma. I. Bonon, Sandra Helena Alves.  
II. Nucci, Anamarli, 1947-. III. Costa, Sandra Cecilia Botelho, 1951-. IV.  
Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. V. Título.

Informações para Biblioteca Digital

**Título em outro idioma:** Molecular detection of herpetic infections in immunocompetent patients with neurological disorders

**Palavras-chave em inglês:**

Herpesviridae

Polymerase chain reaction

Cerebrospinal fluid

Nervous system

Plasma

**Área de concentração:** Clínica Médica

**Titulação:** Doutora em Clínica Médica

**Banca examinadora:**

Sandra Helena Alves Bonon [Orientador]

Ana Beatriz Rossetti Santos

Victor Hugo Aquino Quintana

Mônica Barbosa de Melo

Afonso Celso Vigorito

**Data de defesa:** 17-06-2015

**Programa de Pós-Graduação:** Clínica Médica

---

## BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE DOUTORADO

CARLA APARECIDA TAVARES RIMERIO

---

ORIENTADOR(A): PROF(A). DR(A). SANDRA HELENA ALVES BONON

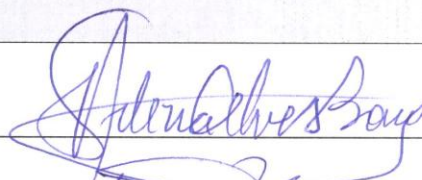
COORDENADOR(A): PROF(A). DR(A). ANAMARLI NUCCI E PROF(A). DR(A). SANDRA CECILIA BOTELHO COSTA

---

---

### MEMBROS:

1. PROF(A). DR(A). SANDRA HELENA ALVES BONON



2. PROF(A). DR(A). VICTOR HUGO AQUINO QUINTANA




3. PROF(A). DR(A). ANA BEATRIZ ROSSETTI SANTOS



4. PROF(A). DR(A). MÔNICA BARBOSA DE MELO



5. PROF(A). DR(A). AFONSO CELSO VIGORITO



---

Programa de Pós-Graduação em Clínica Médica da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

---

Data: 17 de junho de 2015

---



Currently, immunocompetent and elderly patients are receiving more attention in relation to viral infections. Reactivation of herpesviruses may eventually occur in the nervous system and the absence of adequate treatment can cause sequels. The standard for laboratorial confirmation of the presence of herpesvirus DNA in the nervous system is PCR in the cerebrospinal fluid (CSF). In this study, it was also used plasma as a sample test. The aim was to determine the incidence of herpesviruses in patients with suspect of virus infections of the nervous system using nested PCR in cerebrospinal fluid and compare the results with nested PCR performed on DNA extracted from plasma, by checking the correlation between them. The study included 52 samples of CSF and plasma from 52 immunocompetent patients with clinical symptoms of disorders in the nervous system. Clinical data were obtained from the information contained in the medical records. As a result, in 27/52 (52%) patients, herpesvirus DNA was detected at least once in CSF samples by nested PCR. These samples, 15/27 (55%) had initial diagnosis of encephalitis. The occurrence of monoinfection was 10/27 (37%) patients. Coinfection occurred in 17/27 (63%) positive patients. The most prevalent viruses found were Epstein-Barr virus and human cytomegalovirus, with 12/27 (44%) and 15/27 (55%), respectively. A patient with initial hypothesis of encephalitis that was positive for these two viruses died due to acute respiratory failure, epilepsy and encephalitis. Herpesvirus simplex 1 was observed in 5/27 (18%); herpesvirus simplex 2 in 2/27 (7%); varicella-zoster, 3/27 (11%); herpesvirus 6, 10/27 (37%) and herpesvirus 7, 9/27 (33%). Herpesvirus 8 was not detected. In DNA samples extracted from plasma, herpesviruses were positive in 32/52 (61%). Monoinfection occurred in 13/32 (41%) and coinfection occurred in 19/32 (59%). Herpesvirus simplex 1 occurred in 1/32 (3%); herpesvirus simplex 2 in 2/32 (6%); Epstein-Barr 5/32 (16%); human cytomegalovirus in 11/32 (34%); herpesvirus 6 in 7/32 (22%); herpesvirus 7 in 5/32 (16%) and herpesvirus 8 in 1/32

(3%). Using McNemar's test for analysis of agreement between the tests performed with DNA samples extracted from CSF with the plasma were observed that for herpesvirus 1, 2, Epstein-Barr, cytomegalovirus, herpesvirus type 6 and 7 positive studied, there was no statistically significant difference between the tests. For VZV and HHV-8 herpesvirus, could not be assessed due to the low number of positive cases. The qualitative detection of herpesvirus DNA in plasma by nested PCR can be as useful as the detection of CSF over time to identify patients with neurological disorders caused by these viruses, both immunocompetent as immunocompromised. Therefore, in this study it was seen the role human herpesvirus infections play in the nervous system in immunocompetent patients, focusing on diagnoses of viral infection in the central and peripheral nervous system. With the detection of viral DNA, early antiviral therapy may be institute for the virus that are antivirals available. Evaluating the efficiency of laboratorial diagnostic methods based on detection of DNA of the herpesvirus in the plasma, values obtained can be considered in relation to specificity, as well as the true negative values can be detected and empiric treatment can be avoided. These findings suggest that even occurring false negative results, this test can be used in patients who have problems related to the collection of CSF.



Atualmente, pacientes imunocompetentes e idosos estão recebendo maior atenção em relação às infecções virais. A reativação dos herpesvírus pode ocorrer eventualmente no sistema nervoso e a ausência de tratamento adequado pode causar sequelas. O teste padrão para a confirmação laboratorial da presença do DNA dos herpesvírus no sistema nervoso é a PCR no líquido e, neste trabalho utilizamos também o plasma como amostra-teste. Nosso objetivo foi determinar a incidência dos herpesvírus em pacientes com suspeita de infecções no sistema nervoso utilizando a nested PCR no líquido e comparar os resultados obtidos com a nested PCR realizada em DNA extraído de plasma, verificando a concordância entre eles. Foram incluídos no estudo 52 amostras de líquido e 52 amostras de plasma de pacientes imunocompetentes com sintomas clínicos de distúrbios no sistema nervoso. Os dados clínicos foram obtidos a partir das informações constantes dos prontuários médicos. Como resultados, em 27/52 (52%) pacientes, o DNA dos herpesvírus foi detectado pelo menos uma vez nas amostras de líquido pela nested PCR. Destas amostras 15/27 (55%) tinham hipótese diagnóstica inicial de encefalite. A ocorrência de monoinfecção foi de 10/27 (37%) dos pacientes. Coinfecção ocorreu em 17/27 (63%) dos pacientes positivos. Os vírus mais encontrados foram o Epstein-Barr e o citomegalovírus humano, com 12/27 (44%) e 15/27 (55%), respectivamente. Um paciente com hipótese inicial de encefalite que apresentou positividade para estes dois vírus foi a óbito por insuficiência aguda respiratória, epilepsia e encefalite. O Herpesvírus 1 foi observado em 5/27 (18%); herpesvírus 2 em 2/27(7%); varicela-zoster, 3/27 (11%); herpesvírus 6, 10/27 (37%) e herpesvírus 7, 9/27 (33%). O Herpesvírus 8 não foi detectado. Nas amostras de DNA extraído de plasma, a positividade para os herpesvírus foi de 32/52 (61%). Monoinfecção ocorreu em 13/32 (41%) e coinfecção ocorreu em 19/32 (59%). Herpesvírus tipo 1 ocorreu em 1/32 (3%); herpesvírus 2 em 2/32 (6%); Epstein-Barr em 5/32 (16%); citomegalovírus humano em 11/32 (34%);

herpesvírus tipo 6 em 7/32 (22%); herpesvírus 7 em 5/32 (16%) e herpesvírus 8 em 1/32 (3%). Utilizando o teste de McNemar para análise de concordância entre os exames realizados com amostras de DNA extraídas de líquido com as de plasma, observamos que para os herpesvírus 1, 2, Epstein-Barr, citomegalovírus, herpesvírus tipos 6 e 7 positivos estudados, não houve diferença estatisticamente significativa entre os testes. Para os herpesvírus VZV e HHV-8, não foi possível avaliar, devido ao baixo número de casos positivos. A detecção qualitativa do DNA dos herpesvírus no plasma por nested PCR pode ser tão útil quanto a detecção do líquido ao longo do tempo para identificar os pacientes que apresentam distúrbios neurológicos causados por esses vírus, tanto imunocompetentes quanto imunodeprimidos. Sendo assim, neste estudo verificamos o papel que os herpesvírus humanos desempenham nas infecções do sistema nervoso em pacientes imunocompetentes, com foco nas hipóteses diagnósticas de infecção viral no sistema nervoso central e periférico. Com a detecção do DNA viral, o tratamento antiviral precoce poderá ser instituído para os vírus ao qual existem antivirais disponíveis. Avaliando a eficiência dos métodos de diagnóstico laboratorial baseado na detecção do DNA dos herpesvírus no plasma, os valores obtidos podem ser considerados em relação à especificidade, assim como os valores verdadeiros negativos podem ser detectados e o tratamento empírico pode ser evitado. Esses achados sugerem que mesmo ocorrendo resultados falsos negativos, este teste poderá ser utilizado nos pacientes que enfrentam problemas relacionados à coleta do líquido.

---

1. INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJETIVOS.....	4
2.1. Objetivo geral.....	4
2.2. Objetivos específicos.....	4
3. REVISÃO DA LITERATURA.....	5
3.1. Taxonomia dos herpesvírus.....	5
3.2. Características biológicas dos herpesvírus humanos.....	5
3.3. Estrutura geral dos herpesvírus.....	7
3.4. Ciclo de replicação dos herpesvírus.....	7
3.5. Mecanismo de infecção dos herpesvírus.....	9
3.6. Herpesvírus Simplex (1 e 2) e Varicela Zoster (VZV).....	9
3.6.1. Herpesvírus Simplex 1.....	9
3.6.2. Herpes Simplex 2.....	13
3.6.3. Varicela Zoster (VZV) .....	14
3.7. Epstein -Barr Vírus (EBV) .....	17
3.8. Citomegalovírus Humano (HCMV), Herpesvírus 6 e 7 (HHV-6 e HHV-7) .....	21
3.8.1. Citomegalovírus Humano.....	21
3.8.2. Herpesvírus tipo 6 (HHV- 6) .....	23
3.8.2.1. Integrações do HHV-6 no cromossomo humano .....	27
3.8.3. Herpesvírus tipo 7 (HHV- 7).....	28
3.9. HHV-8 ou Vírus causador do Sarcoma de Kaposi (KSHV).....	29
3.10. Líquido Cefalorraquidiano .....	34
3.11. Diagnósticos de infecções virais no Sistema Nervoso.....	38
3.12. Tratamento das infecções virais.....	41
3.13. Diagnóstico das infecções herp[éticas no sistema nervoso.....	44
3.14. Infecção ativa por herpesvírus humanos em indivíduos imunocompetentes.....	46

4.CASUÍSTICAS E MÉTODOS.....	47
4.1. Casuística .....	47
4.1.1. Desenho do estudo.....	47
4.1.2. Critérios para inclusão dos pacientes .....	48
4.1.3. Critério para definição de infecção ativa causada pelos Herpesvírus..	48
4.1.4. Critérios para Exclusão ou encerramento.....	48
4.2. Avaliações clínicas e classificação do quadro neurológico.....	49
4.3. Análise crítica de riscos e benefícios.....	49
4.4. Métodos.....	50
4.4.1. Extração de DNA de plasma e de LCR e reação em cadeia da polimerase.....	51
4.4.2. Detecção do DNA do gene da beta 2-microglobulina humana.....	52
4.4.3. Detecção dos DNA dos genes dos Herpesvirus humanos pela reação em cadeia da polimerase tipo Nested.....	52
4.4.3.1. Nested PCR para detecção do DNA do HSV-1 .....	53
4.4.3.2. Nested PCR para detecção do DNA do HSV-2.....	53
4.4.3.3. Nested PCR para detecção do DNA do VZV.....	53
4.4.3.4. Nested PCR para detecção do DNA do EBV.....	54
4.4.3.5. Nested PCR para detecção do DNA do HCMV.....	54
4.4.3.6. Nested PCR para detecção do DNA do HHV-6 (tipo A e B).....	55
4.4.3.7. Nested PCR para detecção do DNA do HHV-7.....	55
4.4.3.8. Nested PCR para detecção do DNA do HHV-8.....	55
4.5. Sequenciamento .....	57
4.5.1. Purificação.....	57
4.5.2. Reação de sequenciamento.....	57
4.6. Características clínicas e laboratoriais.....	58
4.7. Análises estatísticas.....	58
4.8. Cuidados especiais para evitar contaminação das amostras durante a reação da PCR.....	59
4.9. Biossegurança.....	59

5. RESULTADOS.....	61
5.1. Características dos pacientes, dados clínicos e resultados da pesquisa do DNA dos HHV nos pacientes estudados.....	63
5.2. Sintomas de alterações neurológicas apresentadas pelos pacientes com DNA de HHV positivos pela nested PCR no LCR.....	63
5.3. Proporção de pacientes com DNA de HHV negativos no LCR e associação entre a idade e sexo com infecções do vírus herpes no sistema nervoso dos pacientes imunocompetentes estudados.....	64
5.4. Achados de exames EEG, TC e RM do cérebro de pacientes com DNA de HHV positivos.....	65
5.5 Resultados laboratoriais Citológicos e Bioquímicos no LCR.....	66
5.6.Avaliação do teste de nested PCR em amostras de DNA extraídas de plasma pareadas com as amostras de LCR dos pacientes.....	67
5.7. Correlação entre os resultados da nested PCR realizada nas amostras de DNA extraído de plasma com as amostras de DNA de LCR como referência padrão.....	70
5.8. Casos de óbitos ocorridos nos pacientes.....	72
5.9.Resultados do sequenciamento dos fragmentos de DNA dos herpesvírus humanos amplificados.....	73
5.10. Resultados das amplificações dos fragmentos da nested PCR para todos os HHV analisados. Fotos dos géis de eletroforese.....	77
6. DISCUSSÃO.....	81
7. CONCLUSÃO.....	93
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	96
Anexo1.Regulamento do laboratório de diagnóstico de doenças infecciosas por técnicas de biologia molecular e antigenemia, FCM-UNICAMP quanto ao armazenamento e utilização de material biológico humano.....	127
Anexo 2. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).....	129
Anexo 3. Parecer Comitê de Ética.....	132

Anexo 4. <b>ARTIGO PUBLICADO:</b> Human <i>Herpesvirus</i> Infections of the Central Nervous System: Laboratory Diagnosis based on DNA Detection by Nested PCR on Plasma and Cerebrospinal Fluid Samples.....	134
Anexo 5. Descrições de todos os casos estudados para herpesvírus pela Reação em Cadeia da Polimerase (n=52).....	142

## *Dedicatória*

---

*"Para realizar grandes conquistas devemos não apenas agir  
mas também sonhar; não apenas planejar, mas também  
acreditar."*

*(Anatole France)*

Dedico este trabalho a minha querida orientadora que não está na minha vida por acaso, e que muito me ajudou na realização desta conquista....





# Agradecimentos

---

Quero agradecer primeiramente a Deus por todas as minhas conquistas, pois sem as suas bênçãos eu não poderia alcançar meus objetivos, quero agradecer também por todas as pessoas que o senhor me enviou que me ensinaram muito no decorrer da minha vida...

Ao meu querido esposo José Roberto Rimério Júnior por ser meu grande companheiro, amigo e patrocinador. Não tenho palavras para expressar meu profundo agradecimento a você...

Ao meu filho José Roberto Rimério Neto e a minha filha Maria Laura Tavares Rimério pela oportunidade de ser mãe, sentir e viver a mais pura forma de amor, e por ocupar um lugar especial em meu coração. Amo vocês...

Os meus pais Carlos Lúcio e Lúcia por serem exemplos de dedicação e de vida, por muitas vezes abrirem mão dos próprios sonhos para poderem me ajudar na realização dos meus, por serem os maiores responsáveis por tudo que sou...

Ao meu querido irmão Heleno, que mesmo em seu mundinho sempre ilumina meu caminho com todo seu amor e saiba que nunca medirei esforços para te proteger e ajudar...

Ao meu irmão Jonas e minha cunhada Gisele pelo incentivo e aos meus queridos sobrinhos Sofia e Heitor...

Ao meu sogro Roberto e minha sogra Berenice pela ajuda incondicional e pela dedicação aos meus filhos, sem isso não seria possível à conclusão deste trabalho...

À minha querida orientadora Sandra Helena Alves Bonon, que sempre me estimulou e ajudou muito na realização desta tese. Muito obrigada pela oportunidade de desenvolver um trabalho como esse, por estar ao meu lado sempre que preciso e por partilhar todo o seu conhecimento e experiência. Nada disso seria possível sem a sua primorosa e rica orientação.

Às professoras e Doutoradas Ana Marli Nucci e Sandra Cecília Botelho Costa, por todo o aprendizado que me proporcionaram, e por me fazer crescer como pessoa e como profissional. Obrigada por agregar conhecimento

Aos meus amigos de trabalho, Paula Telles, Andreia Gulin, Rodrigo Lima, Thamires Fajardo, Priscila Mompean, Liriam Samejima, Stella V. Torres, Talita Dellariva, Silvia Menoni e Caroline Baldi, por proporcionarem um ótimo ambiente de trabalho, de aprendizado e porque não de diversão. Fico extremamente feliz de tê-los conhecido e de partilhar esse momento com vocês.

Um obrigado muito especial aos meus grandes amigos, Murilo Queiroz de Almeida Bonatelli e Renato Souza de Oliveira que prestaram valiosa ajuda na parte técnica. Obrigado por estarem ao meu lado todos esses anos, dividirem os momentos de alegrias e tristezas, e por acreditarem que eu poderia chegar até aqui.

*Posso ter defeitos viver ansioso e ficar irritado algumas vezes  
Mas não esqueço de que minha vida  
É a maior empresa do mundo..  
E que posso evitar que ela vá à falência.  
Ser feliz é reconhecer que vale a pena viver  
Apesar de todos os desafios incompreensões e períodos de crise.  
Ser feliz é deixar de ser vítima dos problemas e  
Se tornar um autor da própria história..  
É atravessar desertos fora de si mas ser capaz de encontrar  
Um oásis no recôndito da sua alma..  
É agradecer a Deus a cada manhã pelo milagre da vida.  
Ser feliz é não ter medo dos próprios sentimentos.  
É saber falar de si mesmo.  
É ter coragem para ouvir um "Não" !!!  
É ter segurança para receber uma crítica  
Mesmo que injusta..  
  
Pedras no caminho?  
Guardo todas um dia vou construir um castelo..*

*(Fernando Pessoa)*



## *Lista de Tabelas*

---

<b>Tabela 1</b> -Características Clínicas das Infecções por Herpesvírus Humanos...	6
<b>Tabela 2</b> - Manifestações neurológicas mais comuns de infecções causadas pelos Herpesvírus.....	34
<b>Tabela 3</b> - Indicações do exame de LCR, segundo a AAN.....	35
<b>Tabela 4</b> - LCR- Valores de Referências.....	37
<b>Tabela 5</b> - Recomendações para o Uso de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para o diagnóstico de Sistema Nervoso (SN) nas infecções virais.....	40
<b>Tabela 6</b> - Sequência de primers que flanqueiam uma região conservada do gene da $\beta$ 2 - Microglobulina utilizados na PCR.....	52
<b>Tabela 7</b> - Sequência de primers que flanqueiam regiões conservadas dos genes para detecção do DNA dos herpesvírus humanos (utilizados na PCR e nested PCR.....	56
<b>Tabela 8</b> - Características dos pacientes, hipótese clínica inicial e infecções positivas e negativas causadas pelos HHV detectada pela nested PCR no LCR.....	62
<b>Tabela 09</b> - Resultados de DNA de HHV em monoinfecções e coinfeções em pacientes com encefalites e não-encefalites.....	63
<b>Tabela 10</b> - Hipóteses neurológicas, sintomas e detecção do DNA do HHV no LCR pela nested PCR.....	64
<b>Tabela 11</b> - Resultados dos exames laboratoriais e de imagem do SNC em relação aos 27 pacientes com DNA de HHV positivos.....	66
<b>Tabela 12</b> - Resultados de DNA de HHV positivos no LCR de pacientes com hipóteses neurológicas (27/52 pacientes).....	68
<b>Tabela 13</b> - Resultados de DNA de HHV positivos no PLASMA de pacientes com hipóteses neurológicas (32/52 pacientes).....	69
<b>Tabela 14</b> - Comparação entre os testes de nested PCR realizados no DNA extraído do LCR em relação ao nested PCR utilizando DNA extraído do plasma.....	71

**Tabela 15.** Comparação entre infecção por HHV detectada com nested PCR em amostras de LCR e plasma..... 72

## *Lista de Figuras*

---

<b>Figura 1</b> - A Família <i>Herpesviridae</i> .....	5
<b>Figura 2</b> - Representação esquemática dos Herpesvírus.....	7
<b>Figura 3</b> - Visão geral de um ciclo de replicação viral hipotético.....	8
<b>Figura 4</b> - Estrutura do HSV-1.....	10
<b>Figura 5</b> - Latência e reativação do HSV.....	11
<b>Figura 6</b> - Sítio de Latência do VZV.....	16
<b>Figura 7</b> - Infecção dos linfócitos B pelo vírus EBV.....	19
<b>Figura 8</b> - Manifestações Clínicas do EBV.....	20
<b>Figura 9</b> - Célula Citomegálica.....	21
<b>Figura 10</b> - Herpesvírus Humano tipo 6.....	24
<b>Figura 11</b> - Etapas da história natural da infecção por HHV-6.....	26
<b>Figura 12</b> - Estrutura tridimensional do HHV-8.....	30
<b>Figura 13</b> - Lesões provocadas pelo HHV-8.....	33
<b>Figura 14</b> - Herpesvírus Simples 1 (HSV-1).....	74
<b>Figura 15</b> - Herpesvírus Simples 2 (HSV-2).....	74
<b>Figura 16</b> - Varicella Zoster Vírus (VZV).....	74
<b>Figura 17</b> - Epstein-Barr Vírus (EBV).....	75
<b>Figura 18</b> - Citomegalovírus Humano (HCMV).....	75
<b>Figura 19</b> - Herpesvírus 6, tipo B (HHV-6 B).....	75
<b>Figura 20</b> - Herpesvírus 7 (HHV-7).....	76
<b>Figura 21</b> - Herpesvírus 8 (HHV-8).....	76
<b>Figura 22</b> - Amplificação do fragmento do HSV-1.....	77
<b>Figura 23</b> - Amplificação do fragmento do HSV-2.....	77
<b>Figura 24</b> - Amplificação do Fragmento do VZV.....	78
<b>Figura 25</b> - Amplificação do fragmento do EBV.....	78
<b>Figura 26</b> - Amplificação do fragmento do HCMV.....	79
<b>Figura 27</b> - Amplificação do fragmento do HHV-6 B.....	79
<b>Figura 28</b> - Amplificação do fragmento do HHV-7.....	80

**Figura 29** - Amplificação do fragmento do HHV-8.....80



## *Lista de Abreviaturas*

---

$\alpha$	Alfa
$\beta$	Beta
$\gamma$	Gama
°C	Grau Celsius
%	Símbolo de porcentagem
<	Menor que
>	Maior que
5' → 3'	Sentido de transcrição
$\mu$ L	Microlitro
$\mu$ g	Micrograma
mL	Mililitro
A	Adenina
a.C	Antes de Cristo
AAN	Academia Americana de Neurologia
Anti-VCA	Anticorpos IgM (VCA)
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
C	Citosina
CD4+	Linfócitos T CD4+
CD46	Componente essencial receptor membrana
DMC	Doença Multicêntrica de Castleman
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DNTP	Desoxirribonucleotídeos fosfatados
DR	Repetições terminais diretas
DST	Doença sexualmente transmissível
EBNAs	Proteínas do antígeno nucleares
EBV	Epstein-Barr Vírus
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
EEG	Eletroencefalografia
EM	Esclerose múltipla
EPC	Equipamento de proteção coletiva

EPI	Equipamento de proteção individual
ES	Exantema súbito
ExoSap-It	Exonuclease I e fosfatase alcalina de camarão
F	Feminino
FCM	Faculdade de Ciências Médicas
FDA	Food and Drugs administration
GVHD	Doença do enxerto contra o hospedeiro
HBLV	Vírus Linfotrópicos de células B humanas
HC	Hospital das Clínicas
HCMV	Citomegalovírus humano
HHV ou HHVs	Herpesvírus Humano
HHV-3	Herpesvírus humano 3
HHV-4	Herpesvírus humano 4
HHV-5	Herpesvírus humano 5
HHV-6 A	Herpesvírus humano 6 tipo A
HHV-6 B	Herpesvírus humano 6 tipo B
HHV-7	Herpesvírus humano 7
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
HSV	Herpesvírus simplex
HSV-1	Herpesvírus simplex 1
HSV-2	Herpesvírus simplex 2
HVS	Herpesvírus Saimiri
ICTV	Cômite Internacional de Taxonomia dos Vírus
Ig G	Imunoglobulina G
Ig M	Imunoglobulina M
Kb	Kilo bases
KSHV	Herpesvírus associado ao Sarcoma de Kaposi
L	Componente longo
LAT	Latência associada a transcritos
LB	Linfoma de Burkitt's
LCR	Líquido Cefalorraquidiano
LEP	Linfoma de efusão primária

M	Masculino
MB	Meduloblastoma
mg/dL	Miligramas por decilitros
MI	Mononucleose Infecciosa
MM	Mieloma Múltiplo
MMC's	Células mononucleares do sangue
NK	Célula natural killer
nM	Nanomolar
N-PCR	Reação em cadeia da polimerase tipo Nested
NR's	Normas Regulamentadoras
OMS	Organização Mundial da Saúde
ORF's	Open Reading Frames
pb	Pares de base
PBMCS	Células mononucleares do sangue periférico
PBS	Tampão fosfato salino
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PEL'S	Linfoma de efusão primária
<i>pp65</i>	Antígeno do citomegalovírus
<i>p-value</i>	Valor de p
RI	Repetitivos internos
RNA	Ácido ribonucléico
RNAm	Ácido ribonucleico mensageiro
RNM	Ressonância Magnética
RPM	Rotação por minuto
S	Componente curto
SIDA	Síndrome da imunodeficiência adquirida
SK	Sarcoma de Kaposi
SN	Sistema Nervoso
SNC	Sistema Nervoso Central
SNP	Sistema Nervoso Periférico
SPSS	Statistical package for the social sciences
T	Timina

<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
TC	Tomografia computadorizada
TMO	Transplante de Medula Óssea
TR	Repetitivos terminais
U	Região central única
U94	Proteína tegumento U 94
UER	Unidade de emergência referenciada
UL32	Proteína tegumento U32
UL82	Proteína tegumento U82
UL83	Proteína tegumento U83
Unicamp	Universidade Estadual de Campinas
VZV	Varicela Zoster Vírus

# 1. *Introdução*

Os Herpesvirus Humanos (HHV) causam várias doenças agudas, subagudas e crônicas no sistema nervoso central (SNC) e periférico (SNP), tanto em adultos como em crianças. Ambos os indivíduos imunocompetentes e imunocomprometidos podem ser afetados (1, 2, 3). Nas últimas décadas, devido à utilização de técnicas de diagnóstico sensíveis e precoces de infecção ativa com a detecção do DNA viral, o uso da técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR) no líquido cefalorraquidiano (LCR) e em tecidos tem se mostrado muito útil para os clínicos e patologistas (4, 5).

Membros da família *Herpesviridae* são produtores de infecções que acometem o sistema nervoso (SN) com maior frequência em comparação com as bactérias, leveduras e protozoários (6,7,8). Todos os herpesvírus apresentam algum tipo de neurotropismo, seja por disseminação hematogênica ou transmissão neuronal (9).

As manifestações clínicas das doenças virais em indivíduos imunocompetentes podem ser diferentes da população de imunocomprometidos (10). O quadro clínico de indivíduos com infecção do SN por vírus apresenta-se em graus variáveis, dependendo das características do agente e/ou do hospedeiro (11). Nos quadros de encefalite, os pacientes evoluem a partir dos sintomas iniciais, com alterações do estado de consciência, excitação, comportamento anormal e deterioração de funções mentais (12). Clinicamente, isto se reflete na clássica téttrade clínica da encefalite: cefaléia, febre, vômitos e déficit neurológico (13).

No Brasil, em média, são notificados 11.500 casos/ano de meningite de provável etiologia viral. Entretanto, na maioria dos casos, não há identificação do agente etiológico (14). Estabelecer o agente etiológico das infecções de SN permanece um desafio. Vários fatores devem ser analisados e os sinais e

sintomas associados são dados que também auxiliam no estreitamento das possibilidades diagnósticas (13), portanto, torna-se imperativo aumentar os esforços para melhorar os testes diagnósticos (15).

Geralmente, o diagnóstico de doenças virais em indivíduos imunocompetentes é baseado em manifestações clínicas e exames laboratoriais. Um diagnóstico definitivo requer a detecção do vírus específico em amostras obtidas dos tecidos envolvidos, bem como amostras de sangue (soro/plasma) (16), ou mesmo evidências histopatológicas. O padrão ouro para o diagnóstico da maioria das doenças virais é encontrar características histopatológicas específicas e detecção do vírus nos tecidos envolvidos. No entanto, a biópsia é muitas vezes inviável (16, 17).

A PCR de LCR tem revolucionado o diagnóstico de infecções virais do SN, particularmente aquelas causadas por HHV (18, 19, 20). É um método acessível, de alta sensibilidade e especificidade (94 e 98% respectivamente) e contribui para auxiliar no diagnóstico, substituindo as incertezas e evitando assim a biópsia no cérebro, que é considerada bastante invasiva (21). A apresentação clínica e os achados na ressonância magnética (RM) geralmente completam o diagnóstico.

A verdadeira frequência da infecção causada pelos HHV no sistema nervoso (SN) em hospedeiros imunocompetentes e em idosos é agora melhor estudada com a utilização da PCR no LCR. O uso da nested PCR no DNA extraído de plasma pode também ser utilizado para detectar o DNA de HHV, principalmente em pacientes que apresentem contra-indicação na punção (22).

É de fundamental importância lembrar-se da possibilidade etiológica da encefalite herpética, confirmar a suspeita diagnóstica através de uma combinação de dados clínicos e exames complementares, a fim de instituir um tratamento precoce e adequado.

O presente estudo indica que a nested PCR pode ser uma ferramenta potencialmente útil para a confirmação diagnóstica da infecção no sistema nervoso causada pelos herpesvírus e sugere que estes vírus podem ser um dos possíveis fatores causais das encefalites e de outras alterações neurológicas.

Apesar de existir alguns métodos comerciais para o diagnóstico viral, alguns ainda não estão disponíveis ou são muito caros para serem adquiridos. Neste estudo, não fizemos comparações com Kits comerciais disponíveis.

Em países em desenvolvimento, poucos dados são relatados sobre a detecção das infecções virais através da pesquisa de DNA viral pela metodologia da PCR no sistema nervoso (23,24). Por serem vírus que podem manter infecção latente, estudos adicionais são necessários para compreender melhor a patogênese destas viroses e sua associação com outras doenças em pacientes imunocompetentes. Com o avanço nas técnicas de detecção, a quantificação da carga viral através da PCR em Tempo Real é outro método que poderia ser utilizado, mas ainda não está disponível nos centros de atendimento e laboratórios de diagnóstico.

## *2. Objetivos*

### **2.1. OBJETIVO GERAL**

A principal meta do presente estudo é pesquisar a presença do DNA dos Herpesvírus Humano Simplex tipo 1 e 2 (HSV-1 e HSV-2), Herpesvírus Humano tipo 3 (Varicela Zoster - VZV), Herpesvírus Humano tipo 4 (Epstein-Barr vírus - EBV), Herpesvírus Humano tipo 5 (Citomegalovírus Humano - HCMV), Herpesvírus Humano tipo 6 e 7 (HHV- 6 e HHV- 7) e Herpesvírus Humano tipo 8 (HHV-8 ou Vírus Causador do Sarcoma de Kaposi) em amostras de plasma e de líquido cefalorraquidiano de pacientes imunocompetentes com sintomas de doença infecciosa no sistema nervoso central e periférico, utilizando a nested PCR;

### **2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Associar a positividade do DNA dos herpesvírus encontrados nas amostras dos pacientes com a manifestação clínica;
- Analisar monoinfecção e coinfeção causada pelos herpesvírus com a manifestação clínica de doença no sistema nervoso e com as alterações nos exames bioquímicos e de imagem convencionais;
- Avaliar a utilidade da técnica da nested PCR realizada em amostras de DNA extraídas de plasma e comparar os resultados obtidos com o teste utilizando as amostras de DNA extraídas de LCR.



## 3. Revisão da Literatura

### 3.1. TAXONOMIA DOS HERPESVÍRUS

O Comitê Internacional de Taxonomia dos vírus (ICTV) em 2008 dividiu a família matriz *Herpesviridae* em três famílias, as quais foram incorporadas na nova ordem *Herpesvirales*, sendo estas *Alloherpesviridae*, *Malacoherpesviridae* e *Herpesviridae* revisada. Desta forma, a última contém os vírus dos mamíferos e está subdividida em 3 subfamílias: *Alphaherpesvirinae* ( $\alpha$ -herpesvirinae), *Betaherpesvirinae* ( $\beta$ -herpesvirinae) e a *Gammaherpesvirinae* ( $\gamma$ -herpesvirinae) (25). Estas se distinguem pelas suas características virais e estruturais, bem como pelo seu poder patogênico (Figura 1).

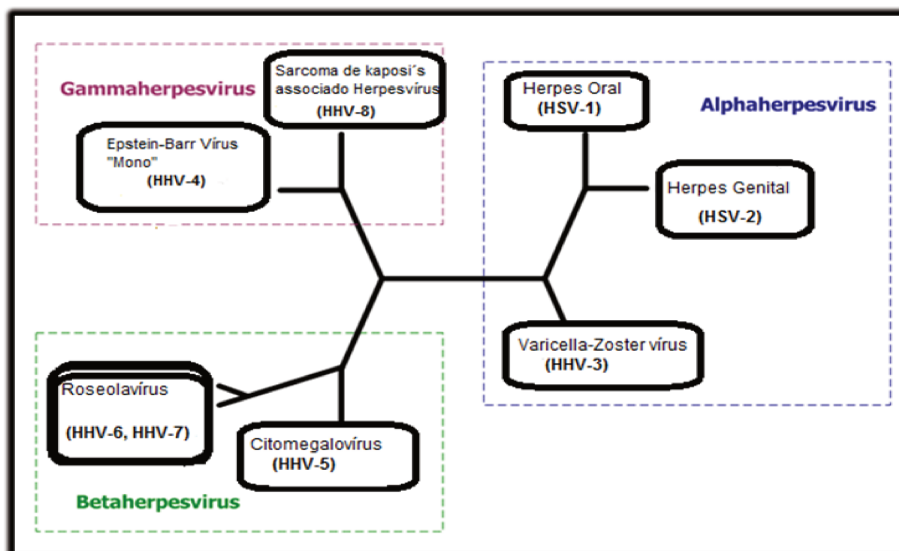


Figura 1: Família *Herpesviridae* (26).

### 3.2. CARACTERÍSTICAS BIOLÓGICAS DOS HERPESVÍRUS HUMANOS

Todos os tipos de vírus inseridos nesta família são vírus de DNA com cadeia dupla e os diferentes tipos de herpesvírus (HHV) partilham características estruturais semelhantes (6).

A principal característica dos herpesvírus é a sua capacidade de permanecer em estado latente ou persistente em seus hospedeiros e reativar-se

durante os períodos de imunodepressão relativa (27,28). Atualmente, há cerca de 100 herpesvírus descritos e com ampla disseminação na natureza; destes, oito infectam humanos (29). Na Tabela 1, é apresentada a lista de herpesvírus que infectam humanos (30,31).

**Tabela 1** - Características Clínicas das Infecções por Herpesvírus Humanos.

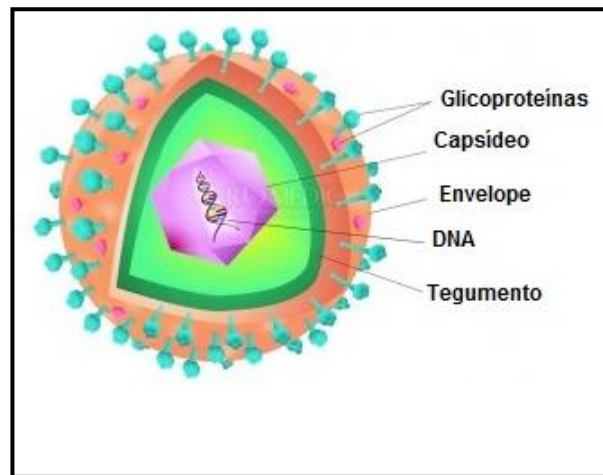
Nomes e Abreviações	Subfamílias	Células alvo primárias	Principais locais de latência	Transmissão	Manifestações Clínicas
<b>Herpesvírus simplex -1 (HSV-1)</b>	Alphaherpesvirinae ( $\alpha$ )	Mucoepitélio	Gânglio nervoso, sensorial e cranial	Contato próximo	Oral/e ou genital (Predominantemente orofacial)
<b>Herpesvírus simplex-2 (HSV-2)</b>	Alphaherpesvirinae ( $\alpha$ )	Mucoepitélio	Gânglio nervoso sensorial e cranial	Contato próximo e sexual	Oral/e ou genital (Predominantemente genital)
<b>Varicella-Zoster vírus (VZV)</b>	Alphaherpesvirinae ( $\alpha$ )	Mucoepitélio	Gânglios nervosos, sensorial e cranial	Vias respiratórias	Varicela e Herpes zoster
<b>Epstein-Baar vírus (EBV)</b>	Gammaherpesvirinae ( $\gamma$ )	Linfócitos B e Epitélio	Linfócitos B e Epitélio	Saliva	Mononucleose infecciosa, Linfoma de Burkitt e no SN
<b>Citomegalovírus Humano (HCMV)</b>	Betaherpesvirinae ( $\beta$ )	Epitélio, Monócitos e Linfócitos.	Monócitos, Linfócitos e outros	Contato próximo, transfusões sanguíneas, transplante e congênito.	Síndrome Mononucleose infecciosa e retinite
<b>Herpesvírus Humano-6 (HHV-6) (A) e (B)</b>	Betaherpesvirinae ( $\beta$ )	Linfócitos T e outros	Vários leucócitos	Vias respiratórias	<i>Doença Sexto</i> (Roséola infantum ou <i>Exantema súbito</i> )
<b>Herpesvírus Humano-7 (HHV-7)</b>	Betaherpesvirinae ( $\beta$ )	Linfócitos T e outros	Linfócitos T e outros	Desconhecido	(Roséola infantum ou <i>exantema súbito</i> )
<b>Herpesvírus Humano-8 (HHV-8) vírus associado ao Sarcoma de Kaposi</b>	Gammaherpesvirinae ( $\gamma$ )	Linfócitos e epitélios	Linfócitos B	Troca fluidos corporais	<i>Sarcoma de Kaposi</i> , Linfoma primário e alguns tipos de multicêntrica doença de Castleman

**Fonte:** Adaptação Grinde; Ryan e Ray (30,31).

### 3.3. ESTRUTURA GERAL DOS HERPESVÍRUS

A família dos herpesvírus apresentam nucleocapsídeo icosaédrico, constituído por 162 capsômeros arranjados ao redor da dupla cadeia de DNA; possui um tegumento proteico; e um envelope protolipídeo. Cada uma delas tem diferentes glicoproteínas de superfície em diferentes herpesvírus, que dão as características distintas para todos os vírus (9,32) (Figura 2).

Os seres humanos são os únicos reservatórios para eles (6). Os vetores costumam se espalhar pelo contato direto com as secreções infectadas por vírus de outros seres humanos, e raramente por transfusão de sangue e transplante de tecidos (33)

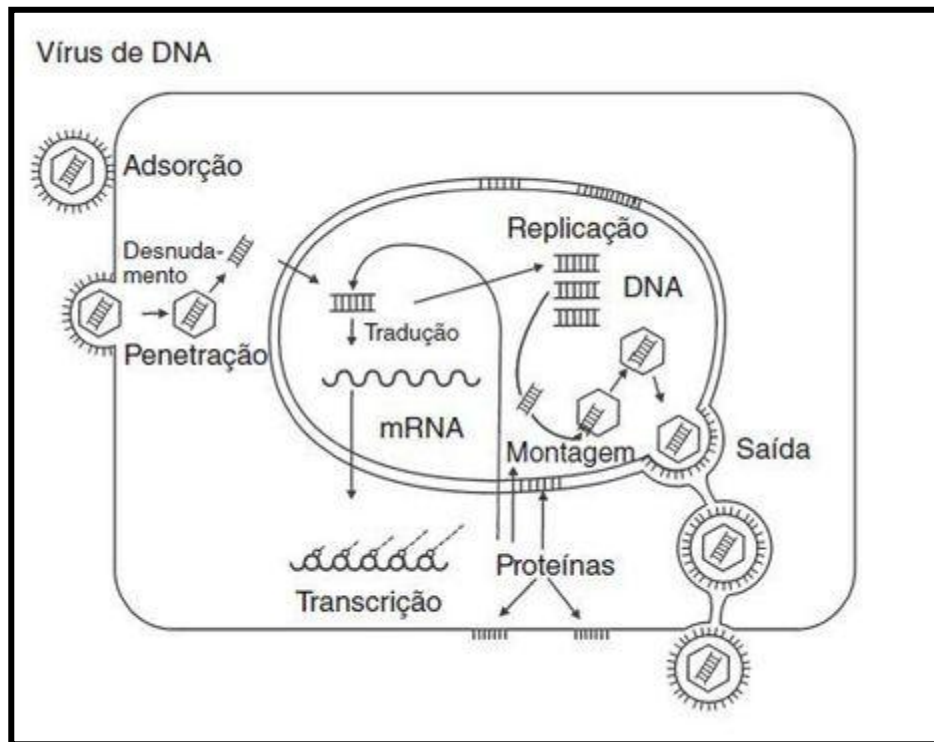


**Figura 2:** Representação esquemática dos Herpesvírus (34).

### 3.4. CICLO DE REPLICAÇÃO DOS HERPESVÍRUS

A replicação dos herpesvírus corresponde a um processo de várias etapas e sua descrição baseia-se na observação dos eventos que ocorrem na replicação do HHV (Figura 3). A replicação dos HHV é iniciada pela interação de glicoproteínas virais com receptores de superfície celular. O tropismo de alguns HHV é restrito devido à expressão de receptores tecido-específico. O núcleo capsídeo é liberado no citoplasma através da fusão do envoltório com a membrana plasmática. Enzimas e fatores de transcrição são transportados para o

interior da célula. O núcleo capsídeo fixa-se à membrana nuclear e libera o genoma no núcleo, onde é transcrito e replicado (35).



**Figura 3:** Visão geral de um ciclo de replicação viral hipotético: Adsorção; Entrada; Desnudamento; Transcrição e Tradução; Replicação do genoma; Montagem e Liberação (35).

A transcrição do genoma viral e a síntese de proteínas virais ocorrem de maneira coordenada e regulada em três fases:

1- Síntese de proteínas precoces imediatas (Alfa) que consistem em proteínas de ligação do DNA, importantes para a regulação da transcrição gênica.

2- Síntese de proteínas precoces (Beta), que consistem em fatores de transcrição e enzimas, incluindo a DNA polimerase.

3- Sínteses de proteínas tardias (Gama), constituída principalmente de proteínas estruturais (36).

O genoma viral é transcrito por RNA – polimerase celular DNA dependente, e regulado por fatores nucleares da célula hospedeira. A inter-relação

destes fatores determina se a infecção será lítica, persistente ou latente. As células que promovem infecção latente restringem a transcrição a genes específicos, sem replicação do genoma.

A replicação é realizada pela DNA polimerase codificada pelo vírus. A progressão para genes precoces e tardios resulta em morte celular e infecção lítica (36).

Os pró-capsídeos vazios organizam-se no núcleo onde são preenchidos com DNA. As glicoproteínas são sintetizadas e em seguida, difundem-se para a membrana nuclear. Os capsídeos contendo DNA brotam a partir de porções da membrana nuclear modificadas pelas glicoproteínas virais. O vírus brota do retículo endoplasmático e é transferido em uma vesícula para o complexo de Golgi, onde as glicoproteínas são processadas. O vírus abandona a célula por exocitose ou lise celular (36).

### **3.5. MECANISMO DE INFECÇÃO DOS HERPESVÍRUS**

A pele, a conjuntiva e a mucosa da orofaringe ou genitália são as locais de entrada primárias para HHV. Após a replicação no local da inoculação, eles costumam causar uma disseminação hematogênica, chamada de viremia, para tecidos distantes (6,37). Todos os herpesvírus mostram algum tipo de neurotropismo seja pela disseminação hematogênica ou transmissão neuronal (6). A neurovirulência do vírus de herpes é mediada pelo gene da timidina-quinase e os terminais do componente G (32). O gene  $\gamma_134.5$  é necessário para a replicação do vírus de herpes no tecido cerebral e previne a apoptose de células neuronais infectados (38).

### **3.6. HERPESVÍRUS SIMPLEX (1 e 2) e VARICELA ZOSTER (VZV)**

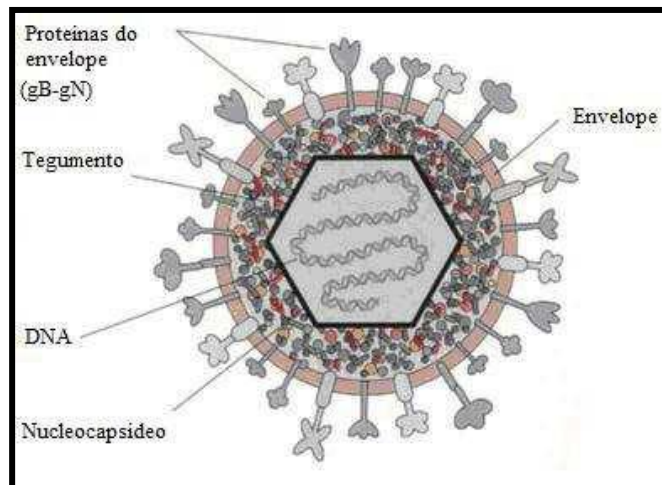
#### **3.6.1. HERPESVÍRUS SIMPLEX 1**

A subfamília *Alphaherpesvirinae* (HSV-1 e HSV-2) foram os primeiros vírus a serem descobertos. O vírus Herpes Simplex tipo 1 (HSV-1), também conhecido como Herpesvírus Humano tipo 1 (HHV-1), foi documentado pela

primeira vez pelo médico grego Hipócrates (460/377 a.C.), que o batizou de *herpes* (do latim *herpin*=rastejar, réptil) devido ao aspecto das lesões causadas pelo vírus, como vesículas no trato bucal, febre e ulcerações nos lábios (39). São considerados vírus neurotrópicos e estes são responsáveis por infecções agudas, não epidêmicas do SN, tendo como consequência a encefalite herpética, em que os vírus (principalmente o HSV-1) destroem o tecido nervoso do lobo frontal e temporal do cérebro, podendo causar também a meningite herpética (40).

Possui como características um ciclo de multiplicação curto, com rápida disseminação em cultura celular, capacidade de lisar as células infectadas e estabelecer latência após as infecções primárias (Figura 4) (41).

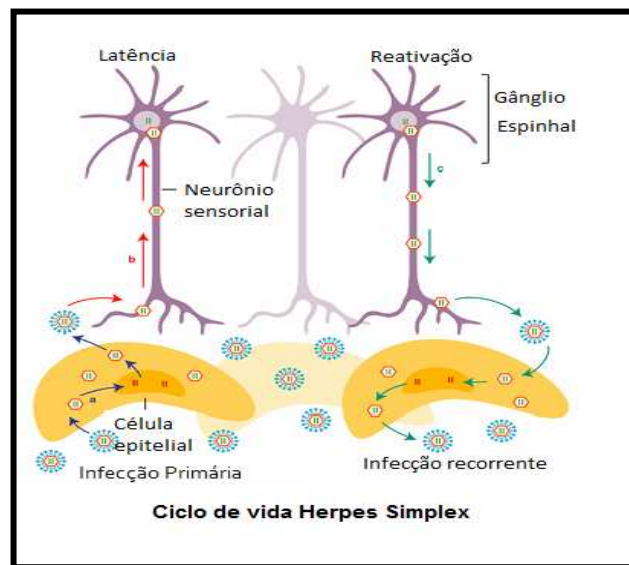
A infecção por HSV-1 é bastante frequente, e mais preocupante nos países subdesenvolvidos, onde as condições higiênico-sanitárias são muito limitadas, verifica-se que a prevalência de anticorpos anti-HSV-1 é superior a 90% em crianças com dois anos de idade, enquanto que os anticorpos anti-HSV-2 ocorrem, geralmente, em indivíduos pós-púberes, uma vez que o seu principal modo de transmissão é através da relação sexual (40) e contato com lesões clínicas (42).



**Figura 4:** Estrutura do HSV-1. A partícula viral é composta por: um envelope lipídico, com glicoproteínas na superfície, um tegumento, um capsídeo que tem a forma icosaédrica e um genoma de fita dupla de DNA (41).

A infecção primária causada pelo HSV-1 resulta muitas vezes em lesões dolorosas na pele ou lesões na mucosa, mas também pode ser assintomático. A porta de entrada para replicação do vírus, ou seja, a infecção primária normalmente ocorre por via oral, faringe, tecido da mucosa genital ou pequenas escoriações na pele, nos primeiros anos de vida, com frequente acometimento do SN. Então este é transportado para gânglios regionais onde se estabelece a latência (Figura 5) (43). A encefalite por HSV-1 é considerada a mais comum encefalite esporádica não sazonal (44). Ela ocorre em todas as idades e em ambos os sexos (45), embora alguns estudos relatem uma predominância de encefalite causada por HSV em pessoas de meia idade e idosos (46). Estima-se que um terço das encefalites é decorrente de infecção primária e apenas 10% dos pacientes apresentam um histórico de recidiva herpética (42).

A recorrência está diretamente relacionada à gravidade da infecção primária, como refletido pelo tamanho, número e propagação das lesões. O mecanismo pelo qual o HSV-1 infecta o SN para causar encefalite não foi definitivamente estabelecido (47).



**Figura 5:** Latência e reativação do HSV: a) Translocação do DNA viral para o núcleo da célula epitelial; b) Transporte axonal retrógrado; c) Transporte axonal anterógrado (48).

Em indivíduos com o sistema imune normal, a infecção primária pelos HSV-1 é, geralmente, mais dolorosa e prolongada do que as infecções recorrentes, sendo que, caso o indivíduo já possua anticorpos para o HSV-2, a infecção é menos grave, quando comparada com indivíduos soronegativos para os dois tipos deste vírus (40).

Apesar do HSV-1 ser classicamente conhecido como causador do herpes labial e o HSV-2 do herpes genital, pode-se encontrar infecções por HSV-2 no sítio labial e por HSV-1 no trato genital (49).

Infelizmente, o quadro clínico de HSV-1 é inespecífico. Os sintomas mais importantes são febre, dor de cabeça, confusão mental, alteração de consciência, perda de memória e mudanças de personalidade (50). A manifestação clínica mais grave é a encefalite herpética que ocorre quando o HSV-1 infecta o tecido cerebral.

A maioria desses casos ocorre por reativação do vírus e a rota mais comum para atingir o SN é feita através do nervo olfatório. Os principais locais de latência são os gânglios trigêmeos e os olfatórios (42). Quando neonatos são infectados pelo HSV-1 podem ocorrer dois outros padrões de infecção além da encefalite: o primeiro é uma infecção que é limitada à pele, olhos e boca; e a segunda que é a forma disseminada, envolve fígado, glândula adrenal e pulmão. Esta forma disseminada se assemelha ao quadro observado na sepse bacteriana (51).

De fato, nesses pacientes as manifestações podem variar de formações vesiculares limitadas às regiões orofaciais e genitais até doença disseminada em pele e mucosas, com frequente acometimento do SN deixando sequelas em 80% das vítimas (43).

No caso de encefalite herpética podem ocorrer no seu início transtorno de consciência, com déficit de atenção, sonolência, desorientação de tempo e espaço e fotofobia (52).



### 3.6.2. HERPES SIMPLEX 2

Em 1968, os pesquisadores Nahmias e Dowdle classificaram o vírus herpes no gênero *Simplex*, com base em diferenças imunológicas, epidemiológicas e clínicas, separaram este vírus em duas espécies diferentes, classificando-os em HSV-1 e HSV-2 (39).

O Herpesvírus tipo-2 (HSV-2) é responsável pelo herpes genital e tem como característica biológica o rápido crescimento em cultivo celular, uma ampla gama de hospedeiros e a capacidade, comum a todos os herpesvírus, de se manter latente em células de seus hospedeiros por tempo indeterminado (53). O capsídeo encontra-se envolvido por um invólucro, que surge durante processo de maturação, na passagem pela membrana nuclear ou pelo aparelho de Golgi. Este último confere a este vírus uma grande fragilidade e condiciona o seu modo de propagação e replicação (35,40, 54).

O HSV-2 foi isolado a partir de gânglios humanos normais da região sacral, mas o estado físico do DNA e a expressão do gene em latência humana não foram estudados tão amplamente como as características do HSV-1 em gânglios trigeminiais (47).

A reativação do HSV-2 pode produzir dor e erupção cutânea abaixo da cintura. Há geralmente sintomas iniciais de neuralgia difusa, muitas vezes com mal-estar e febre, seguidos dentro de alguns dias pelo aparecimento de vesículas na área genital. O HSV-2 também pode causar meningite, encefalite de tronco monofásico ou recorrente e mielite (47).

O HSV-2 apresenta acentuada tendência a recorrência (média de 4 episódios/ano), superior à observada na infecção herpética genital causada pelo HSV-1 (média de menos de 1 episódio/ano) (55).

A prevalência do HSV-2 aumenta com a idade, com incremento cumulativo após puberdade. O herpes simples genital, como esperado para uma doença sexualmente transmissível (DST), tem alta prevalência em pacientes com vida sexual promíscua. A infecção primária por HSV-2 em pessoas imunocompetentes é caracterizada por lesões da mucosa genital, seguido pela

persistência latente dentro gânglios sacrais. Em alguns casos, o envolvimento da medula espinal pode conduzir a mielite ascendente e meningite (56).

As infecções neonatais por HSV são consequências mais sérias da forma genital de infecção materna por HSV-2, embora o HSV-1 possa ocasionalmente ser identificado (57).

Ao contrário dos pacientes imunocompetentes, o HSV-2 em imunocomprometidos provoca encefalite subaguda, que mostra o envolvimento mais difuso ou multifocal da infecção temporo frontal focal. Além disso, o HSV-2 pode causar meningite asséptica ou meningite linfocitária benigna recorrente em adultos imunocompetentes (58), caracterizada clinicamente por sinais e sintomas de irritação meníngea e radiologicamente por realço meníngeo difuso ou espessamento em pós-contraste em tomografia computadorizada ou Ressonância Magnética. A meningite asséptica por HSV-2 tem sido relatada em 36% das mulheres e 11% homens (59). Embora muitos pacientes não apresentem evidências clínicas de lesões genitais no momento de um ataque de meningite, aproximadamente 40 % destes pacientes tem uma história prévia de lesões genitais (59).

As manifestações clínicas da encefalite por HSV-2 incluem convulsões, febre, letargia, irritabilidade, tremores, má alimentação e abaulamento das fontanelas (60). Estudos neurodiagnósticos para a triagem da infecção por HSV-2 em SN incluem o exame do LCR, eletroencefalografia (EEG) e diagnóstico por imagem (50).

### **3.6.3. VARICELA ZOSTER (VZV)**

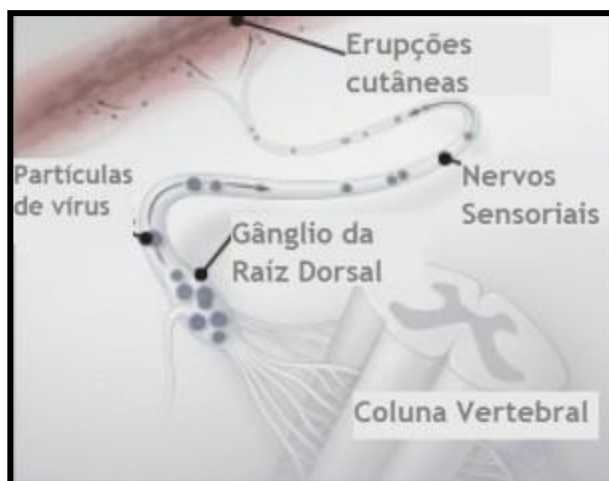
O herpesvírus humano tipo 3 (HHV-3) também conhecido como Varicela Zoster (VZV), assim como o HSV-1 e HSV-2, estabelece uma relação evolucionária entre eles, e sua principal característica é a capacidade de estabelecer infecção latente em células nervosas. Reativações virais são comuns em imunodeprimidos e idosos e resultam na formação de bolhas (zoster) (13).

Antigamente, a varicela e o Herpes-Zoster foram considerados patógenos diferentes. A natureza infecciosa desse vírus foi observado por

VonBokay, que relatou a catapora em pessoas que mantiveram contato estreito com outras pessoas que sofriam de herpes zoster. Em 1925, Kundratitz mostrou o aparecimento de varicela em pacientes após inocular um líquido retirado da vesícula biliar de um paciente com herpes zoster (40). Desde o início do século XX as características histopatológicas de lesões de pele, estudos epidemiológicos e imunológicos, indicavam que a varicela e herpes zoster eram causados pelo mesmo agente. O isolamento do vírus ocorreu em 1958, e este fator contribuiu para definir a sua biologia. Vírus isolados de pacientes com varicela e herpes zoster resultou semelhantes em culturas de tecidos, especificamente no aparecimento de inclusões eosinofílicas intranucleares e células gigantes multinucleadas. Nesse mesmo ano, Wellere e colaboradores foram capazes de estabelecer que não havia diferenças entre os dois agentes virais isolados de pacientes com essas diferentes entidades clínicas, o que foi confirmado com o estudo de DNA (40).

O herpesvirus tipo 3 (HHV-3) ou VZV está intimamente relacionado com o herpes simplex (HSV), e seu genoma compartilha de grande homologia. As glicoproteínas de seu envelope conhecidas como gB, gC, gE, gH, gI, gK, gL correspondem com aquelas do HSV (61). O VZV também produz a LAT (latência associadas a transcritos) que desempenha um papel importante no estabelecimento de latência dos HSV (13).

Após infecção primária, o VZV permanece latente nos gânglios da raiz dorsal e nervo trigêmeo (Figura 6). Em cerca de 10-20% dos casos o VZV reativa-se (Zoster) mais tarde na vida produzindo uma doença conhecida como “cobreiro”. Esta manifestação afeta principalmente pessoas idosas e pessoas com SIDA ou com o sistema imunológico debilitado (62). Complicações graves incluem neuralgia pós-herpética, mielite, herpes oftálmico, que é bastante comum em adolescentes (33,61).



**Figura 6:** Sítio de Latência do VZV (63).

A distribuição dermatológica das lesões de Herpes Zoster (VZV), combinadas com o aumento do título de VZV em varicela ou vesículas herpes zoster, indicam que o vírus foi reativado do estado latente nos gânglios do sistema nervoso periférico (SNP) e se espalha para a epiderme por transporte intra-axonal.

O VZV está presente em múltiplos órgãos e dessa maneira também pode sofrer disseminação hematogênica. O VZV foi associado à viremia e ao linfotropismo durante a varicela mesmo em adultos normais saudáveis. Durante a varicela, as células T são produtivamente infectadas, provavelmente contribuindo para a disseminação viral (47).

O herpes zoster é uma doença infecciosa aguda, resultante da reativação do vírus latente da VZV em indivíduos parcialmente imunizados após infecção prévia. Neste caso, a reativação provoca manifestação clínica diferente da infecção primária que, no entanto, é causada pelo mesmo vírus (64) podendo provocar com menor frequência a encefalite causada pelo VZV. A infecção direta do SN pelo VZV durante a varicela também pode ocorrer, porém na maioria das vezes a encefalite que ocorre é a cerebelite.

Na maioria das crianças saudáveis, a doença geralmente evolui sem gravidade. Algumas vezes, no entanto, pode ocorrer comprometimento de órgãos internos (principalmente do sistema nervoso central - SNC), infecções bacterianas superpostas (comumente na pele) e, mais raramente, manifestações

hemorrágicas (sangramentos espontâneos). As manifestações neurológicas (ataxia cerebelar e encefalite), embora não sejam comuns, podem estar associadas com sequelas. É caracterizada por perda de coordenação dos movimentos, vômitos, alteração da fala, tontura e tremores (35,40).

Complicações neurológicas agudas podem afetar tanto o sistema nervoso periférico (neuropatias cranianas, radiculopatias motoras), como o sistema nervoso central (meningite, mielite, encefalite, vasculite) (65). Também podem ocorrer complicações da infecção por VZV sem prurido (66); complicações neurológicas aparecem mais frequentemente em pacientes imunodeprimidos.

A encefalite, que é um acometimento mais difuso e grave, ocorre mais em adultos, com letalidade de até 37%. São caracterizadas por diminuição do nível de consciência, dor de cabeça, vômitos, febre e convulsão. Dos indivíduos que sobrevivem, cerca de 15% permanecem com algum grau de seqüela neurológica. A infecção herpética causada pelo herpes zoster pode gerar complicações em 0,2 a 0,5 % dos indivíduos afetados e resulta em alterações do SN, dando origem a encefalites e meningoencefalite (67,68). O *herpes zoster* facial pode estar associado com comprometimento ocular e pode levar à cegueira se não for adequadamente tratado (69).

A rápida confirmação laboratorial do diagnóstico nos casos de suspeita de varicela e herpes-zoster pode ser um importante recurso clínico para orientar a prescrição de terapia antiviral; testes sorológicos são úteis para identificar indivíduos que podem se beneficiar a partir de imunização com a vacina da varicela (70).

### **3.7. EPSTEIN BARR VÍRUS (EBV)**

O EBV foi descoberto em 1964, por Tony Epstein, Yvonne Barr e Burt Achong, quando examinaram biópsias de tumores recém-extirpados de Linfoma de Burkitt (LB) e com um microscópio eletrônico encontraram um vírus parecido às partículas dos herpesvírus. Desta forma, estabeleceu-se que o mesmo se tratava de um novo vírus, o Epstein-Barr, (71) e, em 1968, foi demonstrado que o mesmo era o agente etiológico da mononucleose infecciosa (72).

O herpesvírus humano tipo 4 (HHV-4), ou vírus causador da Mononucleose Infecciosa (MI), pertence à subfamília *Gammaherpesvirinae*, sendo considerado um dos mais comuns dos herpesvírus (73). Acomete aproximadamente 95% da população mundial adulta (74), sendo que a infecção primária ocorre normalmente na adolescência e em aproximadamente 30-50% dos casos causam a MI. Essa associação de idade e desenvolvimento da MI não está muito clara, sendo sugerido como principal fator a carga viral de contágio (75).

Sintomas no SN podem ocorrer imediatamente antes, durante ou depois da MI, bem como após a infecção aguda pelo EBV na ausência de MI sintomática. Complicações do SN incluem meningite, encefalite, cerebelite, polirradiculomielite, mielite transversa e neuropatias craniais e periféricas (76).

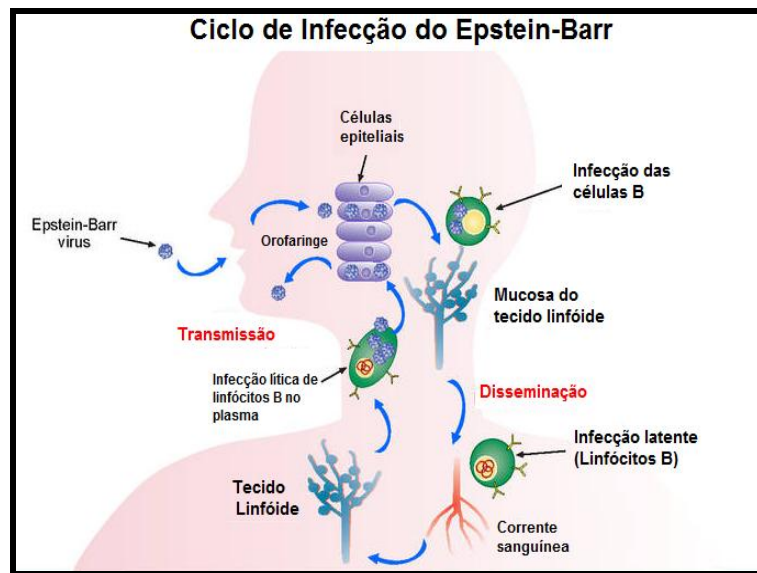
A transmissão do EBV requer contato íntimo com a saliva de uma pessoa infectada. O período de incubação, ou o tempo entre a infecção e o aparecimento dos sintomas, varia de 4 a 6 semanas. Pessoas com MI podem ser capazes de espalhar a infecção para outras pessoas por um período de semanas. No entanto, nenhuma precaução especial ou procedimentos de isolamento são recomendados, já que o vírus também é encontrado frequentemente na saliva de pessoas saudáveis. De fato, muitas pessoas saudáveis podem carregar e transmitir o vírus de forma intermitente durante a vida. Essas pessoas geralmente são reservatórios primários para a transmissão pessoa-pessoa. Por esta razão, a transmissão do vírus é quase impossível de se evitar (71).

Ainda parece incerto como se estabelece a replicação do EBV em indivíduos saudáveis. As tonsilas parecem ser candidatas para o sítio de replicação do EBV (Figura 7) (77,78). Infecções do SN pelo EBV podem ser classificadas em dois grupos: síndromes do SN associadas com a infecção primária pelo EBV ou reativação da infecção (79). Como o EBV não apresenta latência em neurônios ou outras células não linfóides, uma infecção do SN após a reativação do vírus, é provável que ocorra em locais extraneurais, com a subsequente disseminação do vírus no SN através de linfócitos infectados (80).

Após a exposição, EBV estabelece uma infecção persistente no hospedeiro e é periodicamente eliminado nas secreções de orofaringe. O vírus

também pode infectar células epiteliais e pode replicar-se inicialmente na orofaringe antes de infectar as células B. Reativação periódica de linfócitos B de memória com infecção latente parece facilitar a infecção de células epiteliais na orofaringe permitindo a transmissão do vírus na saliva para novos hospedeiros (81).

O EBV está latente em células linfócitos B e deve ser tomadas precauções em atribuir doenças neurológicas para EBV puramente na base de um PCR positivo no LCR (47).



**Figura 7:** Infecção dos linfócitos B pelo vírus EBV (80).

De qualquer forma, na latência do EBV ocorre a proliferação da célula infectada, e não de partículas virais como ocorre na infecção lítica viral (82).

Em pacientes imunocompetentes portadores de EBV, pode ocorrer o estabelecimento de uma infecção persistente de longa duração, nestes casos ocorre a liberação constante ou intermitente do vírus através da saliva, infectando outros indivíduos através do contato oral (75, 83).

A invasão do SN por células infectadas pelo EBV está envolvidas na patogênese de algumas formas de doença neural. Estudos mostram que células infectadas com EBV têm sido isoladas de LCR de pacientes com meningoencefalite (79).

A apresentação clínica da encefalite causada pelo EBV não difere da encefalite viral em geral, o que significa que não é específica. Os pacientes podem apresentar convulsões, coma, alterações de personalidade, do tronco cerebral focal ou achados cerebrais, ataxia cerebelar ou distorções de percepção. Embora a encefalite por EBV possa envolver qualquer área do cérebro, o cerebelo é comumente afetado; a maioria dos pacientes apresentam anormalidades da marcha (76,84).

O EBV pode causar meningite asséptica, febre baixa, dor de garganta e dor de cabeça (Figura 8), encefalomieloneurites, neurite, esplenomegalia, mielite (85), encefalite (86), neuropatias (87) e erupção cutânea (33).



**Figura 8:** Manifestações Clínicas do EBV (88).

As neuropatias causadas pelo EBV apresentam-se com oftalmoplegia, plexopatia lombo sacral e neuropatia sensorial ou autônoma. Historicamente, a associação do vírus com doença neurológica foi sugerida por um título de anticorpos do soro heterofilo positivo mais tarde pela presença de DNA de EBV, anticorpos ou ambos em líquido cefalorraquidiano (87).

O desaparecimento do DNA viral do LCR no momento de melhora da doença neurológica, particularmente antes de um declínio dos glóbulos brancos, apoia a teoria de que o resultado de doença no SN tem vazão direta no SN pelo vírus (89).



### 3.8. CITOMEGALOVÍRUS HUMANO (HCMV), HERPESVÍRUS 6 e 7 (HHV-6 e HHV-7)

#### 3.8.1. CITOMEGALOVÍRUS HUMANO

A subfamília *Betaherpesvirinae* inclui o citomegalovírus humano (HCMV), que está intimamente relacionado com os herpesvírus humanos 6 e 7 (HHV-6 e HHV-7) (90). O HCMV, também conhecido como herpesvírus humano-5 (HHV-5), é um patógeno humano comum adquirido no início da vida, na maioria dos indivíduos imunocompetentes, sendo a infecção primária caracterizada por um curso clínico benigno.

Em 1904, alguns pesquisadores relataram achados de células grandes com núcleos excêntricos rodeados por um halo claro e com inclusões intranucleares (Figura 9) em órgãos como pulmão, fígado, rins e glândulas parótidas de natimortos, no entanto, o motivo da existência dessas células era desconhecido (92,93). Há cerca de 50 anos Smith, isolou esse herpesvírus em culturas de tecidos (40).



**Figura 9:** Célula citomegálica: Núcleo excêntrico, circundado por um halo claro e apresentando inclusão nuclear (92).

A soroprevalência mundial do HCMV é de aproximadamente 60% a 100% da população de imunocomprometidos e imunocompetentes (94). A maior parte das pessoas, em algum momento, é infectada pelo HCMV. Entre 30% e 90% dos adultos imunocompetentes apresentam anticorpos IgG-HCMV presentes no

organismo, sendo descritos como soropositivos para HCMV (95 - 97) e tem relação com seu nível socioeconômico (98 - 100).

O HCMV tem genes que interferem com as células apresentadoras de antígenos, limitando assim a resposta imune (101). A replicação do HCMV em células do ducto epitelial promove a excreção do vírus em muitos fluídos corporais. A replicação do HCMV é altamente associada à célula e é transmitida por células infectadas, incluindo linfócitos e leucócitos (102).

O material genômico do HCMV pode ser encontrado em monócitos/macrófagos, neutrófilos, linfócitos e células endoteliais. Em pacientes imunocompetentes, a maior parte do vírus é destruída (por células citotóxicas específicas para HCMV) e a infecção procede de forma assintomática (103).

O período de incubação após a infecção é de 4 a 12 semanas, período durante o qual o antígeno pode ser detectado. Seguidamente ocorre a fase aguda da doença; o vírus é transmitido na maioria das secreções, particularmente saliva, urina, secreções vaginais e sêmen (que mostra o maior título de qualquer fluido corporal), ou seja, pode ser encontrado em secreções corporais sendo, portanto, sexualmente transmissível (104).

O HCMV causa uma síndrome similar à mononucleose infecciosa enquanto que o HHV-6 e o HHV-7 causam *roseola infantum*, ataques febris e outras síndromes febris em crianças (105,106). Após a infecção primária, esses vírus permanecem em latência no hospedeiro humano ou mantendo baixos níveis de replicação viral, que é adequadamente controlado pela vigilância imunológica (105,107, 108,109).

Durante a infecção primária, o HCMV replica-se em leucócitos e células endoteliais vasculares, após isso o vírus se torna latente principalmente em células progenitoras da medula óssea e em células mielóides (110).

O HCMV é responsável por várias causas de manifestações clínicas quando presente no SN (111). As complicações neurológicas incluem encefalite, mielite e polirradiculopatia. No caso da encefalite, nenhuma característica clínica especial é produzida. Resultados laboratoriais ou de neuroimagem típicos também

estão ausentes. Isso faz com que o diagnóstico de encefalite por HCMV seja muito difícil. Além disso, a encefalite é clinicamente indistinguível da demência provocada pelo HIV. Sinais inespecíficos de encefalopatia (por exemplo, confusão, letargia, desorientação, convulsões) representam a principal característica clínica da infecção, portanto, em alguns casos, o diagnóstico requer autópsia (96,112).

Um segundo tipo de manifestação pelo HCMV ocorre após a infecção inicial, e é uma reativação do HCMV latente. Se uma pessoa se torna imunodeprimida, ou realiza algum tipo de transplante (órgão ou de medula óssea) (113), ou mesmo sob estresse, o vírus pode reativar-se. Se isso ocorrer, os sintomas podem ser mais graves e incluem pneumonia (114), hepatite (115), encefalite (116), mielite (117), colite, retinite, neuropatia (13).

O terceiro tipo de manifestação por HCMV é a congênita ou perinatal. Em HCMV congênita, uma mulher grávida passa a doença através da placenta para o feto. Em HCMV perinatal, uma mãe passa HCMV para o filho através da amamentação. Os sintomas variam de gravidade e vão desde uma simples febre de origem desconhecida, para aumento do fígado e/ou baço, e até mesmo retardo mental e motor (118).

### **3.8.2. HERPESVÍRUS TIPO 6 (HHV- 6)**

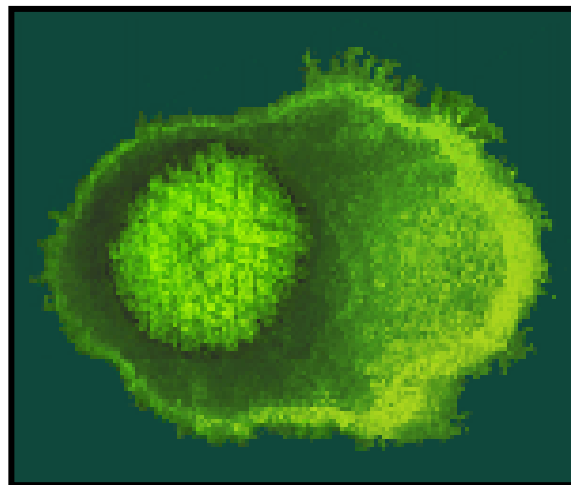
O HHV-6 foi isolado pela primeira vez em 1986, por Salahuddin e seus associados, em doentes com distúrbios linfoproliferativos e, posteriormente, em doentes com SIDA (11,40). O herpesvírus humano tipo 6 (HHV-6) (Figura 10) pertence à família *Herpesviridae* e está inserido na subfamília  $\beta$ -*herpesviridae*, juntamente com o HCMV, devido, principalmente, à homologia genética existente entre ambos (40).

Foram identificadas as variantes A e B do HHV-6, distintas por características genéticas, imunológicas e moleculares, que, apesar de apresentarem grau de similaridade de nucleotídeos maior do que 90% possuem patogênese e manifestações clínicas diferentes (119). Cepas pertencentes a um grupo, que inclui o isolado original (estirpe GS), são principalmente isoladas de pacientes com doença linfoproliferativa e são chamados de variante A ou HHV-6 A

e a outra, que inclui a estirpe Z-29, isolado principalmente em material proveniente de pacientes com Exantema Súbito (ES), variante B ou HHV-6 B (120).

O HHV-6 A não foi etiologicamente ligado a qualquer doença; já o HHV-6 B é o agente causador da ES conhecido também como *roseola infantum*, uma doença da infância caracterizada por febre alta e uma erupção cutânea leve, ocasionalmente complicada por convulsões ou encefalite (121,122,123). Está também associado a episódios de esclerose múltipla, sem haver ainda estudo conclusivo entre doença e este agente viral (40).

O HHV-6 apresenta tropismo por células T CD4+, porém há relatos de infecção em diversos tipos celulares como monócitos, macrófagos, linfócitos B, células NK, astrócitos, células dendríticas, epiteliais e endoteliais (124).



**Figura 10:** Herpesvírus Humano tipo 6 (125).

Como o HHV-6 se torna latente nas células da linhagem dos monócitos - macrófago, (47, 126) a detecção do DNA e do antígeno no tecido de cerebral são prováveis reflexos da reativação da latência do HHV-6 nas células mononucleares do sangue (MNCs) que traficam através do cérebro nos pacientes com doença inflamatória do SN. O CD46 é um receptor do HHV-6 que é expresso na maior

parte em macrófagos e células que revestem os vasos sanguíneos, e menos frequentemente, em células de origem neuronal.

O vírus entra na célula através de interação com o receptor celular CD46, uma glicoproteína que está presente na membrana das células nucleares e está fisiologicamente envolvida na regulação da ativação do complemento (28,1217).

A infecção primária causada pelo HHV-6 ocorre que quase exclusivamente na infância. Estudos sorológicos indicam que com 12 meses de idade, mais de 90 % dos imunocompetentes podem ser infectados pelo vírus do HHV-6 (128). Aos 3 anos de idade praticamente todas as crianças foram infectadas pelo HHV-6 tornando-o o mais ubíquo de todos os herpesvírus humanos (129). O HHV-6 pode ser detectado na saliva de 2% a 3% das crianças com idades de três anos e em cerca de 25% dos adultos (130). O pico da infecção pelo HHV-6 é observada em 6-9 meses (122). Não há testes sorológicos convenientes para discriminar as variantes do HHV-6, no entanto, a disposição sugere evidências que a maioria das infecções em pacientes imunocompetentes são causadas por HHV-6 tipo B (131).

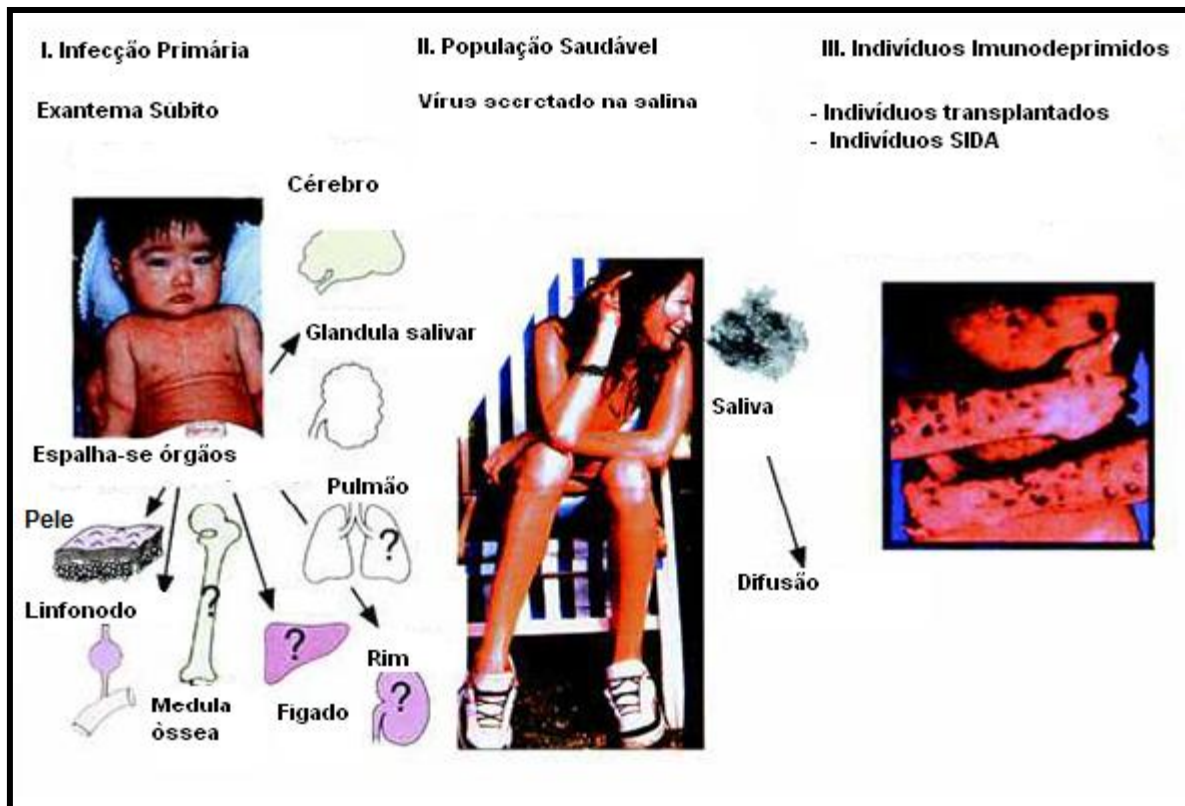
O HHV-6 não possui, até o momento, vias de transmissão conhecidas, sendo provável que a saliva ocupe o lugar central como veículo de transporte usualmente nos primeiros 2 anos de vida (132-134), uma vez que, as glândulas salivares são um reservatório muito importante deste vírus (transmissão horizontal), podendo também ocorrer transmissão vertical (40).

O papel da doença do HHV-6 e HHV-7 no SN é uma área que está atualmente sendo investigada. A variação das manifestações clínicas no SN inclui infecção assintomática, convulsões febris, meningite, meningoencefalite, paralisia facial e, raramente, encefalite fatal (135,136).

De uma forma geral, as manifestações clínicas da infecção primária por HHV-6 em hospedeiros imunocompetentes são usualmente benignas e autolimitadas (Figura 11) (137).

O quadro pode complicar-se caso surjam convulsões e sintomas no SN (138). Embora a maioria das crianças infectadas por este vírus apresente

recuperação completa, o DNA do HHV-6 pode permanecer nas células mononucleares do sangue periférico, na saliva e no LCR, sem causar sintomatologia (períodos de latência ou dormência) (139).



**Figura 11:** Etapas da história natural da infecção por HHV-6: I. A infecção primária ocorre em latentes, pode resultar em exantema súbito (erupção cutânea no tórax da criança), e se espalha para órgãos. II. Em crianças e adultos saudáveis, HHV-6 está presente em forma persistente nos gânglios linfáticos e é produzida de forma assintomática nas glândulas salivares e saliva, a rota mais provável de transmissão. III. HHV-6 infecção/reativação ocorre em pessoas submetidas à terapêutica imunossupressora após transplante de órgãos ou em doentes com SIDA (140).

A reativação do vírus pode ocorrer por diferentes estímulos, sendo comum em pessoas com imunodepressão e, apesar de ser assintomática na maioria dos casos, pode causar febre, encefalite ou convulsões febris (28,141, 142). Em pessoas imunocompetentes, a reativação do vírus pode ocorrer durante

a gravidez ou em casos de coinfeção com outros vírus como o HHV-7, sarampo e o vírus da dengue (143).

Nos adultos, o vírus tem sido associado a uma vasta gama de desordens neurológicas, incluindo esclerose múltipla (EM) (144), epilepsia do lobo temporal (145) e encefalite límbica aguda pós-transplante.

Há relatos descrevendo outras possíveis doenças associadas à reativação do HHV-6 (28), e pode ser encontrada em pneumonias (após infecção primária), convulsões febris, meningite, encefalite entre outras, o que demonstra que este patógeno possui um elevado potencial neuroinvasivo (146).

O SN é um alvo potencial para a patogênese do HHV-6 e o DNA do HHV-6 é frequentemente detectado também em tecido cerebral de indivíduos saudáveis (147,148), indicando que o vírus é capaz de invadir e persistir de forma assintomática no SN, e tem sido associado a complicações neurológicas principalmente em crianças com infecção primária (142, 149) e encefalite tanto em pacientes imunocompetentes e imunocomprometidos (150,151), encefalomielite desmielinizante (152,153) e mielopatia crônica (154). Alguns pesquisadores sugerem que o HHV-6 A pode ter maior neurotropismo do que HHV-6 B (4,155,156).

### **3.8.2.1. INTEGRAÇÕES DO HHV-6 NO CROMOSSOMO HUMANO**

Evidências recentes sugerem que o genoma do vírus pode ser integrado no DNA da célula hospedeira, tanto *in vivo* como *in vitro*, nas terminações dos cromossomos (157, 158) com uma frequência de 0,2-0,8%, podendo ocorrer em células germinativas (159). Estas descobertas são fundamentadas pela presença de sequências teloméricas, nos cromossomos humanos, semelhantes às sequências repetidas na porção terminal do genoma do HHV-6, e pela proteína U94, que funciona como mediador da integração do DNA nas células humanas (28).

O HHV-6 integrado no cromossomo foi descrito e quantificado em indivíduos saudáveis. Cerca de 1% dos doadores de sangue têm DNA de HHV-6 integrado no seu genoma (160). O nível de carga viral no sangue total vai desde

$10^6$  cópias/ml a  $10^7$  cópias/ml (161). Assim, as amostras sanguíneas de indivíduos com sequências de HHV-6 integradas nos cromossomos celulares podem apresentar elevada carga viral, mesmo quando estes indivíduos estão saudáveis (162,163).

### **3.8.3. HERPESVÍRUS TIPO 7 (HHV- 7)**

O herpesvírus humano tipo 7 (HHV-7), foi identificado, pela primeira vez, em 1989, depois de se ter verificado a ativação de linfócitos T CD4+ de indivíduos saudáveis, e posteriormente, através da saliva de indivíduos infectados com o HHV-6. Todavia, apenas se isolou em 1992, em doentes com síndrome de fadiga crônica (40).

O HHV-7 apresenta altas homologias, genéticas e biológicas com o HHV-6 e, também ele, foi recentemente considerado um agente etiológico do ES, que ocorre principalmente em crianças e é caracterizado pela presença de febre elevada e erupções cutâneas (40).

O DNA viral foi completamente sequenciado em 1996 (164), e sua sequência completa foi confirmada dois anos mais tarde (165).

O HHV-7 também foi isolado a partir da saliva em uma proporção elevada de adultos saudáveis (131), sugerindo que possa replicar *in vivo*, pelo menos em locais selecionados, sem consequências clinicamente apreciáveis. Este possui um tropismo seletivo para linfócitos T CD4+, e as células CD4 glicoproteicas é um componente essencial do receptor de membrana celular para o HHV-7 (166).

Este vírus atinge a população adulta em aproximadamente 90 a 95% (167), a infecção primária ocorre no início da infância, em uma alta incidência (168) e em alguns pacientes, está associado a episódios de exantema súbito (ES) ou doença febril (169) e mais de três quartos das pessoas são infectadas antes de seis anos de idade e ficam imune ao HHV -7 (170,171).

A infecção primária do HHV-7 entre as crianças geralmente ocorre entre as idades de 2 e 5 anos, o que significa que ocorre após a infecção primária de HHV-6, e pode ser responsável por alguns casos de ES (133,172). Na Europa e



nos EUA, a taxa de prevalência deste vírus é superior a 85% (40), fato este que, dificulta a interpretação de dados laboratoriais na investigação da presença deste vírus num determinado indivíduo, na medida em que apenas os marcadores diretamente relacionados com a replicação viral (presença de DNA viral no plasma e antígenos virais nos tecidos, entre outros) permitem diagnosticar uma infecção recente. Esta taxa de prevalência é ainda mais significativa em crianças infectadas pelo HHV-6 (40).

O espectro de doenças associadas com a infecção primária pelo HHV-7 é semelhante ao HHV-6, embora as apresentações clínicas geralmente sejam mais suaves. A infecção primária pode ser assintomática ou cursar com febre e convulsão febril. Menos comumente ocorrem sintomas respiratórios altos, vômitos e diarreia. Leucopenia é frequente. Em raros casos é causa de encefalite em imunocompetentes ou imunossuprimidos. Pode causar exantema súbito, apesar de o HHV-6 ser o agente etiológico mais implicado ou febre elevada sem erupção cutânea, o que permite inferir que o HHV-7 corresponde a um vírus com menor patogenicidade que o HHV-6, podendo também encontrar-se associado a infecções oportunistas (64).

Apesar de relativamente ter poucos casos descritos de infecção primária causada pelo HHV-7, é surpreendente que muitos deles envolvam manifestações no SN, como hemiplegia (173,174) e convulsões febris (174,175, 176). As infecções primárias em adultos são muito raras, uma vez que virtualmente todos os indivíduos são infectados por HHV-7 durante a primeira infância. No entanto, a infecção primária HHV-7 em adultos tem sido associada com encefalite e paralisia flácida (177).

### **3.9. HHV-8 ou VÍRUS CAUSADOR DO SARCOMA DE KAPOSÍ (KSHV)**

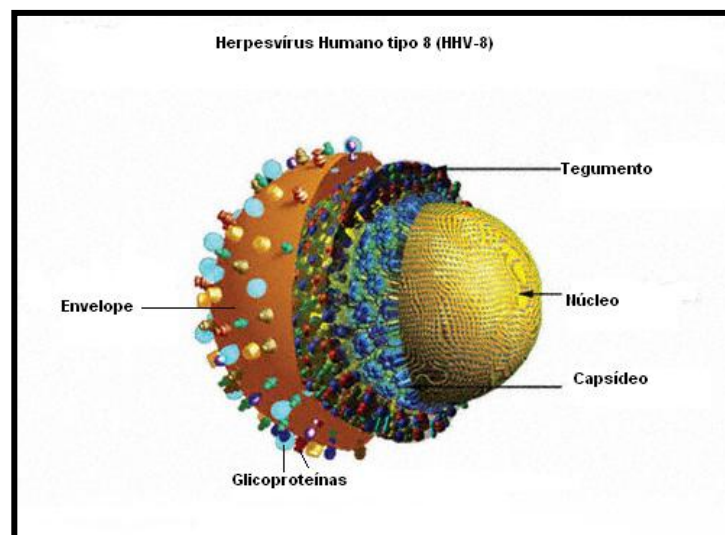
Em 1994, o HHV-8 foi descrito pela primeira vez por Chang e colaboradores como Herpesvírus Humano tipo 8 (HHV-8) (Figura 12), também chamado de Herpesvírus associado ao sarcoma de Kaposi (SK) (178, 179).

É o mais novo membro da família *Herpesviridae*, sendo classificado no gênero *Rhadinovirus*, o primeiro a infectar humanos (180). Esse agente apresenta

regiões de DNA homólogas a dois gamaherpesvírus: Epstein-Barr vírus (EBV), relacionado à formação de linfoma de Burkitt e tumores nasofaríngeos em humanos e o herpesvírus saimiri (HVS), responsável pelo desenvolvimento de um tipo de linfoma fulminante em macacos.

Foi encontrado em tecidos de sarcoma de Kaposi de um doente com SIDA e em todas as variantes do sarcoma de Kaposi: clássica, endêmica, iatrogênica e associada à SIDA (181). A característica principal deste grupo é a transformação celular e a capacidade de causar lesões tumorais em seus hospedeiros (182).

O fato do HHV-8 ter sido detectado em pacientes de ambos os sexos e em todos os grupos etários, sugere uma distribuição ampla do vírus na população geral, inclusive em indivíduos sadios (183,184).



**Figura 12:** Estrutura tridimensional do HHV-8 proposta por Louis E. Henderson, Frederick. Cancer Research Center (185).

O HHV-8 possui 12 genes que têm homologia celular, incluindo genes que codificam produtos estimuladores da divisão celular, inibidores do apoptose e moduladores da função imune. Quatro genes do HHV-8 têm propriedades de transformação do crescimento celular. Os genes envolvidos no crescimento e

regulação imune estão claramente relacionados com a patogênese do HHV-8, no entanto, essa regulação não está totalmente definida (186)

Um possível mecanismo proposto para a patogenicidade do HHV-8 seria a síntese de produtos homólogos a receptores celulares que são importantes no crescimento e diferenciação celular, enzimas e proteínas que estimulam a divisão celular, inibem a apoptose e modulam a função imune, produzindo, dessa forma, efeitos carcinogênicos (186,187).

O HHV-8 infecta linfócitos B em divisão, durante a mitose (179) e persiste em latência, sob a forma de um epissoma, em células infectadas (179,188) e apenas uma pequena parcela dos genes deste vírus são expressos (189). Durante a reativação (ciclo lítico), o vírus produz formas lineares do genoma para o empacotamento nos vírions que, depois de adquirirem o envelope a partir da membrana nuclear, são libertados por destruição da célula inicialmente infectada (189).

As características clínicas da infecção primária causada pelo HHV-8 não foram claramente definidas. No entanto, com base na presença do vírus em monócitos do sangue, tumores linfoides e tumores endoteliais linfáticos, é bem provável que o HHV-8 pode persistir em tecidos hematopoiéticos e linfáticos (186).

Em doentes com SIDA e SK, o DNA do HHV-8 pode ser detectado na saliva, nos monócitos do sangue periférico, nos tecidos linfoides, na pele normal, próstata, e na medula óssea (190 - 194). Uma vez que, o HHV-8 foi detectado nos gânglios linfáticos, sugere-se que o sítio de latência do HHV-8 seja os tecidos linfoides periféricos (195).

Os níveis de replicação do HHV-8 são muito mais altos em pacientes com SK. Isso mostra que a replicação do HHV-8 é provavelmente cíclica, podendo ficar latente em pacientes imunologicamente competentes, assim como outros herpesvírus (196).

A transmissão sexual do HHV-8 já foi comprovada e depende do número de parceiros e do tempo de atividade homossexual do paciente. A prevalência do HHV-8 na população heterossexual é bastante baixa, sugerindo que essa forma de transmissão não seja comum e que a via sexual não seja a

única rota de transmissão (197). Outras formas de transmissão têm sido evidenciadas em áreas endêmicas, como transmissão horizontal, parenteral e vertical (198).

Estudos buscando a presença de DNA do HHV-8 em cérvix uterino de mulheres soropositivas para HIV e em sêmen de homens homossexuais HIV+ apresentaram uma positividade semelhante na maioria dos casos (27% e 20% respectivamente) (HOWARD *et al.*, 1997; VIVIANO *et al.*, 1997). No estudo de Whitby em 1995, o DNA do HHV-8 foi detectado em 3 de 11 amostras de cérvix uterino de mulheres soropositivas para o HHV-8, sugerindo que a transmissão do HHV-8 via contato vaginal é possível (197).

A alta prevalência e número de cópias do DNA do HHV-8 nas células mononucleares de sangue periférico sugerem que há transmissão do vírus por transfusão de produtos celulares do sangue (199).

Sugere-se que o desenvolvimento da doença parece depender de cofatores como hormonais, predisposição genética e/ou coinfeccção com outros agentes infecciosos (189). O HHV-8 está associado, com bastante segurança a três doenças: SK e duas enfermidades linfoproliferativas raras: o “Linfoma de Efusão Primária” e a doença Multifocal de Castleman (179).

O diagnóstico do SK na pele e mucosas efetua-se habitualmente com base nas seguintes características clínicas: 1. Máculas ou nódulos de cor violácea; 2. Distribuição pelas linhas de tensão da pele; 3. Coloração esverdeada (como das contusões) em torno da lesão tumoral; 4. Edema circundante; 5. Disseminação das lesões, possivelmente com comprometimento muco cutâneo (200).

Apesar de estas lesões serem bastante dolorosas, principalmente quando há formação de um edema, raramente provocam perigo de vida. Ao contrário do SK clássico, o SK endêmico ocorre principalmente em crianças e jovens da África sub-Saariana. Nesta forma de SK os doentes apresentam, geralmente, linfadenopatia e não lesões cutâneas. Outra forma de SK ocorre em receptores de órgãos, que apresentam lesões na pele e na mucosa oral (Figura 13) e normalmente regride com o fim do tratamento imunossupressor (189).

No tecido neuronal, o HHV-8 associado ao SK pode ter uma distribuição variceliforme e dermatomal, em local onde previamente ocorreu herpes zoster cutâneo (201). Da mesma forma o HHV- 8 foi encontrado no gânglio paravertebral de pacientes com SIDA e SK (194), sugerindo então neurotropismo deste vírus, e talvez sendo responsável pela distribuição clínica de algumas lesões.



**Figura 13:** Lesões provocadas pelo HHV-8 (64).

A incidência de infecção no sistema nervoso e a manifestação da doença produzida pelos herpesvírus varia consideravelmente entre pacientes imunocompetentes e imunocomprometidos. Dependendo do vírus, a patogênese das infecções no SN consiste de uma mistura de lesão celular direta (efeito citopático) e ou uma resposta imune mediada.

Para a maioria dos vírus, o parênquima cerebral ou os neurônios são infectados primeiramente, mas, para alguns, os vasos sanguíneos são lesados, levando a uma grave vasculite. Também pode ocorrer desmielinalização seguida de infecção. Um dos principais meios pelos quais os vírus entram no SN é durante uma viremia e subsequente propagação por meio da barreira hematoencefálica (202).

Na tabela 2, podemos observar as manifestações neurológicas mais comuns de infecções causadas pelos Herpesvírus.

**Tabela 2** - Manifestações neurológicas mais comuns de infecções causadas pelos Herpesvírus em pacientes imunocompetentes e em imunocomprometidos.

	Pacientes Imunocompetentes	Pacientes Imunocomprometidos
<b>HSV-1</b>	Encefalite (distribuição frontal-temporal)	Incomum, mas afeta pacientes usualmente com encefalite
<b>HSV-2</b>	Meningite aséptica (mulheres adultas jovens)	Incomum, mas afeta pacientes usualmente com mielite
<b>VZV</b>	Zoster (Sistema Nervoso Periférico) e Meningite (Sistema Nervoso Central)	Encefalite Multifocal
<b>EBV</b>	Incomum	EBV associado Linfoma primário no Sistema Nervoso Central
<b>HCMV</b>	Meningoencefalite neonatal	Retinite, Encefalite
<b>HHV-6</b>	Convulsão febril (crianças muito jovens)	Meningoencefalites/Leucoencefalite

**Fonte:** KLEINSCHMIDT-DeMASTERS e GILDEN (9).

### 3.10. LÍQUIDO CEFALORAQUIDIANO (LCR)

O exame do líquido cefalorraquidiano (LCR) ou líquor vem sendo utilizado como arma diagnóstica desde o final do século XIX, contribuindo, significativamente, para o diagnóstico de patologias neurológicas. Além do diagnóstico, a análise do LCR permite o estadiamento e o seguimento de processos vasculares, infecciosos, inflamatórios e neoplásicos que acometem, direta ou indiretamente, o sistema nervoso. Através da punção liquórica é possível, também, a administração intratecal de quimioterápicos, tanto para tratamento de tumores primários ou metastáticos do sistema nervoso central, como para a profilaxia do envolvimento neurológico de tumores sistêmicos (203).

Na Tabela 3, estão listadas as indicações do exame do LCR, segundo a Academia Americana de Neurologia (204).

**Tabela 3** - Indicações do exame de LCR, segundo a Academia Americana de Neurologia.

Indicações para o exame de LCR pela AAN:
Processos infecciosos do SN e seus envoltórios
Processos granulomatosos com imagem inespecífica
Processo desmielinizante
Leucemias e linfomas (estadiamento e tratamento)
Imunodeficiências
Processos infecciosos com foco não identificado
Hemorragia subaracnóidea

**Fonte:** AAN- Academia Americana de Neurologia (204).

Não há preparo específico para o exame do LCR. O paciente pode alimentar-se normalmente e não deve estar fazendo uso de medicação anticoagulante ou de drogas que interfiram na coagulação sanguínea. A sedação está indicada naqueles pacientes extremamente agitados, mas pode ser realizada em todos aqueles que o desejarem.

A punção líquórica está formalmente contraindicada nos indivíduos com hipertensão intracraniana ou quando houver processo infeccioso no trajeto da agulha. Naqueles indivíduos sob tratamento anticoagulante, o médico deve estar atento para o risco de sangramento decorrente da punção e para a real necessidade desta (205).

O nível preferencial para punção é o lombar, mas fica a critério do médico solicitante e da avaliação do médico que efetuará o procedimento a definição deste nível. A utilização de agulhas descartáveis e com o bisel mais pontiagudo aumenta significativamente os riscos da punção suboccipital (206,207).

Com relação à punção lombar, observa-se cefaleia pós-punção em cerca de 30% dos pacientes, independentemente do repouso ou da reposição hídrica, sendo recomendada a utilização de agulha atraumática e a recolocação do mandril na agulha antes da retirada da agulha do espaço subaracnóideo após a coleta da amostra.

A complicação mais frequente da punção liquórica é o sangramento discreto devido à lesão de vasos aracnoides. Lesões arteriais são mais raras, porém mais graves, podendo dar origem a hemorragias subaracnóideas, hematomas subaracnóideos de fossa posterior (no caso de punção SOD) ou no fundo de saco lombar podendo levar a paraparesia crural. O posicionamento inadequado da agulha pode atingir raízes raquidianas desencadeando parestesias (choques) nos territórios correspondentes às raízes atingidas (206,207).

Mesmo especialistas experientes podem não ter sucesso na realização da punção liquórica. A causa mais comum da dificuldade em coletar LCR é a presença de osteófitos, mas também podem ser listadas, entre outros, malformações da coluna vertebral, escolioses ou lordoses extremas, malformações occipito-vertebrais, agitação psicomotora, que é, inclusive, uma contraindicação à punção liquórica. Pode ocorrer no espaço subaracnóideo ser atingido e não haver a saída de LCR (punção branca). Esta situação pode ocorrer nas aracnoidites, nas hipotensões liquóricas e no preenchimento do fundo de saco lombar ou da cisterna magna por um processo expansivo, tipo neoplasia, cisto ou granuloma (203,208).

A análise do líquido inicia-se no momento da coleta com a verificação das pressões. Posteriormente, efetua-se a contagem global do número de células presentes e a determinação das diferentes populações celulares encontrados. Uma vez que a quantidade de células é, habitualmente, baixa no LCR, para a análise específica dos tipos celulares deve se lançar mão de técnicas como a citocentrifugação e a citometria de fluxo (203).

A introdução de tecnologia automatizada permite, em curto espaço de tempo e com maior precisão, a determinação dos teores de proteínas, glicose, lactato, enzimas, pigmentos entre outros.



A Tabela 4 descreve os valores de referência da análise laboratorial do LCR.

**Tabela 4 - LCR- Valores de Referências**

<b>Parâmetro</b>	<b>Valor de referência</b>
<b>Cor</b>	Incolor
<b>Aspecto</b>	Límpido
<b>Proteínas totais</b>	Adultos: 15 - 45 mg/dl Adultos > 60 anos: 15 - 60 mg/dl Neonatos: 15 - 100 mg/dl
<b>Albumina</b>	10 - 30 mg/dl
<b>Glicose</b>	50 - 80 mg/dl
<b>Ácido láctico</b>	9,0 - 26,0 mg/dl; 1,13 - 3,23 mmol/l
<b>Cloretos</b>	115 - 130 mmol/l
<b>LDH</b>	0 - 25 U/l LDH 1 > LDH 2 > LDH 3 > LDH 4 > LDH 5
<b>Glutamina</b>	15 - 20 mg/dl
<b>Leucócitos</b>	< 1 ano: 0 - 30 / $\mu$ l 1 a 4 anos: < 20 / $\mu$ l 5 anos até puberdade: < 10 / $\mu$ l Adultos: 0 - 5 / $\mu$ l
<b>Citologia diferencial</b>	Adultos Linfócitos: 60% $\pm$ 20% Monócitos: 30% $\pm$ 15% Neutrófilos: 2% $\pm$ 4% Neonatos Linfócitos: 20% $\pm$ 15% Monócitos: 70% $\pm$ 20% Neutrófilos: 4% $\pm$ 4%

**Fonte:** KJELDSBERG, KNIGHT (209).

O diagnóstico de processos infecciosos do SNC é sem dúvida alguma a principal indicação de exame do LCR. A análise dos resultados obtidos no exame do LCR deve ser sempre feita em conjunto e tendo como base a sintomatologia apresentada pelo paciente.

O padrão liquórico nas infecções do SNC depende de algumas variáveis, como tempo de evolução, agente etiológico, atividade imunológica do SNC e integridade da barreira hematoencefálica (BHE). Em linhas gerais existe, em maior ou menor grau, aumento da pressão liquórica, aumento do número de células e alterações de ordem bioquímica (203,210,211).

Classicamente, os processos infecciosos podem ser divididos de acordo com o período de evolução em agudos, subagudos e crônicos. Na fase aguda, o LCR mostra uma resposta celular com pleocitose, presença de neutrófilos e eosinófilos e uma resposta humoral caracterizada pela quebra da BHE e consequente aumento dos teores de albumina. Na fase crônica, a resposta celular é pouco intensa, a BHE já se refez e existe produção intratecal de anticorpos específicos com aumento dos teores de globulinas gama (203, 210, 211).

Além das características gerais e inespecíficas, o diagnóstico de vários agentes infecciosos no LCR pode ser feito diretamente, através da detecção de antígenos ou partículas genômicas por biologia molecular, aglutinação em látex e cultura, ou, indiretamente, através da determinação de anticorpos, por imunofluorescência indireta, hemaglutinação passiva, ensaio imunoenzimático (ELISA) (203, 205, 212).

O exame de LCR sozinho não é específico. A tecnologia da PCR foi utilizada para ajudar a diagnosticar doença neurológicas produzida por enterovírus e herpesvírus e garantir a especificidade (213).

### **3.11. DIAGNÓSTICO DE INFECÇÕES VIRAIS NO SISTEMA NERVOSO**

Através do EFNS-ENS, publicado em 2012, no European Journal of Neurology, para o uso da tecnologia da PCR no diagnóstico de infecções no sistema nervoso, várias recomendações específicas são feitas:

1. A PCR não somente permite um diagnóstico específico em um paciente individual, mas também pode definir o espectro da doença causada por um vírus em particular, geralmente por análise retrospectiva, tal como a moderada e atípica encefalite causada pelo herpesvírus simples;

2. A PCR pode ser utilizada em um grande número de amostras clínicas e pode auxiliar na definição da frequência do vírus causador de determinada infecção neurológica;
3. A PCR tem aumentado o diagnóstico definitivo do vírus, mostrando que um paciente com uma PCR positiva pode ter um diagnóstico definitivo de infecção viral no SN 88 vezes mais quando comparado a um paciente com PCR negativo;
4. O tempo de coleta e a estocagem são fundamentais para um diagnóstico de PCR, por isso é importante este aspecto;
5. Mais recentemente, as pesquisas de vários vírus podem ser feitas na mesma amostra ou em outra amostra usando a PCR multiplex, ao qual vários pares de primers específicos para sequências virais são utilizadas;
6. Fatores na avaliação dos resultados da PCR no LCR são a sensibilidade e a especificidade do método em particular, denotando a possibilidade de resultados falso positivos ou falso negativos.
7. Em alguns casos, a técnica da PCR quantitativa em tempo real tem sido aplicada e determina a carga viral no sangue ou LCR do paciente;
8. Embora a PCR deva ser realizada em amostras de LCR, ela pode ser realizada em outros tecidos, como sangue periférico, cérebro e outras amostras de tecido biopsiado.

A Tabela 5 mostra as recomendações para o uso da técnica da PCR no diagnóstico das infecções no SN.

**Tabela 5** - Recomendações para o Uso de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) no diagnóstico de infecções virais no sistema nervoso (SN).

<b>Vírus</b>	<b>Sensibilidade e Especificidade PCR no LCR</b>	<b>Classe de Evidência e Nível de Recomendação</b>
<b>Encefalite pelo HSV-1</b>	96% e 99% (Tebas, Nease e Storch, 1998)	Classe 1, Nível A Pode ocorrer falsos negativos durante os primeiros 3 dias
<b>Varicela-Zoster (VZV)</b>	80% e 98% (Corral et al., 2003)	Classe III, Nível C IgG-anti-VZV no LCR é mais sensível do que a PCR em vasculopatia pelo VZV
<b>Citomegalovírus Humano (HCMV)</b>	92% e 94% (Gozlan et al., 1995)	Classe II, Nível B PCR quantitativa pode ser também clinicamente útil
<b>Epstein-Barr (EBV)</b>	97%–100% e 98,5% (D'Arminio Montforte et al., 1997; Cinque et al., 1993; Cinque et al., 1996)	Classe IV, Nível C PCR quantitativa pode ser também clinicamente útil
<b>Enterovírus</b>	31%–95% e 92%–100% (Romero, 1999; DeBiasi & Taylor, 1999; Pérez-Vélez et al., 2007)	Classe II, Nível B PCR quantitativa pode ser também clinicamente útil
<b>JC vírus (JCV)</b>	50%–82% e 98,5%–100% (Weber et al., 1994; Weber et al., 1997; Hirsch et al., 1998)	Classe II, Nível B PCR quantitativa pode ser também clinicamente útil
<b>Vírus da imunodeficiência humana (HIV)</b>	Diagnóstico já realizado no sangue	Carga viral no LCR: uma ferramenta útil na avaliação do envolvimento neurológico
<b>Vírus de células T humano Linfotrópicas (HTLV-1)</b>	75%–99.4% e 98.5% (DeBiasi e Taylor, 1999; Andrade et al., 2010)	Classe III, Nível C A combinação de PCR no LCR e índice de anticorpos anti-HTLV-1 são úteis no diagnóstico

**Abreviaturas:** LCR: líquido cefalorraquidiano; IgG: imunoglobulina G; JC: John Cunningham; PCR: reação em cadeia da polimerase (214).

### 3.12. TRATAMENTO DAS INFECÇÕES VIRAIS

Apesar dos avanços das terapias antivirais, a encefalite causada pelo HSV-1 é uma das mais devastadoras infecções do SN com uma taxa de mortalidade acima de 20%, sendo que 50% dos sobreviventes apresentam sequelas neurológicas graves (215). As sequelas mais comuns apresentadas por crianças que sobrevivem às encefalites virais são dificuldades cognitivas, motores e sensoriais, epilepsias, problemas comportamentais e transtornos psiquiátricos (216).

O aciclovir é a droga de escolha no tratamento do herpes simples. É um análogo acíclico do nucleosídeo 2'-deoxiguanosina. Age como inibidor seletivo da replicação do HSV, sendo administrada sob a forma de pró-droga inativa. Sua posterior fosforilação (monofosfato de aciclovir) é efetuada por uma enzima viral, conhecida como timidina quinase. Esse novo composto volta a ser fosforilado pelas enzimas celulares, transformando-se, finalmente, na forma ativada (trifosfato de aciclovir) (217). A droga ativada concentra-se apenas nas células infectadas, reduzindo os efeitos colaterais observados em antivirais mais antigos. O aciclovir trifosforilado inibe, especificamente, a replicação do DNA do HSV ao competir com o trifosfato de desoxiguanosina pela DNA polimerase viral. A molécula de aciclovir é ligada ao genoma do HSV através da DNA polimerase; a ausência do grupo 3'-hidroxila impede a incorporação dos novos nucleotídeos necessários para a síntese da cadeia de DNA viral, efetuando assim sua terminação obrigatória (218,219).

A utilização racional do aciclovir indica que este deva ser empregado em todos os casos de infecção primária herpética e nos casos graves, especialmente o herpes neonatal e a encefalite herpética.

O foscarnet (ácido fosfonofórmico trissódico) é a opção no caso dos HSV resistentes ao aciclovir, sendo eficaz na destruição dos vírus desprovidos da timidina quinase. O foscarnet deve ser instituído 10 dias após a utilização ineficiente do aciclovir e mantido até a cura clínica (217,218).

A terapia antiviral com aciclovir impede a progressão da varicela e de sua forma visceral, compensando a diminuição da resposta do hospedeiro em

imunocomprometidos. A mortalidade por varicela é diminuída principalmente porque pneumonia por VZV não ocorre ou é impedida (220). Estudos comprovaram que esta terapia antiviral tem mudado dramaticamente o prognóstico da varicela em crianças de alto risco, diminuindo a taxa de mortalidade de 7 a 10% para poucas ou nenhuma. Para melhor eficácia do tratamento, o aciclovir em imunocomprometidos deve ser iniciado dentro de 24 a 72 horas após o início da erupção cutânea. Terapia com aciclovir precoce também reduz a gravidade da varicela cutânea exantema, o que pode reduzir o risco de infecções bacterianas secundárias.

Tratamento com aciclovir por via intravenosa é indicado para imunocompetentes, bem como pacientes de alto risco com varicela que têm pneumonia, hepatite, trombocitopenia ou encefalite (221).

Pacientes imunocompetentes e imunocomprometidos com herpes zoster, que foram tratados dentro de 72 horas após o início da lesão obtiveram um ótimo resultado com a terapia antiviral (222,223).

A dor neuropática aguda, que geralmente acompanha reativação do VZV em indivíduos saudáveis com mais de 50 anos de idade também foi menos grave em pacientes tratados com aciclovir, na maioria dos ensaios clínicos.

Ao contrário dos vírus herpes simplex, não existem fármacos disponíveis para o tratamento de infecção pelo EBV. Este fato ocorre devido à ausência de uma timidina-quinase codificada por este vírus (drogas tais como o aciclovir que são ativas contra herpes simplex é ativado pela timidina-quinase viral).

Uma vacina ainda está sendo desenvolvida (47,123). Já na encefalite causada pelo EBV não há relatos clínicos para determinar um esquema para o tratamento do mesmo. Existem relatos do uso de ganciclovir com sucesso no tratamento de encefalite por EBV em pacientes submetidos a transplante de medula óssea e em imunocompetentes. Até o momento, não se pode recomendar tratamento específico (13).

As drogas disponíveis para tratar encefalite causada por HCMV são Ganciclovir, Foscarnet, Cidofovir e, mais recentemente o Valganciclovir.

Tradicionalmente, o tratamento da encefalite por HCMV é feito com Ganciclovir e Foscarnet, aprovados pelo FDA (Food and Drugs Administration). Ambas as drogas possuem pouca biodisponibilidade oral e elevada toxicidade. Agem de forma virustática, ou seja, inibindo a replicação viral enquanto são administradas (13,100).

A suscetibilidade do HHV-6 a antivirais é semelhante à do HCMV, sendo suscetível a ganciclovir, foscarnet e cidofovir. No entanto, estudos prospectivos da terapia antiviral são necessários para elucidar completamente qualquer benefício potencialmente clínico em pacientes com HHV-6 e doenças neurológicas relacionadas.

O ganciclovir inibe a replicação do HHV-6 *in vitro*, embora inconsistentemente, Foscarnet e o Cidofovir ambos têm atividade contra o HHV-6, mas o vírus tem pouca ou nenhuma sensibilidade *in vitro* para timidina quinase - drogas dependentes, como o aciclovir (224).

Há relatos de casos de pacientes na literatura de que o tratamento da encefalite por HHV-6 com ganciclovir é seguido por uma diminuição progressiva da carga viral do HHV-6 no LCR (13).

Até a presente data não houve ensaios clínicos controlados com a terapia antiviral contra HHV-7. As drogas que podem ser eficazes são: foscarnet, ganciclovir e cidofovir, todos têm efeitos colaterais graves. Por conseguinte, existem recomendações específicas para sua utilização no paciente imunocompetente, exceto em situações potencialmente fatais (133).

Os estudos clínicos de famciclovir e valaciclovir indicam que esses novos agentes são tão eficazes como o aciclovir para o tratamento de herpes zoster agudo em indivíduos imunocompetentes (225-227).

### **3.13. DIAGNÓSTICO DAS INFECÇÕES HERPÉTICAS NO SISTEMA NERVOSO**

A PCR no LCR tem revolucionado o diagnóstico de infecções virais do sistema nervoso, particularmente aquelas causadas por herpesvírus humanos (50).

O diagnóstico laboratorial para o HSV-1 tem aplicação complementar para as manifestações comuns causadas pelo vírus (vesículas oro labiais), embora seja importante para indivíduos imunocomprometidos, transplantados e neonatos e em suspeitas de encefalite.

Em todos os casos é necessário o desenvolvimento de técnicas diagnósticas mais rápidas e sensíveis que possam detectar o vírus em tecidos diferentes e em pequenas quantidades (9,228).

As avaliações sorológicas são úteis no diagnóstico diferencial dos herpesvírus, contudo, a PCR apresenta sensibilidade de 98% no diagnóstico da infecção herpética ou eritema polimorfo induzido pelo HSV-1 (39,229).

A PCR do LCR é o método de diagnóstico de escolha para a HSV -2, mas os resultados negativos têm que ser interpretados no contexto da apresentação clínica do paciente e do momento da amostragem do LCR.

A cultura do LCR para este vírus é de pouco valor em todos os pacientes. Medições de anticorpos no LCR (intratecal) não são recomendadas para fins de diagnóstico. No entanto, a demonstração de uma resposta de anticorpos anti-HSV intratecal pode ser útil no diagnóstico retrospectivo ou nos casos em que PCR no LCR é negativo.

Medições de anticorpos séricos de HSV não são de utilidade no diagnóstico de encefalites por HSV-2 em adultos. Em crianças e adultos jovens, a sorologia pode ajudar a definir se o HSV-2 é parte de uma infecção primária ou uma infecção reativada, embora as características clínicas, terapia e prognóstico dessas duas formas de encefalite pelo HSV sejam semelhantes (59).

Métodos de hibridização e PCR são sensíveis e específicos para a detecção de VZV em espécimes clínicos de doentes com infecções de VZV primários ou recorrentes, sendo geralmente mais sensível que a cultura viral, mas é necessária a normalização destes métodos para evitar resultados falso-



positivos. Uma análise cuidadosa da condição clínica do paciente se faz necessária, assim como a correlação com o estado clínico do paciente (230).

Na mononucleose infecciosa, esfregaço de sangue mostram os linfócitos atípicos (células de Downey). Há também testes sorológicos disponíveis. Anticorpos heterófilos são produzidos pelas células sem proliferação (123).

A PCR detectou DNA de EBV no LCR de pacientes com encefalite (231), mielite (232) e neuropatia (87). As pesquisas de anticorpos heterófilos geralmente são negativas nos casos de infecção do SN por EBV. Em termos de sorologia, o ideal é usar anticorpo anticapsídeo viral IgG e IgM (anti-VCA IgG e IgM). A presença de anti-VCA IgM no LCR é evidência de provável de encefalite por EBV, persistindo positivo por alguns meses. Aparentemente, a infecção latente pelo EBV não produz PCR positivo no LCR, porém há relatos de falso-positivo em outras encefalites virais e bacterianas (13).

Há vários métodos para a detecção do HCMV. O diagnóstico, que antigamente era apenas baseado em dados clínicos, atualmente apresenta sofisticação nas técnicas laboratoriais. O isolamento viral em cultura de fibroblastos humanos é o método convencional. O vírus geralmente está presente na urina com elevados títulos, principalmente na infecção congênita sintomática por HCMV, e as culturas são comumente positivas após 3 a 5 dias (100).

A PCR para detecção do HCMV costuma ser o melhor diagnóstico, com sensibilidade de 79 - 95 % (13). Pode ser utilizado tanto qualitativamente (diagnóstico por PCR), quanto quantitativamente na medição da carga viral, que é proporcional ao nível de DNA do HCMV (233).

Atualmente, a detecção e quantificação de DNA de HHV-6 em fluidos biológicos, tais como soro, plasma e LCR, são consideradas como marcadores de infecção ativa pelo HHV-6. A sensibilidade do método é um problema muito importante, considerando que o HHV-6 geralmente pode ser detectado em amostras biológicas por causa da lise celular (234).

Vários métodos e diferentes materiais biológicos têm sido propostos para detectar a infecção ativa do HHV-7. A nested PCR utiliza materiais biológicos extraído a partir de soro ou plasma podendo ser usada para detectar apenas

infecção ativa (235,236), mas alguns autores sugeriram o uso de PCR quantitativo, tal como a PCR em tempo real (237).

A PCR foi o primeiro método usado para diagnosticar infecção pelo HHV-8 (238,239), posteriormente, foram desenvolvidos testes sorológicos de ensaio imunoenzimático (Elisa) e imunofluorescência indireta, baseados na expressão de antígenos do HHV-8 presentes em células infectadas, tendo como finalidade a detecção de anticorpos específicos para o HHV-8 (240).

A maioria dos estudos de detecção de DNA do HHV-8 utilizam métodos de PCR, e a hibridação *in situ* é utilizada para determinar células específicas que expressam o genoma do vírus (179).

Um diagnóstico etiológico rápido e confiável de infecção viral no SN podem ser úteis a fim de fornecer o agente causador e a conduta terapêutica antiviral adequada a ser utilizada.

### **3.14. INFECÇÃO ATIVA POR HERPESVÍRUS HUMANO EM INDIVÍDUOS IMUNOCOMPETENTES**

Atualmente, nota-se uma maior atenção aos pacientes imunocompetentes e idosos em relação às infecções causadas por vírus.

Raros são os trabalhos publicados a respeito, tendo em vista a análise da ocorrência da infecção causada pelos herpesvírus em pacientes imunocompetentes com sintomas de quadros neurológicos agudos.

Sendo assim, verificamos o papel que os herpesvírus humanos desempenham nas infecções do sistema nervoso em pacientes imunocompetentes, com foco nas hipóteses diagnósticas de infecção viral no sistema nervoso central e periférico. Com a detecção precoce da infecção ativa, o tratamento antiviral precoce poderá ser instituído para os vírus que existem antivirais disponíveis.

## *4. Casuística e Métodos*

### **4.1. CASUÍSTICA**

#### **4.1.1. DESENHO DO ESTUDO**

O estudo foi do tipo coorte transversal, não prospectivo, onde todas as análises foram feitas num único "momento", não existindo, portanto, período de seguimento dos indivíduos. As informações clínicas referem-se ao período agudo, por informações de prontuário da emergência e/ou no máximo nos primeiros dias de internação em enfermarias do Hospital de Clínicas, não sendo nosso objetivo o confronto com o diagnóstico final na alta hospitalar. Portanto, as amostras foram coletadas no momento da suspeita de infecção viral aguda e os dados foram obtidos nesta fase.

Foram analisadas amostras de sangue (plasma) e líquido cefalorraquidiano (líquor) de 52 pacientes imunocompetentes, com manifestações clínicas de infecções ativas virais no sistema nervoso, atendidos primeiramente pela Unidade de Emergência Referenciada (UER) do Hospital de Clínicas da Universidade Estadual de Campinas (HC/UNICAMP) e após, encaminhados ao Ambulatório ou Enfermaria de Neurologia/HC/UNICAMP para acompanhamento. O período de estudo foi de janeiro de 2008 a abril de 2012.

No Hospital de Clínicas da Unicamp, o protocolo para tratamento dos pacientes com suspeita de infecções virais neurológicas causadas por herpesvírus é o seguinte: Encefalite (HSV ou VZV): aciclovir 15 mg/kg a cada 8 horas, por 21 dias; HCMV: ganciclovir 5mg/kg a cada 12 horas, por 14 a 21 dias. Para todas as condições, terapia de suporte, sedação, etc.

Também não foi nosso objetivo transmitir os resultados dos testes diagnósticos para tratamento com antivirais neste primeiro momento. Porém, após o estudo, estes testes poderão ser utilizados no momento da suspeita clínica e os

resultados transmitidos imediatamente após execução do teste para otimização do tratamento.

#### **4.1.2. CRITÉRIOS PARA INCLUSÃO DOS PACIENTES**

1. Pacientes imunocompetentes, ou seja, os que não apresentavam doenças imunodepressoras, transplantados e os que não estavam em uso de corticosteroides;
2. Pacientes com suspeita de infecção viral no sistema nervoso central e periférico, sempre que houvesse quadros agudos de encefalites ou outros distúrbios neurológicos;
3. Pacientes a partir de 1 dia de idade;
4. Consentimento do paciente ou responsável para utilização das amostras de plasma e de LCR para análise;

#### **4.1.3. CRITÉRIO PARA DEFINIÇÃO DE INFECÇÃO ATIVA CAUSADA PELOS HERPESVÍRUS**

Nas amostras dos pacientes estudados, foi considerada como critério para definição de infecção ativa causada pelos herpesvírus humanos, a presença de **1 resultado de HHV-DNA positivo no LCR** pela técnica da Nested-PCR.

#### **4.1.4. CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO OU ENCERRAMENTO**

1. Foram excluídos os pacientes que não apresentaram suspeita de infecção viral no sistema nervoso (infecções causadas por fungos, parasitas ou bactérias), pacientes imunodeprimidos, com o vírus da imunodeficiência Humana (HIV), com doenças autoimunes e transplantados;
2. O estudo poderia sofrer descontinuidade se houvesse suspensão dos atendimentos aos pacientes no Hospital de Clínicas da FCM/UNICAMP;
3. O estudo foi encerrado quando houver um número de pacientes suficiente, para serem realizadas as análises conclusivas sobre os objetivos propostos.

## **4.2. AVALIAÇÕES CLÍNICAS E CLASSIFICAÇÃO DO QUADRO NEUROLÓGICO**

Os pacientes foram classificados de acordo com a sintomatologia apresentada durante o quadro agudo neurológico. Durante a avaliação clínica dos pacientes foram considerados todos os resultados apresentados pelos exames de Ressonância Magnética (RM), Tomografia Computadorizada (TC) e Eletroencefalografia (EEG), além da análise dos exames bioquímicos realizados no LCR pelo Serviço de Líquidos Biológicos do Laboratório de Patologia Clínica/FCM/UNICAMP.

As classificações da hipótese clínica inicial dos pacientes foram: encefalite, encefalopatia, meningite, meningoencefalite, epilepsia, plexopatia lombossacral, paralisia facial, síndrome cerebelar, mononeurite, polineuropatia, esclerose múltipla, parestesia, mielite e polirradiculopatia. Também foram observados sintomas como febre, cefaléia, alterações de consciência, déficits motores, alterações de comportamento, perda de memória, alterações da fala, confusão mental, convulsões, paralisia, dor abdominal, neuropatia, parestesia, sonolência, vômitos, fraqueza, perda de peso, mioclonia, alteração visual e lentificação. Esses dados foram obtidos a partir dos prontuários dos pacientes ou informados pela equipe médica.

## **4.3. ANÁLISE CRÍTICA DE RISCOS E BENEFÍCIOS**

Realizando uma análise inicial crítica do projeto, observa-se que os riscos para os pacientes foram nulo visto o rigoroso cuidado e assepsia quanto à coleta das amostras de plasma, realizadas pelo corpo de Enfermagem ou de Análises Clínicas, do Hospital de Clínicas da FCM/UNICAMP, ambos altamente qualificados na área.

A coleta de líquido, realizada por médicos neurologistas, como toda técnica invasiva, apresenta riscos inerentes ao próprio procedimento. Acidentes derivados da punção, com danos neurológicos, são raros e descritos apenas na punção suboccipital, podendo ocorrer, por exemplo, lesão de centro respiratório, cardíaco e hemorragia no espaço subaracnóideo. Na punção lombar poderiam

ocorrer dormências transitórias, dor local e, muito raramente, infecção; a incidência destas complicações é muito pequena.

As amostras de líquido foram provenientes de uma alíquota do material que FOI encaminhado aos líquidos biológicos do LPC/HC/UNICAMP para a execução da análise do líquido cefalorraquidiano, portanto, sua coleta não foi exclusiva para realização deste trabalho e sim um compartilhamento do material coletado. Esta amostra coletada e processada também foi utilizada para a pesquisa de bactérias e fungos e apresentando positividade para estes microrganismos, foram excluídas deste estudo.

Os benefícios deste projeto visaram um diagnóstico laboratorial precoce das infecções ativas herpéticas e um tratamento específico da doença causada por estes vírus neste e em outros grupos de pacientes e o resultado da pesquisa visou uma contribuição ao estudo destes herpesvírus e das interrelações entre eles, podendo agilizar o tratamento e evitar sequelas permanentes.

#### **4.4. MÉTODOS**

Foram realizadas coletas de amostras de plasma e LCR dos pacientes estudados, seguindo o protocolo da Neurologia/FCM/UNICAMP. As amostras de plasma foram coletadas em tubo EDTA (ácido etilenodiaminotetracético) e as amostras de líquido cefalorraquidiano foram coletadas por punção suboccipital ou lombar pela equipe de médicos.

Após utilização das amostras nos serviços de Bioquímica Clínica do Laboratório de Patologia Clínica do HC/UNICAMP, o restante do material foi imediatamente encaminhado ao Laboratório de Vírus da Faculdade de Ciências Médicas/UNICAMP, para a análise molecular, onde foram centrifugadas, transferidas para tubos tipo eppendorf de 1,5 ml e estocados em freezer a -80°C até o momento do uso.

#### **4.4.1. EXTRAÇÃO DE DNA DE PLASMA E DE LCR E REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE**

O material biológico plasma e LCR, foram separados em alíquotas para tubos tipo Eppendorf e para o início do processo de extração de DNA, foi utilizado em um kit de extração da marca QIAamp DNA Blood Mini Kit (Cologne, Germany), seguindo as especificações do fabricante.

O DNA foi extraído a partir de 200 µl da amostra (plasma e LCR) e o pellet resultante foi eluído em 20ul de tampão TE (Tris-EDTA) e a amostra armazenada em freezer até o momento do uso.

Foi utilizado o GoTaq® Green Master Mix, da Promega Corporation, USA , 2X: GoTaq DNA Polymerase, contendo um tampão 2X (pH 8.5), 400µM dATP, 400µM dGTP, 400µM dCTP, 400µM dTTP e 3mM MgCl<sub>2</sub>. Green GoTaq® Tampão de Reação é um tampão que contém um componente que aumenta a densidade da amostra e corantes azuis e amarelos, cuja função é carregamento do corante quando o produto da reação é analisado através do gel de agarose por eletroforese. As visualizações das bandas foram realizadas após a aplicação de 5 µl do produto amplificado na segunda PCR em gel de Agarose 2% em tampão TEB (TRIS-EDTA-BORATO), contendo 1,0 µg/ml de brometo de etídio e, submetida à eletroforese em imersão em tampão TEB por 30 minutos a 90 Volts. Após a corrida eletroforética, os géis foram colocados sob luz ultravioleta para a visualização das bandas amplificadas, usando um padrão de peso molecular de 100 pares de bases (DNA-Ladder, Gibco-BRL).

#### **4.4.2. DETECÇÃO DO DNA DO GENE DA BETA 2 - MICROGLOBULINA HUMANA**

A amplificação de um fragmento do gene da Beta 2 - Microglobulina (β2 - Microglobulina) humana foi utilizada para checar a qualidade do DNA em todas as amostras testadas assim como Schmittgentd, 2000 e colaboradores. O produto obtido foi de **102 pares de bases** indicando principalmente a presença de DNA nas amostras e que o DNA extraído é de boa qualidade, garantindo assim, um controle interno de qualidade do experimento, indispensável à segurança dos

resultados.

Foram completados 35 ciclos de amplificação para cada amostra e cada ciclo foi constituído por 3 etapas: a) separação das hélices de DNA por aquecimento a 94°C durante 30 segundos (desnaturação); b) ligação complementar entre os primers e o DNA em temperatura de 55°C por 30 segundos (anelamento); c) síntese do DNA pela *Taq* Polimerase, em temperatura de 72°C por 30 segundos (extensão). Os ciclos foram realizados automaticamente em equipamento apropriado (“DNA Thermal Cycler” - MJ, EUA). As amostras foram aquecidas inicialmente a 94°C por 4 minutos, para inativação de qualquer atividade de proteases que pudessem interferir com a reação enzimática e, após o último ciclo, o período de extensão final foi de 72°C por 10 minutos.

Foram utilizados dois iniciadores que flanqueiam uma região constante do gene da  $\beta 2$  - Microglobulina (Tabela 6).

**Tabela 6** - Sequência de primers que flanqueiam uma região conservada do gene da  $\beta 2$  - Microglobulina utilizados na PCR:

PRIMERS	SEQUÊNCIA (5' -3')
$\beta 2$ – Microglobulina 1	TCCCCCAAATTCTAAGCAGA
$\beta 2$ – Microglobulina 2	TCCAACATCAACATCTTGGT

#### 4.4.3. DETECÇÃO DOS GENES DOS HERPESVIRUS HUMANOS PELA REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE TIPO NESTED

As condições da reação e os primers (Tabela 7) seguiram a metodologia clássica da reação em cadeia da polimerase. As amplificações foram realizadas em um (“DNA Thermal Cycler” - MJ, EUA). Controles positivos e negativos para HSV-1, HSV-2, VZV, EBV, CMV, HHV-6 (A e B), HHV-7 e HHV-8 foram incluídos de forma sistemática a cada bateria de reações.



#### **4.4.3.1. NESTED PCR PARA DETECÇÃO DO DNA DO HSV-1**

A nested PCR para o HSV-1 seguiu o método descrito por DANISE *et al.*; 1997 (241), com algumas modificações. Através de 15 µl de reação final com 7,5 µl de PCR Master Mix (2X), 5,9 µl de água livre de DNA, 0,3 µl primers (10uM) e 1 µl de amostra, a PCR foi realizada com uma temperatura de desnaturação inicial de 95°C por 3 minutos, seguida de 20 ciclos de 30 segundos a 95°C, 30 segundos a 57°C (anelamento) e 1 minuto a 72°C (extensão), e extensão final de 72°C por 7 minutos. Na segunda PCR, utilizamos as seguintes condições: desnaturação inicial de 95°C por 5 minutos, seguida de 30 ciclos de 30 segundos a 95°C (desnaturação), 30 segundos a 57°C (anelamento) e 1 minuto a 72°C (extensão) e, extensão final de 72°C por 10 minutos. O produto final da nested PCR para HSV-1 nas amostras positivas foi de **138 pares de bases**.

#### **4.4.3.2. NESTED PCR PARA DETECÇÃO DO DNA DO HSV-2**

A nested PCR para a detecção do DNA do vírus HSV-2 seguiu o método descrito por DANISE *et al.*; 1997 (241), com algumas modificações. Através de 15 µl de reação final com 7,5 µl de PCR Master Mix (2X), 5,9 µl de água livre de DNA, 0,3 µl primers (10uM) e 1 µl de amostra. A PCR foi realizada com uma desnaturação inicial de 95°C por 3 minutos, seguida de 20 ciclos de 30 segundos a 95°C (desnaturação), 30 segundos a 57°C (anelamento) e 1 minuto a 72°C (extensão) e, extensão final de 72°C por 7 minutos. Na segunda PCR, utilizamos as seguintes condições: desnaturação inicial de 95°C por 5 minutos, seguida de 30 ciclos de 30 segundos a 95°C (desnaturação), 30 segundos a 57°C (anelamento) e 1 minuto a 72°C (extensão) e, extensão final de 72°C por 10 minutos. O produto final da nested PCR para HSV-2 foi de **101 pares de bases**.

#### **4.4.3.3. NESTED PCR PARA DETECÇÃO DO DNA DO VZV**

A nested PCR seguiu o método descrito por DANISE *et al.*; 1997 (241), com algumas modificações. Através de 15 µl de reação final com 7,5 µl de PCR Master Mix (2X), 5,9 µl de água livre de DNA, 0,3 µl primers (10uM) e 1 µl de amostra. A PCR foi realizada com uma desnaturação inicial de 95°C por 3 minutos, seguida de 20 ciclos de 30 segundos a 95°C (desnaturação), 30

segundos a 57°C (anelamento) e 1 minuto a 72°C (extensão) e, extensão final de 72°C por 7 minutos. Na segunda PCR, utilizamos as seguintes condições: desnaturação inicial de 95°C por 5 minutos, seguida de 30 ciclos de 30 segundos a 95°C (desnaturação), 30 segundos a 57°C (anelamento) e 1 minuto a 72°C (extensão) e, extensão final de 72°C por 10 minutos. O produto final da nested PCR para VZV foi de **266 pares de bases**.

#### **4.4.3.4. NESTED PCR PARA DETECÇÃO DO DNA DO EBV**

A nested PCR seguiu o método descrito por CINQUE *et al.*; 1993, (242) com algumas modificações. Através de 15 µl de reação final com 7,5 µl de PCR Master Mix (2X), 5,9 µl de água livre de DNA, 0,3 µl primers (10U<sub>m</sub>) e 1 µl de amostra. A PCR foi realizada com uma desnaturação inicial de 95°C por 3 minutos, seguida de 40 ciclos de 30 segundos a 95°C (desnaturação), 30 segundos a 60°C (anelamento) e 1 minuto a 72°C (extensão) e, extensão final de 72°C por 7 minutos. Na segunda PCR, utilizamos as seguintes condições: desnaturação inicial de 95°C por 2 minutos, seguida por 30 ciclos de 30 segundos a 95°C (desnaturação), 30 segundos a 60°C (anelamento) e 1 minuto a 70°C (extensão) e, extensão final de 68°C por 7 minutos. O produto final da nested PCR para EBV foi de **209 pares de bases**.

#### **4.4.3.5. NESTED PCR PARA DETECÇÃO DO DNA DO HCMV**

A nested PCR seguiu o método descrito por EHRNST *et al.*; 1995, (243) com algumas modificações. Através de 15 µl de reação final com 7,5 µl de PCR Master Mix (2X), 5,9 µl de água livre de DNA, 0,3 µl primers (10uM) e 1 µl de amostra. A PCR foi realizada com uma desnaturação inicial de 95°C por 3 minutos, seguida de 40 ciclos de 30 segundos a 95°C (desnaturação), 30 segundos a 55°C (anelamento) e 1 minuto a 72°C (extensão) e, extensão final de 72°C por 10 minutos. Na segunda PCR, utilizamos as seguintes condições: desnaturação inicial de 95°C por 2 minutos, seguida de 30 ciclos de 30 segundos a 95°C (desnaturação), 45 segundos a 57°C (anelamento) e 1 minuto a 72°C (extensão) e, extensão final de 72°C por 10 minutos. O produto final da nested PCR para HHV-5 foi de **167 pares de bases**.

#### 4.4.3.6. NESTED PCR PARA DETECÇÃO DO DNA DO HHV-6 (tipo A e B)

A nested PCR seguiu o método descrito por WANG *et al.*; 1996 (244), com algumas modificações (Tabela 3). Através de 15 µl de reação final com 7,5 µl de PCR Master Mix (2X), 5,9 µl de água livre de DNA, 0,3 µl primers (10uM) e 1 µl de amostra. A PCR foi realizada com uma desnaturação inicial de 95°C por 3 minutos, seguida de 40 ciclos de 30 segundos a 95°C (desnaturação), 30 segundos a 56°C (anelamento) e 1 minuto a 72°C (extensão) e, extensão final de 72°C por 7 minutos. Na segunda PCR, utilizamos as seguintes condições: desnaturação inicial de 95°C por 3 minutos, seguida de 30 ciclos de 1 minuto a 95°C (desnaturação), 1 minuto a 62°C (anelamento) e 1 minuto a 72°C (extensão) e, extensão final de 72°C por 10 minutos. O produto final da nested PCR para HHV-6 (A) foi de **195 pares de bases** e HHV-6 (B) foi de **423 pares de bases**.

#### 4.4.3.7. NESTED PCR PARA DETECÇÃO DO DNA DO HHV-7

A nested PCR seguiu o método descrito por YALCIN *et al.*; 1994, (245) com algumas modificações. Através de 15 µl de reação final com 7,5 µl de PCR Master Mix (2X), 5,9 µl de água livre de DNA, 0,3 µl primers (10um) e 1 µl de amostra. A PCR foi realizada com uma desnaturação inicial de 95°C por 3 minutos, seguida de 40 ciclos de 45 segundos a 95°C (desnaturação), 45 segundos a 57°C (anelamento) e 1 minuto a 72°C (extensão) e, extensão final de 72°C por 10 minutos. Na segunda PCR, utilizamos as seguintes condições: desnaturação inicial de 95°C por 3 minutos, seguida de 30 ciclos de 45 segundos a 95°C (desnaturação), 45 segundos a 55°C (anelamento) e 1 minuto a 72°C (extensão) e, extensão final de 72°C por 10 minutos. O produto final da nested PCR para HHV-7 foi de **264 pares de bases**.

#### 4.4.3.8. NESTED PCR PARA DETECÇÃO DO DNA DO HHV-8

A nested PCR para HHV-8 seguiu o método descrito por CHAN *et al.*; 2000 (73), com algumas modificações (Tabela 7). Através de 15 µl de reação final com 7,5 µl de PCR Master Mix (2X), 5,9 µl de água livre de DNA, 0,07µM de cada primer e 1 µl de DNA extraído. A PCR foi realizada com uma desnaturação inicial

de 94°C por 4 minutos, seguida de 30 ciclos de 1 minuto a 94°C (desnaturação), 1 minuto a 55°C (anelamento) e 1 minuto a 72°C (extensão) e, extensão final de 72°C por 8 minutos. Na segunda PCR, utilizamos as seguintes condições: desnaturação inicial de 94°C por 4 minutos, seguida de 30 ciclos de 1 minuto a 94°C (desnaturação), 30 segundos a 55°C (anelamento) e 1 minuto a 72°C (extensão) e, extensão final de 72°C por 8 minutos. O produto final da nested PCR para HHV-8 foi de **213 pares de bases** (gene ORF 25).

**Tabela 7:** Sequência de primers que flanqueiam regiões conservadas dos genes para detecção do DNA dos herpesvírus humanos (utilizados na PCR e nested PCR).

Primers	Sequência (5' -3')	Fragmentos Amplificados
Primers externos <b>HSV-1</b> <b>HSV-1</b>	ATCACGGTAGCCCGGCCGTGTGACA CATACCGGAACGCACCACACAA	221 pb
Primers internos <b>HSV-1</b> <b>HSV-1</b>	Sequência (5' -3') TACCGACCACACCGACGA GGTAGTTGGTTCGCTGCTGAA	138 pb
Primers externos <b>HSV-2</b> <b>HSV-2</b>	Sequência (5' -3') TCAGCCCATCCTCCTTCGGCAGTA GATCTGGTACTCGAATGTCTCCG	187 pb
Primers internos <b>HSV-2</b> <b>HSV-2</b>	Sequência (5' -3') AGACGTGCGGGTCGTACACG <b>GGCGCGGTCCCAGATCGGCA</b>	101 pb
Primers externos <b>VZV</b> <b>VZV</b>	Sequência (5' -3') TCCACGTATGACTCTCTCAC <b>GATCAGACACATGACGAATC</b>	375 pb
Primers internos <b>VZV</b> <b>VZV</b>	Sequência (5' -3') ATGTCCGTACAACATCAACT <b>CGATTTTCCAAGAGAGACGC</b>	266 pb
Primers externos <b>EBV</b> <b>EBV</b>	Sequência (5' -3') AAGGAGGGTGGTTTGGAAAG AGACAATGGACTCCCTTAGC	297 pb
Primers internos <b>EBV</b> <b>EBV</b>	Sequência (5' -3') ATCGTGGTCAAGGAGGTCC ACTCAATGGTGTAAAGACGAC	209 pb
Primers externos <b>CMV</b> <b>CMV</b>	Sequência (5' -3') ATGGAGTCCTCTGCCAAGAG CAATACACTTCATCTCCTCG	310 pb
Primers internos <b>CMV</b> <b>CMV</b>	Sequência (5' -3') GTGACCAAGGCCACGACGTT TCTGCCAGCACATCTTTCTC	167 pb

Primers externos <b>HHV-6</b> <b>HHV-6</b>	Sequência (5' -3') CAAGCCCTAACTGTGTATGT TCTGCAATGTAATCAGTTTC	(A) 325 pb (B) 553 pb
Primers internos <b>HHV-6</b> <b>HHV-6</b>	Sequência (5' -3') CTGGGCGGCCCTAATAACTT ATCGCTTTCACCTCATAAG	(A) 195 pb <b>(B) 423 pb</b>
Primers externos <b>HHV-7</b> <b>HHV-7</b>	Sequência (5' -3') AGTTCCAGCACTGCAATCG CACAAAGCGTCGCTATCAA	388 pb
Primers internos <b>HHV-7</b> <b>HHV-7</b>	Sequência (5' -3') CGCATACACCAACCCTACT GACTCATTATGGGGATCGAC	264 pb
Primers externos <b>HHV-8</b> <b>HHV-8</b>	Sequência (5' -3') AGGCAACGTCAGTGAATGC GAAATTACCCACGAGATCGA	328 pb
Primers internos <b>HHV-8</b> <b>HHV-8</b>	Sequência (5' -3') CATGGGAGTACATTGTGTCAGGACCTC GGAATTATCCAGTCGCAGGTTGCC	213 pb

## 4.5. SEQUENCIAMENTO

A reação de sequenciamento foi realizada através do método de Sanger, 1979 e foi utilizado o Kit “*Big Dye Terminator* versão 3.1”. O produto da nested PCR obtido para os diferentes vírus estudados foi submetido às seguintes etapas:

### 4.5.1. PURIFICAÇÃO

Esta etapa é exigida, pois garante a remoção de oligonucleotídeos e dNTPs que podem interferir na reação de sequenciamento. Em cerca de 10µL do produto amplificado foi adicionado 0,4 µL de ExoSAP-IT da Affymetrix, para purificação do produto da PCR a 37°C, durante 30 minutos. Posteriormente o material foi mantido a 80°C durante mais 15 minutos em termociclador automático.

### 4.5.2. REAÇÃO DE SEQUENCIAMENTO

A etapa seguinte consiste na reação de sequenciamento propriamente dita com: 1,0 µL do produto da amplificação purificado (dependendo da quantidade de DNA vista em gel com Low Mass), 1,0 µL de primer (1,6 µM), 0,5 µL de Big Dye Terminator versão 3.1 e água Milli-Q para completar para 5 µL. A amostra foi mantida em termociclador nos seguintes programas: 96°C durante 60 segundos, 96°C durante 10 segundos, 50°C por 5 segundos e 60°C durante 4 minutos, perfazendo um total de 25 ciclos. Após esta etapa, o material foi lavado com 5 µL

de EDTA 125 mM, 60 µL de álcool 10% e incubado por 15 minutos em temperatura ambiente. Em seguida foi centrifugado a 13.000 rpm por 30 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e então adicionados 60 µL de álcool 60% e centrifugado a 13.000 rpm por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi removido e o material foi seco em temperatura ambiente ou a 55°C em banho seco por 20 minutos.

Adicionaram-se 10 µL de Hi-Di Formamida ao produto obtido, ao qual foi incubado por 95°C por 2 minutos. O material foi colocado imediatamente no gelo e as amostras transferidas para a placa de 96 poços. As amostras foram sequenciadas em ABI Prism 3100 – da Applied Biosystems, Walton, Massachusetts, California, USA, com utilização do software Start 3100 Data Collection Softwares.

O alinhamento das sequências foi realizado utilizando o software ATSQ. As sequências obtidas foram analisadas pelo BLAST e a leitura comparada com as sequências descritas no Banco de Dados do GeneBank (246).

#### **4.6. CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS E LABORATORIAIS**

As características clínicas e achados laboratoriais dos pacientes (n=52) foram obtidas nos prontuários médicos e no sistema informatizado de laudos do HC/UNICAMP. As características de alguns pacientes não foram disponibilizadas e, portanto, quando descritas neste trabalho, apresentam uma amostragem menor do que o número total de pacientes.

#### **4.7. ANÁLISES ESTATÍSTICAS**

As variáveis foram estudadas de maneira descritiva, através do cálculo de frequências absolutas e relativas, e no caso das variáveis contínuas, através do cálculo de média, desvio padrão, percentis (25% e 75%), mediana, valores de mínimo e máximo. As diferenças das médias das variáveis categóricas entre os grupos foram avaliadas através do teste de Fisher.

Sensibilidade, especificidade e valores preditivos positivos e negativos foram obtidos como descrito previamente (247). Dados para o estudo de

concordância entre os testes foram analisados utilizando o teste de McNemar. A análise estatística foi feita com auxílio do programa SPSS 16.0. Foi adotado o limite de significância de  $p \leq 0,05$  para as análises e testes estatísticos, ou seja, o p-valor inferior a 0,05 confirmando a significância das análises.

#### **4.8. CUIDADOS ESPECIAIS PARA EVITAR CONTAMINAÇÃO DAS AMOSTRAS DURANTE A REAÇÃO DA PCR**

- As amostras a serem amplificadas foram manipuladas em salas diferentes (sala pré-PCR) de onde a amplificação foi realizada (sala pós-PCR);
- Todos os reagentes e materiais pré-PCR e pós-PCR foram preparados e utilizados em ambientes diferentes;
- Antes da abertura dos tubos de microcentrifuga, foi efetuada rápida centrifugação para concentrar o líquido contido no tubo na região inferior e evitar a dispersão dos aerossóis;
- Todo material plástico (ponteiras e tubos plásticos para PCR) utilizado foi novo e autoclavado;
- Trocas constantes de luvas foram feitas durante todo procedimento;
- Lavagem das mãos constantes foram realizadas.

#### **4.9. BIOSSEGURANÇA**

O laboratório está atuando desde o dia vinte e nove de abril do ano de dois mil e oito de acordo com as Normas da Vigilância Sanitária e está adequado para o funcionamento através da emenda que estabelece o regulamento Técnico de Produtos para Diagnóstico de uso *in vitro* e seu registro, cadastramento, e suas alterações, revalidações e cancelamento, tendo como órgão emissor a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) através da Resolução RDC 206, de 17 de novembro de 2006 e RDC 302 de 13 de outubro de 2005.

### **Precauções Padrão:**

Para o desenvolvimento do trabalho, entramos em contato com material biológico. Estes materiais biológicos, ou seja, sangue e outros fluídos corporais podem alojar microrganismos e por isso consideramos estes fluídos contaminados por agentes transmissores de doenças. Sempre devemos estar conscientes da importância de proteção na manipulação destes materiais, artigos, resíduos e ambientes. Para isso, utilizamos as precauções padrão:

- Uso sistemático de EPIs (equipamentos de proteção individual), de acordo com os procedimentos a serem realizados e específicos para este fim;
- Atenção para riscos ao manipular, preparar, recolher, transportar ou limpar materiais perfuro-cortantes usados;
- Cuidados ao desprezar material perfuro-cortante de único uso em contentor adequado (EPC – equipamento de proteção coletiva) e descarte sistematizado de material usado, de acordo com as NRs (Normas Regulamentadoras de Segurança no Trabalho).



## *5. Resultados*

### **5.1. CARACTERÍSTICAS DOS PACIENTES, DADOS CLÍNICOS E RESULTADOS DA PESQUISA DO DNA DOS HHV NOS PACIENTES ESTUDADOS**

As características dos pacientes, as hipóteses diagnósticas iniciais, as infecções positivas e negativas causadas pelos HHV detectadas pelo teste de nested PCR no LCR estão apresentadas na Tabela 9. As idades variaram de 1 dia (recém-nascido) até 74 anos de idade (mediana de 23 anos).

Em 27/52 (52%) dos pacientes, o DNA de herpesvírus foi detectado em pelo menos uma amostra de LCR.

A ocorrência de **monoinfecção** (um tipo de DNA de HHV encontrado na amostra) ocorreu em 10/52 (19%); a ocorrência de **coinfecção** (dois ou mais DNAs de HHV na mesma amostra) ocorreu em 17/52 (33%) dos pacientes infectados (Tabela 8).

**Tabela 8.** Características dos pacientes, hipótese clínica inicial e infecções positivas e negativas causadas pelos HHV detectada pela nested PCR no LCR.

<b>Características</b>		<b>(n = 52)</b>		
<b>Idade, mediana (variação) anos</b>		23.0 (0,1 – 74.4)		
<b>Sexo, M/F (%)</b>		25/27 (48 /52)		
<b>Hipótese Inicial</b>	<b>n (%)</b>	<b>Monoinfecção Positiva</b>	<b>Coinfecção Positiva</b>	<b>Infecção Negativa</b>
<b>Encefalite</b>	22 (42.3)	4	11	7
<b>Encefalopatia</b>	13 (25)	2	2	9
<b>Meningite</b>	3 (5.8)	-	1	2
<b>Meningoencefalite</b>	3 (5.8)	1	1	1
<b>Convulsões</b>	2 (3.8)	-	-	2
<b>Plexopatia Lombossacral</b>	1 (1.9)	1	-	-
<b>Paralisia Facial</b>	1 (1.9)	-	1	-
<b>Síndrome Cerebelar</b>	1 (1.9)	1	-	-
<b>Mononeurite</b>	1 (1.9)	-	-	1
<b>Polineuropatia aguda</b>	1 (1.9)	-	-	1
<b>Esclerose Múltipla</b>	1 (1.9)	1	-	-
<b>Parestesia</b>	1 (1.9)	-	-	1
<b>Mielite Transversa</b>	1 (1.9)	-	1	-
<b>Polirradiculoneuropatia</b>	1 (1.9)	-	-	1
<b>TOTAL</b>	<b>52 (100)</b>	<b>10 (19.2)</b>	<b>17 (32.7)</b>	<b>25 (48.1)</b>

**Legenda:** med.= mediana; Var.= variação; M= masculino; F= feminino

Nos pacientes com suspeita de encefalites virais, 15/22 (68%) estavam com positividade para HHV pela nested PCR no LCR e doze tinham outras hipóteses diagnósticas (Tabela 10).

**Tabela 09** – Resultados de DNA de HHV em monoinfecções e coinfecções em pacientes com encefalites e não-encefalites.

Desordem Neurológica	Monoinfecção	Coinfecção	Total	<i>p</i> valor*
<b>Encefalite</b>	4	11	15	<b>0.2566</b>
<b>Não-encefalite**</b>	6	6	12	
<b>Total</b>	<b>10</b>	<b>17</b>	<b>27</b>	

\***Teste de Fisher**; \*\* Plexopatia Lombossacral; Paralisia Facial; Convulsões; Encefalopatia; Síndrome Cerebelar; Meningoencefalite; Meningite; Mononeurite; Parestesia; Polineuropatia Aguda; Polirradiculoneuropatia, Esclerose Múltipla, Parestesia e Mielite Transversa.

## 5.2. SINTOMAS DE ALTERAÇÕES NEUROLÓGICAS APRESENTADAS PELOS PACIENTES COM DNA DE HHV POSITIVOS PELA NESTED PCR NO LCR.

Os sintomas mais frequentes dos pacientes infectados por HHV-DNA e os vírus detectados nas alterações neurológicas estão apresentados na Tabela 10.

**Tabela 10.** Hipóteses neurológicas, sintomas e detecção do DNA do HHV no LCR pela nested PCR.

Hipóteses Neurológicas	Sintomas	Vírus detectado no LCR
<b>Encefalite (n=15)</b>	Convulsões, febre, vômitos, dor de cabeça, fraqueza, epilepsia, paralisia, alteração de comportamento, confusão mental, perda de peso, dor abdominal, baixo nível de consciência, tonturas, sonolência, alteração visual, perda de memória (infecção viral anterior)	HSV-1, VZV, EBV, HCMV, HHV-6 e HHV-7
<b>Encefalopatia (n=4)</b>	Dor de cabeça, epilepsia, alteração motora com andar lentificado, alteração de comportamento, febre, mioclonia	HSV-2, EBV, HCMV, HHV-6 e HHV-7
<b>Meningite (n=1)</b>	Dor de cabeça e vômito	EBV, HCMV, HHV-6 e HHV-7
<b>Mielite (n=1)</b>	Neuropatia	EBV, HHV-6 e HHV-7
<b>Meningoencefalite (n=2)</b>	Parestesia, paralisia, dor de cabeça, náuseas, vômitos	VZV, EBV, HCMV, HHV-6 e HHV-7
<b>Paralisia Facial (n=1)</b>	Febre e paralisia	EBV, HCMV e HHV-7
<b>Esclerose Múltipla (n=1)</b>	Convulsão	EBV
<b>Síndrome Cerebelar (n=1)</b>	Alteração motora	HSV-2
<b>Plexopatia Lombossacral (n=1)</b>	Paralisia	VZV

### 5.3. PROPORÇÃO DE PACIENTES COM DNA DE HHV NEGATIVOS NO LCR E ASSOCIAÇÃO ENTRE IDADE E SEXO COM INFECÇÕES DO VÍRUS HERPES NO SISTEMA NERVOSO DOS PACIENTES IMUNOCOMPETENTES ESTUDADOS

Um número de casos (69% encefalopatia, 32% encefalite, 100% convulsões e 69% de outras síndromes neurológicas) não resultou em nenhum dos agentes infecciosos pesquisados.

Em relação à idade e ao gênero e a ocorrência de detecção de DNA de HHV em LCR, não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos de idades (0-13 anos; 19-59 anos e 60-75 anos) e sexo (masculino/feminino) ( $p= 0,553$ ).

#### **5.4. ACHADOS DE EXAMES EEG, TC E RM DO CÉREBRO DE PACIENTES COM DNA DE HHV POSITIVOS**

Os achados laboratoriais e de imagem do SN central e periférico dos pacientes, resgatados de prontuários médicos não foram sistematicamente anotados em todos os prontuários de pacientes. Em relação aos 27 pacientes com DNA de HHV positivo, EEG foi realizada em 19/27 (70,3%); TC em 11/27 (40,7%); MRI em 18/27 (66,6%).

Dezenove pacientes fizeram exames de eletroencefalograma (EEG) frente a positividade do DNA do HHV detectado no LCR. Entre eles, 17/19 (89,4%) eram **anormais**. Destes pacientes, 13/17 (76,4%) tinham como suspeita diagnóstica encefalite viral. Dois pacientes com DNA de HHV positivo tinham EEG normal e um destes apresentou sintomas de encefalite.

Onze pacientes com DNA de HHV no LCR fizeram tomografia computadorizada (TC) e 6/11 (54,5%) apresentaram resultados **anormais**. Destes pacientes, 5/6 (83,3%) tinham suspeita de encefalite. Cinco pacientes resultaram TC normal e 3 deles tinham sintomas de encefalite (60%).

A ressonância magnética (RM) foi realizada em 18 pacientes positivos para DNA de HHV e 12/18 (66,6%) resultaram **anormais**. Sete dos 12 pacientes (58,3%) tinham como hipótese diagnóstica encefalite. Seis pacientes com encefalite não apresentaram alterações de imagem (33,3%). RM normal ocorreu em seis pacientes (33,3%) e quatro deles tinham hipótese diagnóstica de encefalite (66,6%) (Tabela 11).

## 5.5. RESULTADOS LABORATORIAIS CITOLÓGICOS E BIOQUÍMICOS NO LCR

Níveis de Proteína no LCR foram examinadas em 17/27 pacientes (62,9%); glicose em 6/27 (22,2%); pleocitose em 15/27 (55,5%) e IgG em 14/27 (51,8%) (Tabela 12).

Níveis de Proteína **anormal** (níveis acima de 42 mg/dl) ocorreu em 9/17 pacientes (52,9%) e três deles tiveram HD: encefalite (33,3%). Proteína normal ocorreu em 8/17 (47%) e 5 pacientes com HD: encefalite (62,5%).

Níveis de Glicose anormal ocorreu em 5/6 pacientes (83,3%) e três deles tiveram HD: encefalite (60%).

Pleocitose **anormal** foi observada em 7/15 (46,6%) amostras DNA de HHV positivas no LCR. Esta pleocitose incluiu a ocorrência de 2/7 (28,6%) de casos de HD: encefalite. Pleocitose normal ocorreu em 8/15 (53,3%) pacientes e 3/8 tinham como HD: encefalite 3 (37,5%).

Presença de IgG **anormal** ocorreu em 8/14 pacientes (57,1%) e 2/8 (25%) tinham HD: encefalite. IgG normal ocorreu em 6 pacientes, sendo que em 50% a HD: encefalite.

**Tabela 11.** Resultados dos exames laboratoriais e de imagem do SNC em relação aos 27 pacientes com DNA de HHV positivos.

Exames	(n, %)	Anormal	Normal	N.E.
		n (%)	n (%)	n (%)
EEG	19/27 (70,3%)	17/19 (89,4%)	2/19 (10,5%)	8/27 (29,6%)
TC	11/27 (40,7%)	6/11 (54,5%)	5/11 (45,4%)	16/27 (59,2%)
IRM	18/27 (66,6%)	12/18 (66,6%)	6/18 (33,3%)	9/27 (33,3%)
Proteína	17/27 (62,9%)	9/17 (52,9%)	8/17 (47%)	10/27 (37%)
Glicose	6/27 (22,2%)	5/6 (83,3%)	1/6 (16,6%)	21/27 (77,7%)
Pleocitose	15/27 (55,5%)	7/15 (46,6%)	8/15 (53,3%)	12/27 (44,4%)
IgG	14/27 (51,8%)	8/14 (57,1%)	6/14 (42,8%)	13/27 (48,1%)

**Legenda:** EEG: eletroencefalografia; TC: tomografia computadorizada; IRM: imagem ressonância magnética, N.E. não efetuado exame.

\*Obs. Cinco pacientes foram excluídos dos resultados laboratoriais (quatro tiveram acidente de punção e um não foi coletado).

## **5.6. AVALIAÇÃO DO TESTE DE NESTED PCR EM AMOSTRAS DE DNA EXTRAÍDAS DE PLASMA PAREADAS COM AS AMOSTRAS DE LCR DOS PACIENTES ESTUDADOS.**

Neste estudo, foi avaliada a incidência de positividade de infecções causadas pelos herpesvírus no SN utilizando como amostra principal o LCR. Para examinar a eficiência dos métodos laboratoriais baseados na detecção pela técnica de nested PCR em amostras extraídas de plasma, realizamos uma comparação entre estes dois tipos de compartimentos biológicos, onde é possível a utilização para extração de DNA e utilização destes materiais em biologia molecular.

Cinquenta e duas amostras de LCR/plasma pareadas (1 par de amostra por paciente) foram testadas.

Entre os resultados dos testes realizados nas amostras de DNA extraídas de LCR, pelo menos um tipo de HHV foi detectado em 27/52 pacientes (52%). Entre as amostras de plasma, pelo menos um tipo de DNA de HHV foi detectado em 32/52 pacientes (61%). Coinfecção pelo HHV foi detectada em 17/27 (62,9%) em DNA de LCR e em 19/32 (59,3%) em DNA de plasma (Tabelas 12 e 13).

**Tabela 12.** Resultados de DNA de HHV positivos no LCR de pacientes com hipóteses neurológicas (27/52 pacientes).

	Hipótese Neurológica		Número de resultados positivos por nested PCR																	
	Monoinfecção=10		Coinfecção=17																	
	n	%	HSV1	HSV2	VZV	EBV	HCMV	HSV1+ HCMV	EBV+ HCMV	EBV+ HHV6	VZV+ HHV7	HCMV+ HHV7	HHV6+ HHV7	HSV1+ EBV+ HCMV	EBV+ HCMV+ HHV7	EBV+ HHV6+ HHV7	EBV+ HCMV+ HHV6	HCMV+ HHV6+ HHV7	HSV1+ EBV+ HCMV+ HHV6	VZV+ HCMV+ HHV6+ HHV7
Amostras de LCR positivas (n=27)	27/52	51.9	2	2	1	2	3	1	2	2	1	1	1	1	1	1	2	2	1	1
<b>Encefalite</b>	15/22	68.2	2	-	-	-	2	1	1	2	1	1	1	1	-	-	2	1	-	-
<b>Encefalopatia</b>	4/13	31	-	1	-	-	1	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-
<b>Meningite</b>	1/3	33.3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
<b>Meningoencefalite</b>	2/3	66.6	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
<b>Plexopatia</b>	1/1	100	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>Lombosacral</b>																				
<b>Esclerose</b>	1/1	100	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>Múltipla</b>																				
<b>Paralisia Facial</b>	1/1	100	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-
<b>Síndrome</b>	1/1	100	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>Cerebelar</b>																				
<b>Mielite</b>	1/1	100	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-



**Tabela 13.** Resultados de DNA de HHV positivos no PLASMA de pacientes com hipóteses neurológicas (32/52 pacientes).

Hipótese Neurológica		Número de resultados positivos por nested PCR																			
		Monoinfecção=13							Coinfecção=19												
	n	%	HSV1	HSV2	HCMV	HHV6	HHV7	HSV1+ HSV2	EBV+ HCMV	EBV+ HHV6	HCMV+ HHV7	HHV6+ HHV7	HHV7+ HHV8	HSV2+ HHV6	HSV2+ EBV	EBV+ HCMV+ HHV6	HSV1+ HSV2+ HCMV	HCMV+ HHV6+ HHV7	HSV1+ EBV+ HCMV+ HHV7	HSV2+ HCMV+ HHV6+ HHV7	EBV+ HCMV+ HHV6+ HHV7
Amostras de plasma positivas (n=32)	32/52	61.5	3	1	6	2	1	1	1	1	2	1	1	2	1	3	1	1	1	1	2
<b>Encefalite</b>	14/22	63.6	1	-	4	2	-	-	-	-	1	1	-	2	-	1	1	-	-	1	-
<b>Encefalopatia</b>	6/13	46.1	-	1	1	-	-	-	1	-	1	-	-	-	-	1	-	1	-	-	-
<b>Meningite</b>	3/3	100	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	1
<b>Meningoencefalite</b>	2/3	66.6	1	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>Epilepsia</b>	1/2	50	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>Plexopatia Lombosacral</b>	1/1	100	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>Esclerose Múltipla</b>	1/1	100	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>Paralisia Facial</b>	1/1	100	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-
<b>Síndrome Cerebelar</b>	1/1	100	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-
<b>Mielite</b>	1/1	100	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
<b>Parestesia</b>	1/1	100	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-

## **5.7. CORRELAÇÃO ENTRE OS RESULTADOS DA NESTED PCR REALIZADA NAS AMOSTRAS DE DNA EXTRAÍDO DE PLASMA COM AS AMOSTRAS DE DNA DE LCR COMO REFERÊNCIA PADRÃO.**

Os resultados obtidos a partir do DNA de plasma e LCR utilizando a nested PCR indicaram uma clara separação entre as amostras positivas e negativas. Embora a técnica de PCR seja altamente sensível por natureza, devido à amplificação do genoma presente na amostra testada.

Neste trabalho, a fim de comparar duas amostras diferentes, o LCR foi utilizado como referência padrão. A sensibilidade foi baixa para alguns vírus, como o HSV-1 e EBV, enquanto que o valor preditivo positivo (VPP) foi baixo para HSV-1 e HSV-2 (Tabela 15).

Os valores de sensibilidade e especificidade foram obtidos a partir dos resultados do teste de nested PCR no plasma, utilizando o LCR como referência padrão. A sensibilidade foi baixa para o HSV-1 e EBV, ao passo que o valor preditivo positivo (VPP) foi baixo para o HSV-1 e HSV-2. Foram considerados valores falsos positivos de nested PCR no plasma para HCMV em 5/52 amostras (9,6%), pois apresentaram resultados negativos na nested PCR no LCR.

A acurácia dos testes diagnósticos é utilizada para determinar os verdadeiros resultados tanto positivos quanto negativos. Em relação aos resultados obtidos neste estudo, podemos observar que a melhor acurácia obtida foi com o HSV-2, porém, não podemos levar em conta devido ao baixo número de casos. A acurácia para os vírus HSV-1, HHV-6 e HHV-7 foram os testes que demonstraram melhor acurácia (Tabela 14).

**Tabela 14** – Comparação entre os testes de nested PCR realizados no DNA extraído do LCR em relação ao nested PCR utilizando DNA extraído do plasma.

Nested PCR LCR	Nested PCR Plasma		VPP	VPN	Especificidade	Sensibilidade	Acurácia
	Positivo	Negativo					
<b>HSV-1</b>							
<b>Positivo</b>	1	5	16.7%	91.3%	89.4%	20%	82,7%
<b>Negativo</b>	4	42					
<b>HSV-2</b>							
Positivo	<b>2</b>	<b>5</b>	<b>28.6%</b>	<b>100%</b>	<b>90%</b>	<b>100%</b>	<b>90,4%</b>
Negativo	<b>0</b>	<b>45</b>					
<b>EBV</b>							
<b>Positivo</b>	5	5	50%	83.3%	87.5%	41.7%	76,9%
<b>Negativo</b>	7	35					
<b>HCMV</b>							
Positivo	<b>11</b>	<b>6</b>	<b>64.7%</b>	<b>88.6%</b>	<b>83.8%</b>	<b>73.3%</b>	<b>80,7%</b>
Negativo	<b>4</b>	<b>31</b>					
<b>HHV-6</b>							
<b>Positivo</b>	<b>7</b>	<b>6</b>	<b>53.8%</b>	<b>92.3%</b>	<b>85.7%</b>	<b>70%</b>	<b>82,7%</b>
<b>Negativo</b>	<b>3</b>	<b>36</b>					
<b>HHV-7</b>							
Positivo	<b>5</b>	<b>5</b>	50%	90.5%	88.4%	55.6%	82,7%
Negativo	<b>4</b>	<b>38</b>					

**Legenda:** VPP: Valor preditivo positivo, VPN: Valor preditivo negativo; VZV e HHV-8: o teste não foi aplicado devido à ausência de resultados positivos em um dos dois tipos de amostras testadas, impossibilitando análise comparativa. Os testes de concordância foram realizados nas mesmas amostras e do mesmo paciente.

Os testes de nested PCR realizadas no DNA de plasma foram concordantes em relação aos testes de nested PCR no LCR para os vírus HSV-2 ( $p \geq 0.063$ ), HCMV ( $p \geq 0.754$ ) e HHV-6 ( $p \geq 0.508$ ); no entanto, os casos de HSV-2 positivos apresentaram baixo VPP (baixo número de casos positivos).

O DNA do EBV foi detectado nas amostras de DNA extraídas de LCR em 44,4% (12/27) dos pacientes e nas amostras de DNA de plasma em 18,5% (5/27); 50% (6/12) tiveram hipótese clínica inicial de encefalite e os resultados de EEG, TC e RM foram anormais.

A Tabela 15 apresenta os resultados do teste de McNemar nas amostras pareadas.

**Tabela 15.** Comparação entre infecção por HHV detectada com nested PCR em amostras de LCR e plasma.

<i>Herpesvirus Humano</i>	Resultado Positivo LCR (%)*	Resultado Positivo Plasma (%)	Teste de McNemar (p)	Concordância (%)
<b>HSV-1</b>	5 (18.5)	1 (3.7)	1.000 <sup>a</sup>	20.0
HSV-2	<b>2 (7.4)</b>	<b>2 (7.4)</b>	<b>0.063<sup>a</sup></b>	<b>100</b>
<b>VZV</b>	3 (11.1)	0	. <sup>a</sup>	0
EBV	12 (44.4)	5 (18.5)	0.774 <sup>a</sup>	41.6
<b>HCMV</b>	<b>15 (55.6)</b>	<b>11 (40.7)</b>	<b>0.754<sup>a</sup></b>	<b>73.3</b>
HHV-6	10 (37)	7 (25.9)	0.508 <sup>a</sup>	70.0
<b>HHV-7</b>	<b>9 (33.3)</b>	<b>5 (18.5)</b>	<b>1.000<sup>a</sup></b>	<b>55.5</b>
HHV-8	0	1 (3.7)	. <sup>a</sup>	-
<b>TOTAL</b>	56	32		

<sup>a</sup>Distribuição binomial utilizada; \* LCR: exame padrão-ouro. Resultados obtidos utilizando o teste de McNemar nas amostras pareadas.

## 5.8. CASOS DE ÓBITOS OCORRIDOS NOS PACIENTES

Cinco óbitos ocorreram entre os pacientes deste estudo. Dois pacientes tinham como hipótese clínica inicial encefalite. Um paciente com a idade de 2 anos, apresentou resultados positivos para EBV e HCMV no LCR e apresentou no plasma positividade para o HSV-1, HSV-2 e HCMV, os exames de TC, EEG e RM foram anormais, os testes laboratoriais convencionais apresentaram-se todos

normais; foi a óbito 75 dias após a coleta das amostras utilizadas neste estudo. A causa do óbito foi insuficiência respiratória e sepse, com o diagnóstico de encefalite viral, apesar do tratamento com aciclovir. Outros quatro pacientes que apresentaram resultados de nested PCR negativos para HHV no LCR foram a óbito, sendo o primeiro por estado de mal epiléptico, insuficiência hepática aguda e sepse; outro também por estado de mal epiléptico e sepse; o terceiro por choque séptico por *Staphylococcus aureus*, e o último deles faleceu devido à trombose cerebral maligna. Todos foram tratados inicialmente com doses convencionais de drogas antivirais.

#### **5.9. RESULTADOS DO SEQUENCIAMENTO DOS FRAGMENTOS DE DNA DOS HERPESVÍRUS HUMANOS AMPLIFICADOS**

De acordo com o sequenciamento realizado, foi possível identificar as respectivas sequencias correspondentes a cada um dos oito herpesvírus. As figuras 14 a 21 demonstram os resultados dos sequenciamentos dos fragmentos de DNA amplificados para cada gene dos HHV pesquisados. Todos os fragmentos obtidos nas reações de nested PCR realizadas foram confirmados no GeneBank (Blast).

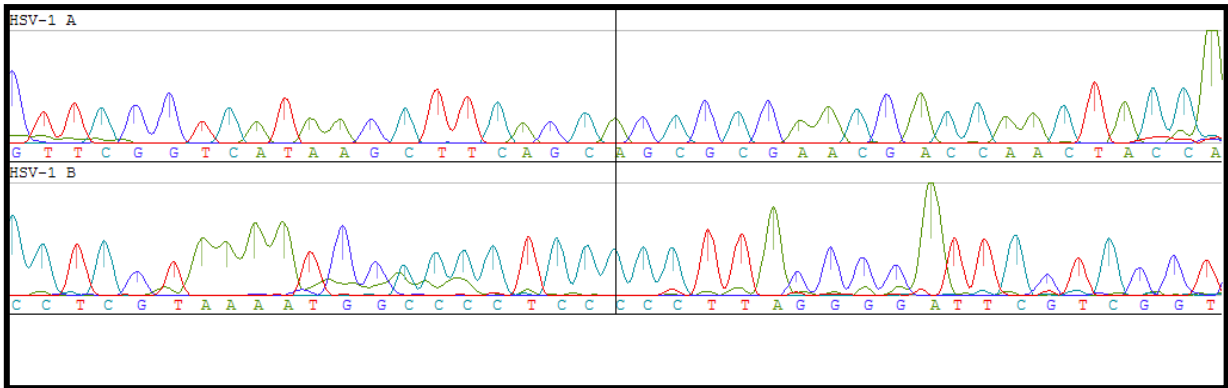


Figura 14: Sequência correspondente ao fragmento do HSV-1 pesquisado.

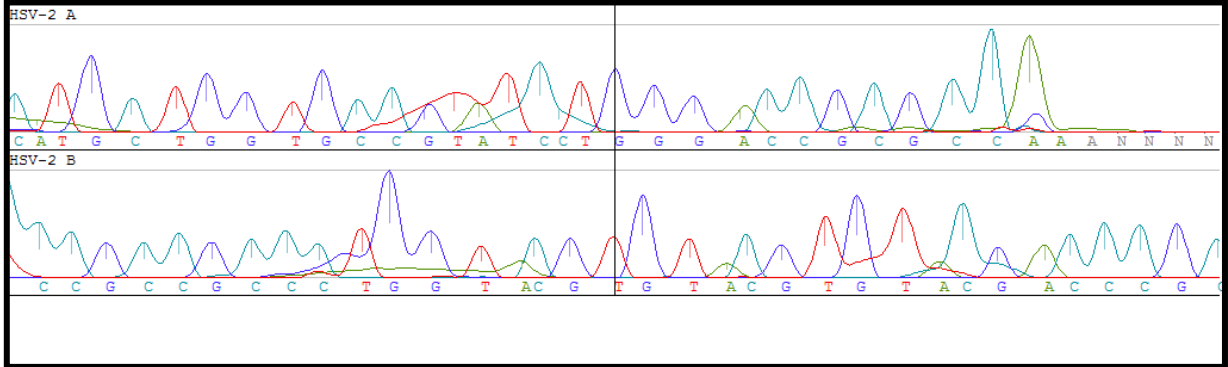


Figura 15: Sequência correspondente ao fragmento HSV-2 pesquisado.

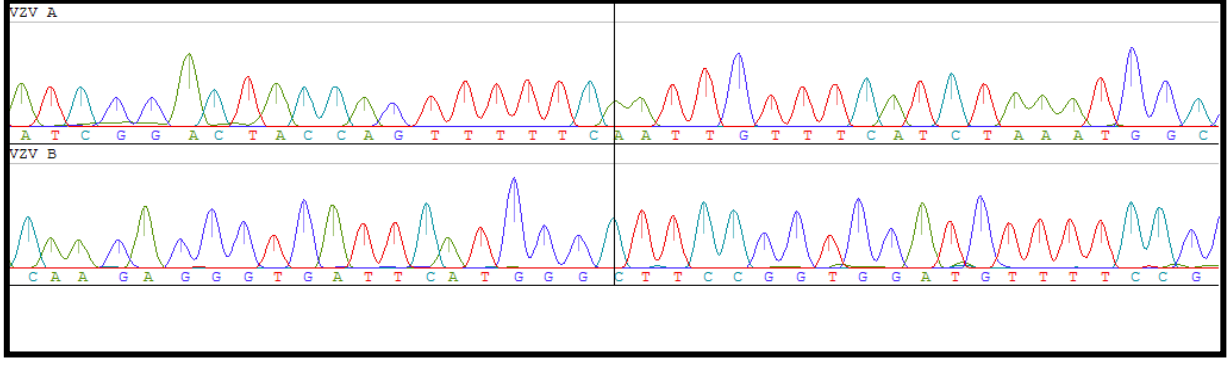
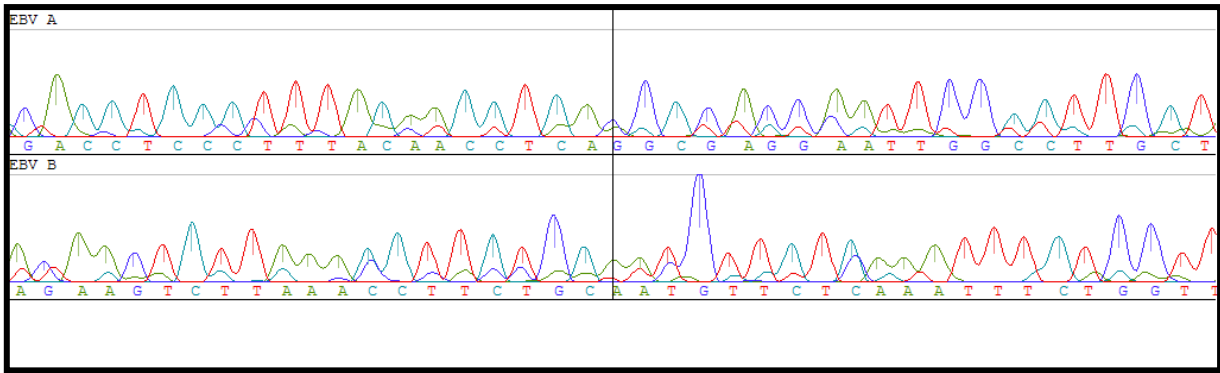
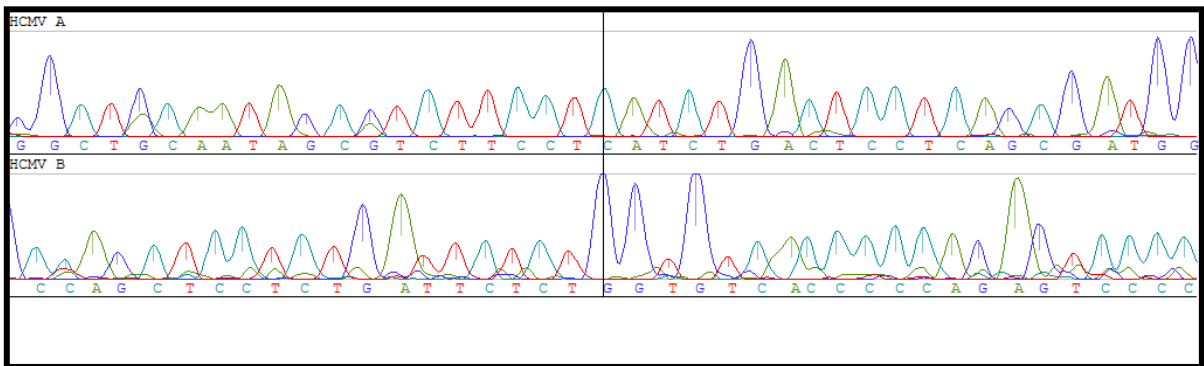


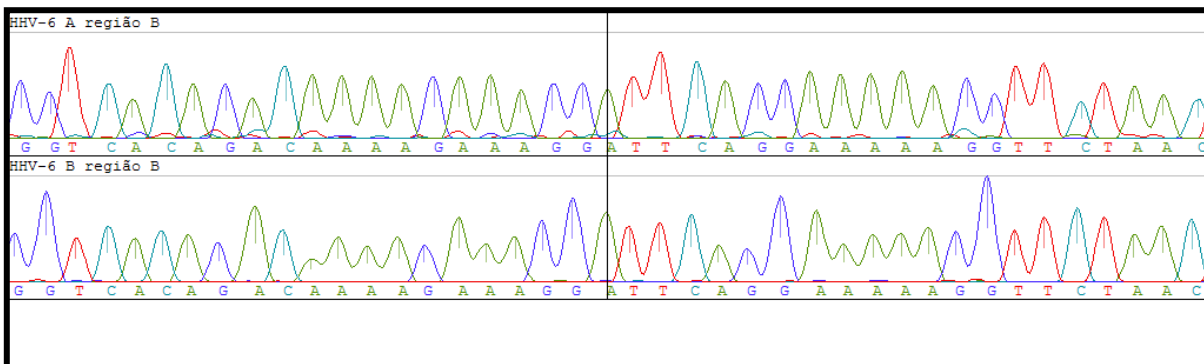
Figura 16: Sequência correspondentes ao fragmento VZV pesquisado.



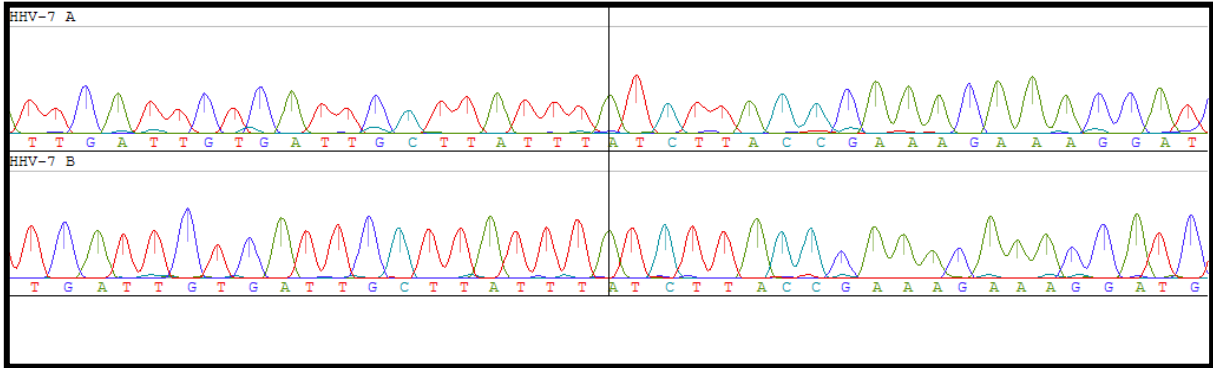
**Figura 17:** Sequência correspondente ao fragmento do EBV pesquisado.



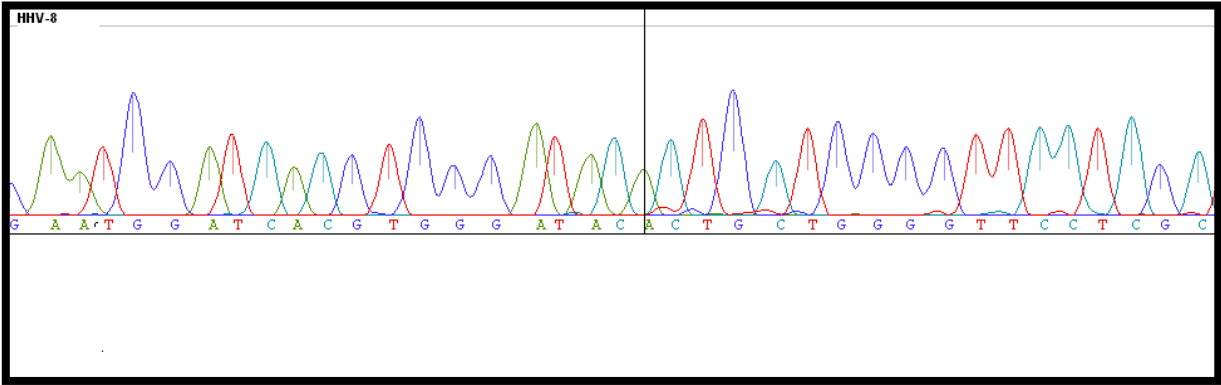
**Figura 18:** Sequência correspondente ao fragmento do HCMV pesquisado.



**Figura 19:** Sequência correspondente ao fragmento HHV-6 tipo B pesquisado.



**Figura 20:** Sequência correspondentes ao fragmento do HHV-7 pesquisado.

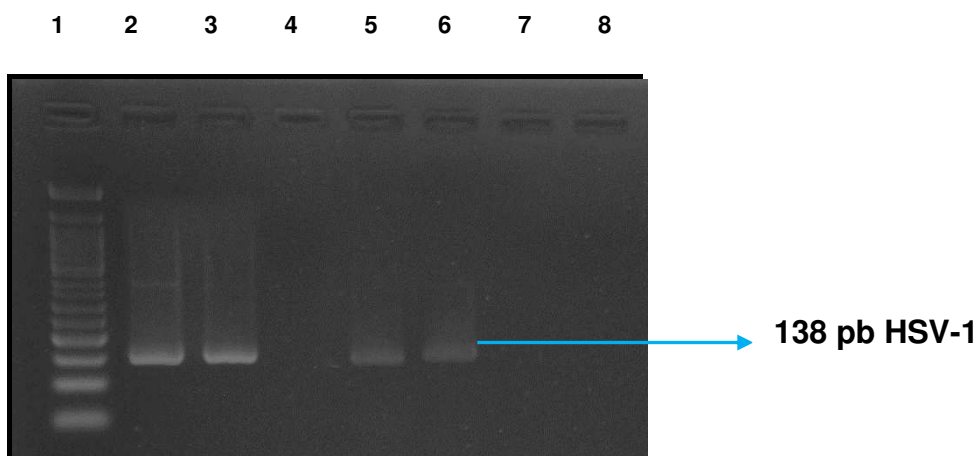


**Figura 21:** Sequência correspondente ao fragmento do HHV-8 pesquisado.



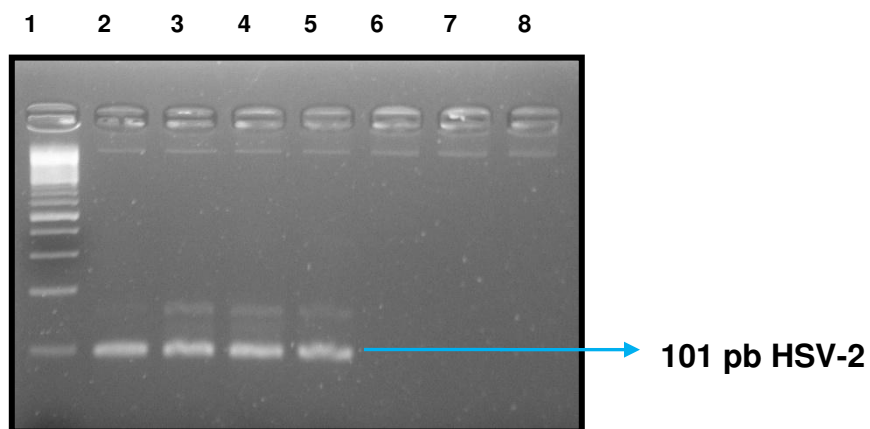
## 5.10. RESULTADOS DAS AMPLIFICAÇÕES DOS FRAGMENTOS DA NESTED-PCR PARA TODOS OS HHVS ANALISADOS. FOTOS DOS GÉIS DE ELETROFORESE.

As figuras 22 a 29 mostram as fotos de géis com os fragmentos amplificados pela Nested PCR dos 8 vírus estudados.



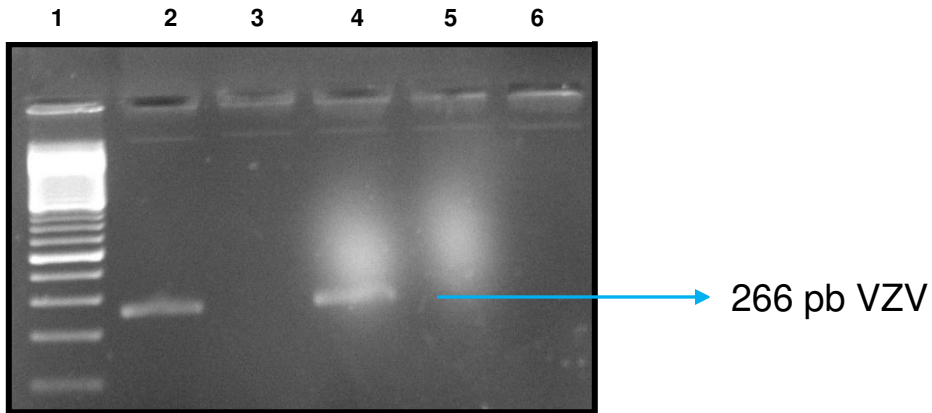
**Figura 22:** Amplificação do fragmento do HSV-1

**Legenda:** 1 - Ladder 50pb; 2 e 3 - Controle positivo; 4, 7 e 8 - Pacientes negativos; 5 e 6 - Pacientes positivo.



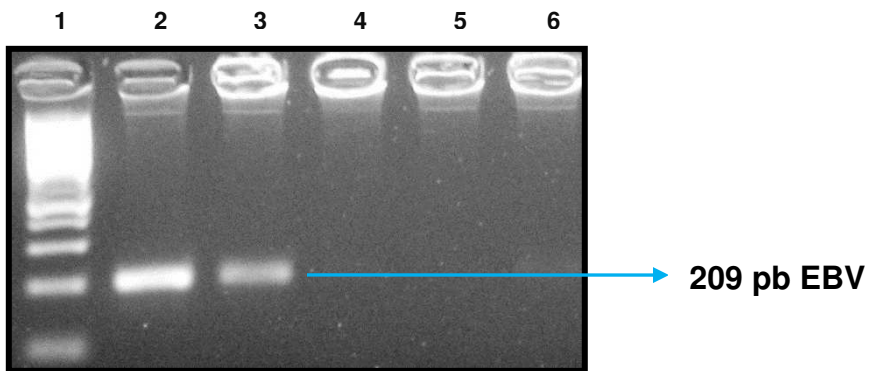
**Figura 23:** Amplificação do fragmento do HSV-2

**Legenda:** 1- Ladder 100pb; 2 - Controle positivo HSV-2; 3, 4 e 5 - Pacientes positivos; 6 e 7 - Pacientes negativos e 8 - Controle negativo.



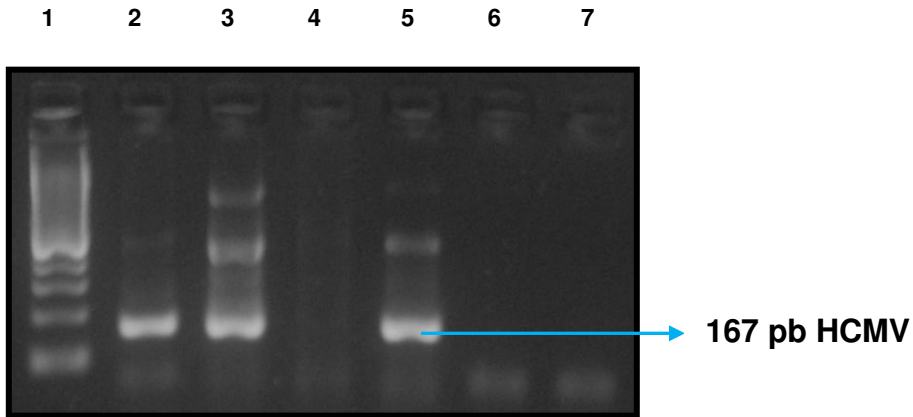
**Figura 24:** Amplificação do fragmento do VZV

**Legenda:** 1 - Ladder 100pb; 2 - Controle positivo VZV; 3 e 5 - Paciente negativo; 4 - Paciente positivo e 6 - Controle negativo.



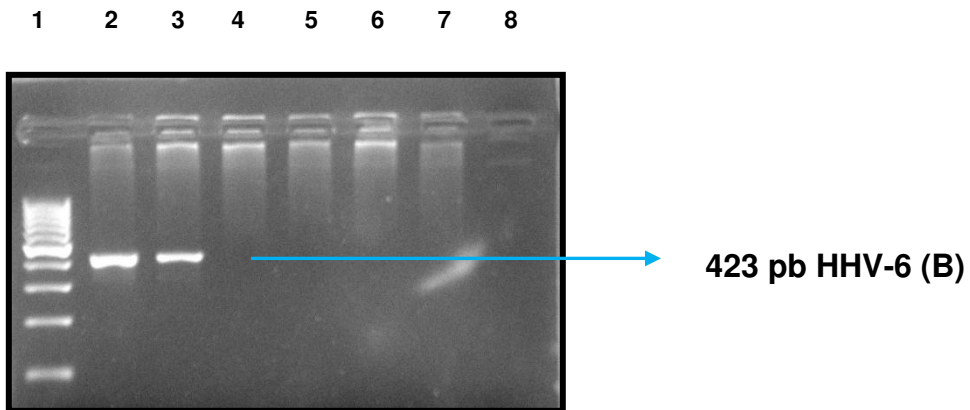
**Figura 25:** Amplificação do fragmento do EBV

**Legenda:** 1 - Ladder 100pb; 2 - Controle positivo EBV; 3 - Paciente positivo; 4 e 5 - Pacientes negativos e 6- Controle negativo.



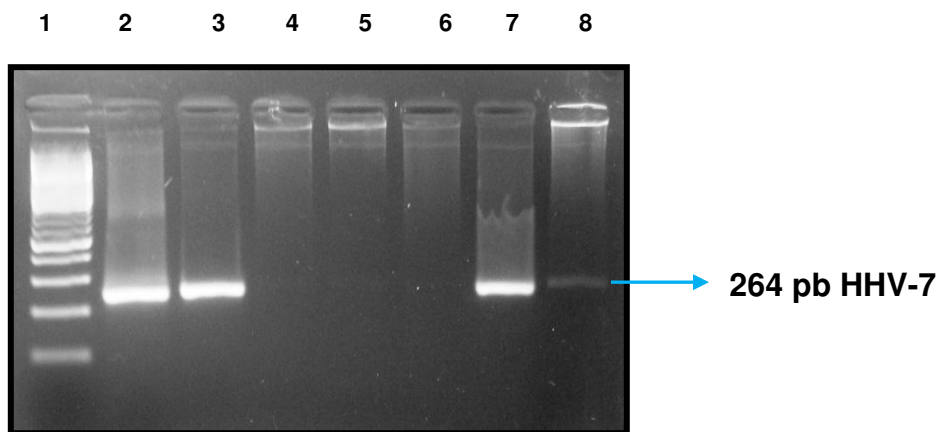
**Figura 26:** Amplificação do fragmento do HCMV

**Legenda:** 1 - Ladder 100pb; 2- Controle positivo HCMV; 3 e 5 - Pacientes positivos; 4 e 6- Pacientes negativos e 7 - Controle negativo.



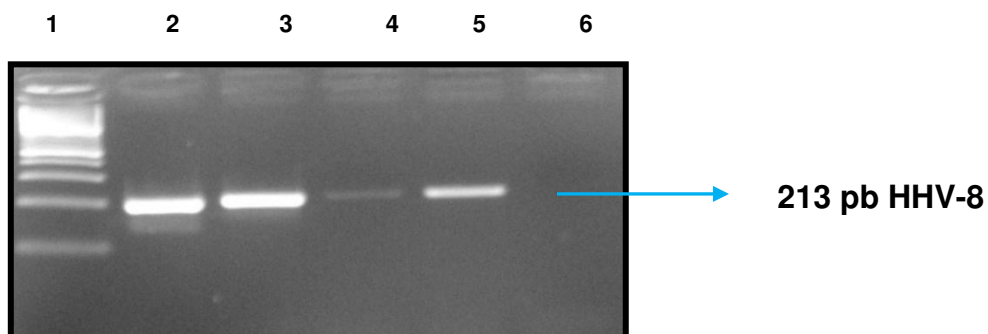
**Figura 27:** Amplificação do fragmento do HHV-6 tipo B

**Legenda:** 1 - Ladder 100pb; 2 - Controle positivo para HHV-6; 3 - Paciente positivo; 4, 5, 6, 7 - Pacientes negativos e 8 - Controle negativo.



**Figura 28:** Amplificação do fragmento do HHV-7

**Legenda:** 1 - Ladder 100pb; 2 e 3 - Controles positivos HHV-7; 4 – Controle negativo; 5 e 6 - Pacientes negativos; 7 e 8 - Pacientes positivos.



**Figura 29:** Amplificação do fragmento do HHV-8.

**Legenda:** 1 - Ladder 100pb; 2 e 3 - Controles positivos para HHV-8; 4 e 5 - Pacientes positivos e 6 - Controle negativo.

## *6. Discussão*

Os HHV podem causar infecções e resultar em doenças agudas ou crônicas, tanto em pacientes imunocompetentes como em imunocomprometidos (248). As infecções primárias e recorrentes causadas pelos HHV podem comprometer o SN, causando, por exemplo, encefalite, com elevada mortalidade.

O diagnóstico laboratorial precoce é importante para reduzir a morbidade, mortalidade e minimizar as sequelas, por permitir o rápido tratamento com antivirais e melhorar o prognóstico (46, 249, 250, 251).

A detecção do DNA de HHV usando a técnica da nested PCR a partir de amostras de LCR em pacientes com hipótese clínica inicial de doença do SN pode esclarecer também, com maior precisão, a frequência destas viroses em pacientes hospitalizados (214). Esta técnica revolucionou o diagnóstico das infecções virais do SN (214,252, 253,254), particularmente aquelas causadas pelo HHV e o diagnóstico precoce de doenças neurológicas devem, assim, ter alta prioridade (50).

A amplificação de ácidos nucleicos no DNA extraído do LCR permite otimizar o diagnóstico das infecções pela diminuição no tempo de execução e aumento na sensibilidade e acurácia (255,256,257). A importância na identificação da etiologia viral responsável pelas infecções usando a PCR pode ajudar nas decisões clínicas e nas escolhas da terapia antiviral para diminuir os custos, evitando a hospitalização, o tratamento com antibióticos, ou investigações radiológicas complementares e caras (257).

Todos os HHV tem o potencial de causar infecção no SN (46,258) e não está suficientemente conhecido se a infecção causada por determinado HHV produz quadros clínicos semelhantes ou diferentes.

Alterações bioquímicas e celulares podem ser determinadas por exames no líquido céfalo-raquidiano (LCR) e a alteração estrutural pode ser detectada por testes de imagem, tais como ressonância magnética, tomografia

computadorizada; além da documentação das disfunções por eletroencefalograma, que auxiliam a concluir o diagnóstico, muitas destas infecções podem ser tratadas (19,21,272, 47), como apresentamos nestes estudo.

Apesar de causar uma variedade de síndromes clínicas, os HHV podem reativar-se devido a inúmeros gatilhos, um deles é a imunossupressão, mas em pacientes imunocompetentes a encefalite causada pelo HSV-1 e VZV são as mais prevalentes (259). Todos os HHV são capazes de invadir o sistema nervoso e persistir longitudinalmente no cérebro (260,261). A encefalite é a alteração no sistema nervoso mais comum que pode ser ocasionada por vírus, principalmente do grupo herpes.

Observamos em nosso estudo, que 68,2% dos casos de hipótese diagnóstica de encefalite tinham positividade pelo HHV, porém não houve diferença estatisticamente significativa entre a positividade em casos de pacientes com suspeitas de encefalites ou com outras enfermidades neurológicas (não encefalites), portanto, estes agentes podem causar infecções em qualquer tipo de doença neurológica, como apresentado neste estudo.

Embora outros métodos para a identificação de infecção por HHV terem sido desenvolvidos, a sensibilidade das técnicas de detecção dos antígenos e dos anticorpos do HHV no diagnóstico das infecções no SN é muito baixa. Por exemplo, o aumento dos títulos de anticorpos no LCR pode ser estabelecido retrospectivamente, mas em somente 80% dos casos. Anticorpos podem aparecer no LCR como consequência de um extravazamento da barreira hematoencefálica, levando a um resultado falso-positivo (262,263,264).

O presente estudo mostrou a frequência da infecção ativa causada pelos HHV, com a detecção do DNA viral em 52 pacientes imunocompetentes com sintomas de doenças do SN, com várias manifestações diagnósticas iniciais. A técnica nested PCR é excelente para um diagnóstico adequado, substituindo e evitando a biópsia cerebral invasiva ( 214,272).

A nested PCR com primers específicos tem sido utilizada para detectar os herpesvírus "*in house*", como utilizamos neste trabalho, pelo baixo custo em comparação aos dispendiosos kits de PCR multiplex , mas com

excelente performance e a PCR no LCR pode ser considerada o “gold standard” para o diagnóstico destas infecções (265,266).

Neste estudo, 7% do total das amostras de pacientes imunocompetentes estudadas (LCR e plasma) foram identificadas como sendo positivas para o HHV, sendo que 6,5% das amostras de DNA de LCR foram positivas e 7,7% das amostras de DNA de plasma apresentaram positividade.

Calvario e colaboradores, 2002, usando 320 amostras de LCR de 286 pacientes e 154 amostras de soro investigou a detecção de doenças virais do SN, utilizando o kit de PCR Herpes Consenso (multiplex), para seis HHV, em associação com a nested PCR. Em contraste com muitos outros estudos com foco em pacientes imunodeprimidos, os autores particularizaram a seleção de um grupo de pacientes imunocompetentes para comparar a concordância entre a detecção do vírus no LCR e no plasma, usando a nested PCR, à semelhança desse estudo. Nestas 320 amostras de DNA de LCR, 15,9% foram positivas para HHV. Das 154 amostras de soro, 11% foram positivas (5).

Rimério e colaboradores, 2015, demonstraram que a técnica de nested PCR realizada em plasma e no LCR permitiram uma clara separação entre a infecção pelo HHV positivo e negativo. Embora a técnica de nested PCR seja altamente sensível, devido à amplificação de um milhão de vezes o genoma presente na amostra testada, a exata sensibilidade em situações clínicas específicas não é bem conhecida. A detecção do DNA viral no plasma, mas não no LCR, pode ser interpretado como indicativo de uma fase precoce da infecção (22) e pode ser utilizada ao invés do LCR em determinadas situações. Esta hipótese foi verificada por outros autores (5,267,268).

Os resultados de nested PCR no plasma neste estudo podem ser considerados em relação a especificidade, de tal modo que os pacientes verdadeiramente negativos podem ser detectados e os tratamentos empíricos podem ser evitados. O teste de nested PCR com DNA extraído de plasma pode ser utilizado em pacientes que enfrentam problemas relacionados à coleta de LCR e um aspecto positivo da utilização de plasma em vez de LCR para diagnosticar

infecções de origens virais (incluindo outros vírus, como enterovirus) é que não é necessário submeter os pacientes a dolorosa e difícil punção lombar.

A técnica da punção lombar, é uma técnica neurológica que não está isenta de riscos e sempre está cercada de incertezas, mesmo realizadas pelas pessoas mais experientes (269,270,271). Pacientes obesos, com deformidades, enfermidades degenerativas e cirurgia prévia da coluna lombar apresentam dificuldades em realizar a punção liquórica, necessária ao exame (269,271) e está contra indicada nas seguintes situações: coagulopatia ( $<50.000$  plaquetas/ $\text{mm}^3$ , RNI $>1,5$ , administração de heparinas de baixo peso molecular, infecção no local da punção, e hipertensão intracranial (269,271).

Em relação à positividade dos HHV neste trabalho, iremos discutir individualmente os vírus encontrados. O HCMV teve uma incidência de 55,6% e foi o mais frequente dos oito HHV estudados, sobretudo nos casos de suspeita clínica inicial de encefalite (60%), porém, raramente tem sido relatados casos de encefalite causados pelo HCMV em pacientes imunocompetentes adultos, por ser quase que exclusivamente uma doença de pacientes imunocomprometidos (273).

Complicações neurológicas causadas pela infecção pelo HCMV incluem encefalite, mielite e poliradiculopatia. No caso da encefalite pelo HCMV, nenhuma característica clínica única é produzida e também, os diagnósticos laboratoriais e por imagem típicos podem estar ausentes, fazendo com que o diagnóstico da encefalite por HCMV seja muito difícil de ser confirmado (50).

A detecção por nested PCR de DNA de HCMV em LCR continua a ser um método adequado para o diagnóstico de doenças neurológicas relacionadas com HCMV, como mostrado no nosso laboratório e em muitos outros (22,50,96, 112,274).

Entretanto, um resultado positivo para o HCMV obtido através da nested PCR no LCR de pacientes imunocompetentes requer interpretação cuidadosa no que diz respeito ao contexto clínico individual (275), mas também particularmente no SN, pode fornecer informações ao tratamento adequado, podendo evitar a hospitalização desnecessária do paciente.



Apesar do papel importante para o diagnóstico da infecção ativa pelo HCMV detectado no plasma, as suas propriedades biológicas não são completamente compreendidas. Uma hipótese é que ele reflete a replicação do vírus ativo.

Alternativamente, a alta abundância de HCMV nos leucócitos (DNAemia) em pacientes infectados por HCMV levou à hipótese de que a DNAemia no plasma pode ser, pelo menos em parte, um resultado de lise do sangue periférico. Esta hipótese implicaria que, para pacientes com DNAemia por HCMV, o armazenamento a longo prazo de amostras de sangue total antes da separação do plasma/soro pode causar a libertação de DNA viral na fração de plasma, desse modo distorcendo os resultados de PCR (276). Neste trabalho, realizamos a separação do plasma imediatamente após a chegada da amostra no laboratório. O sangue periférico introduzido no LCR após uma punção traumática (acidente de punção) resulta em um aumento artificial da contagem global de leucócitos, e pode resultar em resultados falsos positivos da nested PCR no LCR, podendo refletir na infecção latente do vírus nos leucócitos que extravasou para o meio extracelular (277).

Studahl e colaboradores, 2000, estudaram a presença de HCMV, EBV, HHV-6 e HSV em amostras de LCR obtidas de pacientes com suspeita de infecção viral (87% eram imunocompetentes) e encontraram uma incidência de DNA de HHV em 10,4% no LCR (278). Davies e colaboradores, 2005, verificaram que 7% (53/753) de amostras de LCR de seis HHV (HSV-1, HSV-2, VZV, EBV, HCMV, HHV-6) tinham uma correlação clínica com distúrbios do SN. Outros autores apresentaram percentuais semelhantes de positividade em suas análises, incluindo Sghaier e colaboradores, 2012, que encontrou uma positividade de 8,5% (279,280).

No presente estudo, 44,4% de EBV foi detectada principalmente no LCR em comparação com o plasma (18,5%), e 50% destes pacientes apresentaram hipótese clínica de encefalite. A nested PCR do LCR é extremamente útil no diagnóstico de infecções por EBV do SN, conforme outros autores (79,89, 265, 266, 278, 281, 282, 283)

Um estudo usando a nested PCR, detectou DNA de EBV no LCR em 7,4% dos indivíduos imunocompetentes e que apresentaram doença do SN de etiologia desconhecida (284). Surpreendentemente, dado que a soropositividade se aproxima de 90% em adultos idosos, a nested PCR para EBV positiva no LCR deve ser interpretada com cautela, pois o EBV pode ser encontrado concomitantemente no SN como um possível “espectador passivo” a outras doenças infecciosas no SN, tais como tuberculose, meningite bacteriana e encefalite causada pelo HSV (268,285,286,287).

Em cinco dos nossos casos, houve discordância na detecção positiva entre o LCR e o plasma em relação ao EBV. A possível explicação desses resultados negativos de nested PCR no plasma, seria de que a viremia fosse transitória, não associada ao momento da coleta.

A detecção do EBV e do HCMV no LCR pode ocorrer a partir de uma reativação do vírus causada por estresse simultâneo no hospedeiro ou de infecção latente com o tráfico de leucócitos no espaço intratecal (278, 279). Resultados semelhantes foram encontrados por Martelius e colaboradores em 2011.

O tempo entre o início dos sintomas e a coleta de amostras é essencial para o sucesso na detecção viral, para isso, as amostras devem ser coletadas e processadas no mesmo dia, conforme anteriormente dito (268, 288).

Resultados de EBV e HCMV positivos devem, portanto, ser interpretados com cautela. Embora a detecção de EBV e HCMV poderem resultar da apresentação de uma infecção viral do SN em alguns casos, em outros casos podem representar um epifenômeno (3, 286, 289, 290).

Estudos de PCR quantitativo foram realizados em alguns laboratórios de pesquisa, bem como a determinação de um número de cópias de DNA de EBV que podem ajudar a distinguir mais infecções ativas verdadeiro-positivos de raros casos de resultados falso positivos que estão relacionados com a latência do vírus ou casos incomuns com nested PCR positivas do LCR (278).

O valor preditivo de qualquer teste não depende apenas da especificidade e da sensibilidade, mas também da prevalência do patógeno ou doença a ser testada numa dada população. Um bom exemplo disto é o que diz

respeito aos testes de plasma para o HSV-1 e HSV-2 como demonstram nossos resultados. Neste estudo, verificamos uma boa sensibilidade para o HSV-2, HCMV e o HHV-6. Como o valor preditivo positivo para o HSV-2 foi baixo devido aos poucos casos de positividade, a nested PCR no plasma foi mais bem indicada para o HCMV e HHV-6, com uma ótima sensibilidade. A melhor acurácia ocorreu para o HSV-1, HHV-6 e HHV-7.

Entre a família HHV, apenas o HCMV e, em menor grau, o HHV-8 são relevantes em medicina transfusional. Devido ao neurotropismo, os tipos de HSV-1 e 2 são consideradas de menor importância. No entanto, vários trabalhos têm mostrado evidências de que a DNAemia por HSV pode ocorrer e que, portanto, pode ser transmissível por produtos de sangue (291).

Em relação à detecção do HHV-6 no LCR neste estudo, a positividade foi de 37% e esses resultados pode expressar um genoma integrado, herdado cromossomicamente e, portanto, pode não ser a causa de doenças do SN (292, 293, 294, 295). Casos de HHV-6 associados a encefalites em pacientes imunocompetentes tem sido descritos (296, 297) e também, um caso de recidiva de encefalite por HHV-6 (298).

O HHV-6 é frequentemente reativado durante a infecção aguda com outras viroses, especialmente com outros herpesvirus (121). Estudo realizado por Yao e colaboradores, em 2009, demonstrou que grande quantidade de pacientes com encefalite tinham DNA de HHV-6, mas esses achados devem ser confirmados (299).

A presença do HHV-6 no LCR, sugere a presença da reativação viral ou da persistência do vírus no SN (132). Complicações neurológicas são mais comuns em indivíduos imunocomprometidos, especialmente após o transplante de células progenitoras hematopoéticas, mas há casos relatados em crianças e adultos imunocompetentes (151, 300). O vírus pode causar meningite, encefalite ou mielite, como ocorreu em pacientes deste estudo (283).

O DNA HHV-7 foi detectado em LCR em 33,3% neste trabalho e pode ter sido a causa de encefalites, encefalopatias, meningite, mielite, meningoencefalite e paralisia facial. Observamos que em apenas um paciente

com hipótese clínica inicial de meningoencefalite, monoinfecção por HHV-7 foi detectada no plasma. No LCR todas as positivities ocorridas por HHV-7 foram acompanhadas por coinfeções por outros HHV, com os pacientes apresentando as manifestações clínicas iniciais descritas acima. Isto pode significar que ele pode ser um dos gatilhos para a reativação viral de outros vírus ou favorecer o agravamento dos sintomas causados por eles.

Em outro estudo do grupo do laboratório, utilizando a nested PCR e a antigenemia para a detecção do HHV-7 em transplantados de medula óssea, observamos estatisticamente que a presença do DNA do HHV-7 pode ter um efeito imunológico protetor no desenvolvimento da doença e morte pelo HCMV após o transplante (dados ainda não publicados).

O HHV-7 pode ser responsável por convulsões febris, meningoencefalite e encefalites necrotizantes envolvendo os ganglios basais e as áreas corticais (301, 302).

Poucos trabalhos mostram a ocorrência de coinfeções virais em pacientes imunocompetentes (303). No presente estudo, observamos coinfeção em 17/27 dos pacientes que tiveram DNA de HHV detectado em suas amostras de LCR, sendo que 64,7% tiveram diagnóstico de encefalite viral. Nestes 11 pacientes infectados com HHV-encefalite, apenas um foi a óbito e teve coinfeção do SN por HSV-1, HSV-2 e HCMV, confirmada por nested PCR no LCR. DNA de HHV positivo, numa combinação de dois ou mais vírus detectados no LCR, foi também encontrado por Davies, 2005; Weinberg, 2005 (279,286).

Casos individuais de coinfeções por HHV na doença do SN, tem sido descritas (265;266). Estudos tem demonstrado que os HHV induzem a uma concomitante liberação de Interleucinas-6 (IL-6), desde modo ocorre um distúrbio na homeostase do sistema imune (304, 305). Este efeito pode ser por si só imunossupressor, e pode permitir o estabelecimento da reativação de outros agentes no hospedeiro, deste modo aumentando a ocorrência de coinfeção no SN (306).

Neste trabalho, VZV, HSV-1 e HSV-2 foram encontrados principalmente em pacientes com sintomas clínicos de encefalite ou encefalopatia,

plexopatia lumbosacral e síndrome cerebelar. HSV-1 e HSV-2, VZV e o HCMV podem causar encefalite, enquanto VZV e HSV-2 causam meningite aguda. Meningoencefalite e mielite / radiculite podem ser causados pelo vírus de Epstein-Barr (EBV). Mielite está associada com VZV, HCMV, EBV e HSV-2, e ventriculite e encefalite por VZV e HCMV (254,307).

A detecção do HSV no sangue pode estar associada com uma variedade de sinais e sintomas de morbidade em imunocompetentes e imunocomprometidos adultos hospitalizados e está relacionada com taxas elevadas de mortalidade, embora causalidade só possa ser determinada por estudos adicionais (308).

Os resultados deste trabalho mostraram que cinquenta e nove amostras positivas pelos HHV foram identificadas (7%) a partir de 832 amostras. Dentre elas o EBV, HCMV, HHV-6 e HHV-7 foram os agentes mais comumente detectados. O DNA do HHV-8 ou o HHV associado ao sarcoma de Kaposi (KSHV) não foi observado nestas amostras através da nested PCR realizada em amostra de DNA extraída de LCR, mas foi detectado em uma amostra de plasma de um paciente com meningite e coinfeção pelo HHV-7.

O HHV-8 é o agente causador do Sarcoma de Kaposi e também está associado a algumas doenças hematológicas raras. O genoma viral contém grave potencial oncogênico, o que foi adquirido durante a sua evolução. O papel do HHV-8 em indivíduos saudáveis é, contudo, incerto. O aspecto completo das doenças humanas associadas a este vírus ainda não está bem estabelecido e o rápido desenvolvimento da biologia molecular continuará a fornecer novos esclarecimentos sobre a interação entre estes vírus e os seus hospedeiros (309).

De acordo com Ory, 2013, um total de 270 casos positivos foram identificados (46,5% dos estudados), utilizando a PCR. Entre os casos de meningite, os HHVs foram encontrados em 10,3%; HSV-1 em 1,6%; HSV-2 em 1,0% e HHV não tipificado em 0,5%; entre meningoencefalite, 43,2% tinham HSV-1; VZV em 27%, e foi o agente mais frequente. Nos casos de encefalite, 27,6% eram causadas por HSV-1, 19,1% por VZV. Gaeta e colaboradores, 2009, encontraram HHVs detectados em 52 de 155 amostras analisadas (33,5%).

Quinze pacientes com encefalite tiveram alguma infecção pelo HHV detectado em amostra de LCR (15/22, 68,2%) (254,310). No DNA de LCR, o HSV-1 foi detectado neste trabalho em cinco casos, todos com hipótese clínica inicial de encefalite. Coinfecção ocorreu em três casos (o primeiro com HSV-1+ HCMV, o segundo caso com HSV-1+EBV+HCMV e outro com HSV-1+EBV+HCMV+ HHV-6). Os sintomas apresentados foram dor de cabeça, convulsões e confusão mental e em 40% dos pacientes imunocompetentes com hipótese clínica de encefalite, com sintomas de cefaléia e convulsão.

Encefalite causada pelo HSV é a causa mais comum de encefalite fatal esporádica no mundo ocidental, com uma incidência anual de 1 a 4 por milhão da população, segundo Linde e colaboradores, 1997. Este vírus provoca uma grande variedade de manifestações clínicas no SN em crianças e adultos com encefalite, atingindo 90% de positividade.

Apesar de todo o conhecimento sobre o HSV-1, ainda há várias perguntas sobre a patogênese e a terapia para o vírus, que atualmente desafia o conhecimento (311). Encefalite causada pelo herpes simplex 1 conta com aproximadamente 2 a 19% de todos os casos de encefalite e 20 a 75% de todos os casos de encefalite necrotizante (312, 313).

O HSV-2 foi o menos frequente HHV e não foi detectado em doentes com hipótese clínica inicial de encefalite, mas dois casos ocorreram, um com sintomas de encefalopatia inespecífica e outro com síndrome cerebelar. A literatura sugere que a infecção pelo HSV-2 pode ocorrer com um curso benigno em adultos mas, em um caso na literatura o desfecho foi diferente, com a apresentação de um caso grave de encefalite causada pelo HSV-2 (342). Pode ser que os casos de doença causada pelo HSV-2 possam ser subestimados e nem todos façam diagnóstico laboratorial diferencial.

Poucos estudos têm sido diretamente relacionados com a incidência da detecção do DNA do VZV em tecidos de autópsia de indivíduos saudáveis. Liedtke e colaboradores (314) usaram a PCR para determinar a presença de DNA de HSV-1 e VZV em gânglios trigêmeos e bulbos olfatórios de 109 casos forenses

*postmortem*. O HSV-1 foi encontrado em 15,5% dos bulbos olfatórios, mas o VZV foi encontrado em apenas 1% dos bulbos olfatórios.

Vários estudos avaliaram o papel do VZV em várias doenças neurológicas, fornecendo evidências adicionais de que o VZV não é incidental, pois é largamente detectado em tecidos cerebrais *postmortem*. Análises por PCR falharam em revelar o DNA do VZV em córtex do lobo temporal de 8 pacientes esquizofrênicos, 8 pacientes não esquizofrênicos vítimas de suicídio e 8 indivíduos controle saudáveis (315). Similarmente, nenhum DNA de VZV foi demonstrado por PCR em tecido cerebral de crianças epiléticas com encefalite crônica de Rasmussen (316) e em tecido cerebral de indivíduos idosos saudáveis e pacientes com doença de Alzheimer (317). Somente um estudo descreveu a detecção do DNA do VZV em uma proporção significativa de cérebros de pacientes com esclerose múltipla e indivíduos controle (318), porém, estes resultados nunca foram confirmados.

A PCR tem excluído o VZV como a causa de arterite de células gigantes (319) e encefalomalacia multifocal, (320) mas tem-se verificado o papel do vírus em algumas infecções congênicas (77) O vírus varicela zoster (VZV), pode reativar e causar o herpes zoster. Complicações do SN central pode seguir tanto na infecção primária como na reativação do VZV. As manifestações mais graves surgem quando o VZV invade a medula espinal ou as artérias cerebrais após reativação do vírus, provocando doenças tais como mielite e vasculopatias focais.

O Fórum de Gestão Internacional dos Herpesvírus (IHMF) desenvolveu diretrizes para ajudar no diagnóstico e tratamento de síndromes do SN associadas com VZV e estes têm-se centrado em vasculopatias. As novas diretrizes recomendam que em caso de suspeita de vasculopatia causada pelo VZV, análises de LCR por nested PCR devem ser realizadas. Como anticorpos de VZV podem estar presentes no LCR mesmo na presença ou ausência de DNA de VZV detectável, anticorpos específicos de VZV no LCR devem também ser analisados e pode existir uma elevada probabilidade de doença do SN. O

diagnóstico precoce dessas complicações graves é importante, pois o tratamento antiviral pode ser eficaz (321).

Neste trabalho, um caso de VZV+HHV-7 ocorreu em um paciente com suspeita de encefalite, que apresentou dor de cabeça, convulsões e alterações no comportamento.

Como dito anteriormente, doze pacientes infectados por EBV foram detectados em amostras de LCR e 40% tinham como hipótese clínica inicial encefalite. Todos os casos positivos detectados foram de coinfeção: a) dois casos EBV+HHV-6 com suspeita clínica de encefalite: convulsão; b) dois casos EBV+HCMV+HHV-6 -encefalite: dor de cabeça, vômitos, fraqueza; c) dois casos EBV + HCMV- um com encefalite, febre, convulsão, baixo nível de consciência e o outro, com suspeita clínica de encefalopatia, sofria de dor de cabeça, alteração no comportamento; d). um paciente com esclerose múltipla e; e) meningoencefalite.

Podemos supor, que todos estes sintomas apresentados pelos pacientes com coinfeções pelos HHVs podem ter o quadro clínico exacerbado. Mesmo assim, ao apresentarmos os resultados, verificamos que possa existir uma relação entre a reativação e a mesma pode ter ocorrido sequencialmente, com o HHV-7 sendo o primeiro a ser reativado, e em seguida, provocando a reativação dos outros HHVs.

Verificamos que apenas dois pacientes tiveram monoinfecção para HSV-1 (vírus do herpes simplex). Esses pacientes tinham encefalite crônica, com dor de cabeça e convulsão.

Vários estudos têm revelado que a base molecular para o vírus podem ser repetições no genoma de HSV e o gene da timidina quinase e que estas sequências podem transmitir neurovirulência. Além disso, as interações complexas entre o vírus e hospedeiro, da resposta imune celular podem estar envolvidos na neurovirulência (322, 333,334).

Estudo realizado por Martelius em 2011, mostrou que o DNA do EBV foi encontrado frequentemente em conjunto com outros achados microbiológicos em amostra de LCR de pacientes imunocomprometidos. EBV parece estar associado com encefalite em receptores de transplante de células-tronco (268).



Os dados apresentados no presente estudo demonstraram que o DNA do HSV tipos 1 e 2, VZV, o EBV, HCMV, HHV-6 e HHV-7 podem ser detectados em amostras de LCR e plasma usando a nested PCR em pacientes com suspeita de infecção herpética no SN.

Os vírus da subfamília alphaherpesvirus (VZV, HSV-1 e HSV-2) podem causar infecções graves do SN em hospedeiros imunocompetentes (61), e podem apresentar principalmente meningite ou encefalite durante a uma infecção primária ou reativação (42, 61, 335, 336, 337, 338).

Embora complicações causadas por estes vírus sejam raras e ainda não estão claros quais os fatores que contribuem para o desenvolvimento de doença do SN somente em alguns indivíduos, há uma quantidade bem maior de população infectada (338, 339, 340,341).

A importância da coinfeção por HHV no SN e as manifestações clínicas associadas requerem uma investigação mais aprofundada. A detecção de DNA viral em amostra de LCR por PCR trouxe uma nova dimensão para os diagnósticos laboratoriais de infecção do SN (40).

Os resultados deste estudo sugerem que uma suspeita de diagnóstico consistente com doença causada por HHV no SN pode ser confirmada por testes específicos de biologia molecular, tal como a nested PCR.

Observou-se que a presença de coinfeção ocorreu com a detecção do DNA de mais do que um herpesvírus na mesma amostra. E é um evento que pode ocorrer em pacientes com distúrbios do SN e também em pacientes imunocompetentes, em uma população com alta soroprevalência para HHV. O reconhecimento dos padrões clínicos e as características de imagem de doença produzida por diferentes HHVs é importante porque a infecção pode ser tratada com sucesso.

## 7. Conclusões

Neste estudo, conseguimos detectar através da técnica da nested PCR, o DNA de cada espécie de HHV, causadores de infecções no SN em LCR em pacientes imunocompetentes com disfunções neurológicas.

A técnica da nested PCR realizada em DNA extraída de LCR mostrou uma positividade de 51,9% (27/52) pacientes positivos para os HHV estudados, sendo que a faixa etária variou de 1 dia a 74,4 anos, com predomínio do sexo feminino.

O HHV mais frequente encontrado foi o HCMV, com 55,6% (15/27), seguido pelo EBV, com 44,4% (12/27), HHV-6 (10/27, 37%), HHV-7 (9/27, 33,3%), HSV-1 (5/27, 18,5%), VZV (3/27, 11,1%) e por último, o HHV-2, com 2/27 (7,4%).

Infecção causada por um único subtipo viral ocorreu em 37% das amostras e a detecção de dois ou mais subtipos de HHV (coinfecção) ocorreu em 63%.

Os valores de sensibilidade e especificidade do teste de nested PCR realizado com DNA extraído de plasma foram obtidos utilizando os resultados do nested PCR no LCR como referência padrão. Os testes de nested PCR realizados no plasma mostraram concordância com aqueles realizados no LCR para os subtipos HSV-2 ( $p \geq 0,063$ ), HCMV ( $p \geq 0,754$ ) e HHV-6 ( $p \geq 0,508$ ).

Com este trabalho, conseguimos chegar às seguintes conclusões:

- diagnosticamos o tipo de infecção causada pelos herpesvírus em pacientes com suspeitas de infecções virais no sistema nervoso utilizando a nested PCR;
- realizamos o diagnóstico diferencial de cada tipo de DNA de HHV encontrado com a utilização de primers específicos para cada espécie.
- investigamos as associações entre estes vírus e a expressão clínica associada, permitindo a utilização de antivirais disponíveis

O encontro de elevadas taxas de positividade dos vírus HHV nos pacientes imunocompetentes, principalmente nos casos de detecção de um até mais tipos de HHV encontrados na mesma amostra, sugere que esta família exerce um papel

importante na patogênese das infecções do sistema nervoso e que, provavelmente, um vírus age em conjunto com o outro, ou separadamente.

Testes para estimar as cargas virais de cada um destes agentes podem ser realizados, com o intuito de verificar realmente qual dos vírus está causando maior dano aos pacientes. Medindo a carga viral com outros testes moleculares, tais como a PCR em Tempo Real, poderemos distinguir ou apontar melhor qual o vírus que apresenta maior carga viral e determinar que se este determinado vírus é o principal coadjuvante na relação da causa de infecção e dano no sistema nervoso, tanto em pacientes imunocompetentes como em imunodeprimidos.

O plasma pode ser utilizado ao invés do LCR na detecção molecular do DNA dos herpesvírus.

## 8. Referências Bibliográficas

- 1) Irani DN. Aseptic meningitis and viral myelitis. *Neurol Clin.* 2008; 26 (3): 635-55.
- 2) Lee BE, DavieS HD. Aseptic meningitis. *Curr Opin Infect Dis.* 2007; 20(3):272-7.
- 3) Nahdi I, Boukoum H, Nabil BSA, Ben RF, Hammami S, Chebel S, Mahbouba FA.et al. Detection of herpes simplex virus (1 and 2), varicella-zoster virus, cytomegalovirus, human herpesvirus 6 and enterovirus in immunocompetent Tunisian patients with acute neuromeningeal disorder. *J Med Virol.* 2012; 84 (2):282-9.
- 4) Cinque P, Vago L, Dahl H, Brytting M, Terreni MR, Fornara C, Racca S, Castagna A, Monforte AD. et al. Polymerase chain reaction on cerebrospinal fluid for diagnosis of virus-associated opportunistic diseases of the central nervous system in HIV-infected patients. *AIDS.* 1996; 10(9):951-8.
- 5) Calvario A, Bozzi A, Scarasciulli M, Ventola C, Seccia R, Stomati D, Brancasi B. Herpes Consensus PCR test: a useful diagnostic approach to the screening of viral diseases of the central nervous system. *J Clin Virol.* 2002; 25, (1):71-8.
- 6) Bulakbasi N, Kocaoglu M. Central Nervous System Infections of Herpesvirus Family. *Neuroimaging Clin N Am.* 2008; 18(1):53-84.
- 7) Romero JR, Newland JG. Viral meningitis and encephalitis: traditional and emerging viral agents. *Semin Pediatr Infect Dis.* 2003; 14(2): 72-82.
- 8) Rantalaiho T, Färkkilä M, Vaheri A, Koskiniemi M. Acute encephalitis from 1967 to 1991. *J Neurol Sci.* 2001; 184(2): 169-77.
- 9) Roizman B, Sears AE. Herpes simplex viruses and their replication. In: Fields BN, Knipe DM, editors. *Virology.* 2 nd edition. New York: Raven; 1990. 1795-841.
- 10) Ison MG. Respiratory viral infections in transplant recipients. *Antivir Ther.* 2007, 12(4):627-638.

- 11) Kimberlin DW, Plotkin SA. Vaccines for viral diseases with significant central nervous system manifestations. In: *Infections of the Central Nervous System*, 2 nd edn. 1997; (Scheld WM, Whitley RJ, Durak DT eds. New York: Lippincott-Raven Publishers Ltd, 983-1012.
- 12) Griffin DE, Johnson R. Encephalitis, myelitis, and neuritis. *Principles and practice of infectious diseases*. 1990; Churchill Livingstone; 3: 762-8.
- 13) Silva MMG. Encefalites Virais Agudas. *Prática Hospitalar*. 2005; 40: 1-6.
- 14) SINAN- Sistema de Informação de Agravos de Notificação, 2006.
- 15) Komaroff AL, Ablashi D, Jacobson S. Summary of the 6th International Conference on HHV-6 and -7. *Herpes*. 2008; 15 (2):36-8.
- 16) Styczynski J, Reusser P, Einsele H, de la Camara R, Cordonnier C, Ward KN, Ljungman P, Engelhard D: Management of HSV, VZV and EBV infections in patients with hematological malignancies and after SCT: guidelines from the Second European Conference on Infections in Leukemia. *Bone Marrow Transplant*. 2009; 43(10):757-70.
- 17) Matthes-Martin S, Feuchtinger T, Shaw PJ, Engelhard D, Hirsch HH, Cordonnier C, Ljungman P: European guidelines for diagnosis and treatment of adenovirus infection in leukemia and stem cell transplantation: summary of ECIL-4 (2011). *Transpl Infect Dis*. 2012, 14(6):555-563.
- 18) Pollak L, Dovrat S, Book M, Mendelson E, Weinberger M. Varicella zoster vs herpes simplex meningoencephalitis in the PCE era . A single center study. *J Neurol Sci*. 2012;15, 314(1-2):29-36.
- 19) DeBiasi RL, Kleinschmidt-Demasters BK, Richardson-Burns S, Tyler KL. Central nervous system apoptosis in human herpes simplex virus and cytomegalovirus encephalitis. *J Infect Dis*. 2002; 1; 186 (11):1547-57.
- 21) Boivin G. Diagnosis of herpesvirus infections of the central nervous system. *Herpes*. 2004; (1) 2:48A-56A.
- 22) Rimério CAT, De Oliveira RS, de Almeida Bonatelli MQ, Nucci A, Costa SC, Bonon SH. Human herpesvirus infections of the central nervous system: Laboratory diagnosis based on DNA detection by nested PCR in plasma and cerebrospinal fluid samples. *J Med Virol*. 2015; 87(4):648-55.

- 23) Rojanawiwat A, Miura T, Thaisri H, Pathipvanich P, Umnajsirisuk S, Koibuchi T, et al. Frequent detection of Epstein-Barr Virus and cytomegalovirus but not JC virus DNA in cerebrospinal fluid samples from human immunodeficiency virus-infected patients in northern Thailand. *J Clin Microbiol.* 2005;43(7):3484-6.
- 24) Kelly MJ, Benjamin LA, Cartwright K, Ajdukiewicz KM, Cohen DB, Menyere M, et al. Epstein-barr virus coinfection in cerebrospinal fluid is associated with increased mortality in Malawian adults with bacterial meningitis. *J Infect Dis.* 2012; 205 (1):106 -10.
- 25) Davison AJ, Eberle R, Ehlers B, Hayward GS, McGeoch DJ, Minson AC, Pellett PE, Roizman B, Studdert MJ, Thiry E. The order Herpesvirales. *Arch Virol.* 2009; 154 (1):171-7.
- 26) Moore PS, Gao JS, Dominguez G, Cesarman E, Lungu O, Knowles M, Garber R, McGeoch DJ, Pellett P, Chang Y. Primary characterization of a herpesvirus-like agent associated with Kaposi's sarcoma. *J Virol.* 1996; 70(1):549-58.
- 27) Goodrum F, Caviness K, Zagallo P. Human cytomegalovirus persistence. *Cell Microbiol May.* 2012; 14(5):644-55.
- 28) De Bolle L, Naensens L, De Clercq E. Update on Human Herpesvirus 6 Biology, Clinical Features, and Therapy. *Clin Microbiol Rev.* 2005; 18(1): 217-245.
- 29) Levini PH, Ablashi DV. An etiologic perspective of the new Herpesviruses: HHV-7 and HHV-8. *Infect Med.* 1999; 16 (1): 24-34.
- 30) Grinde B. Herpesviruses: latency and reactivation – viral strategies and host response. *J Oral Microbiol.* 2013; 25, 5.
- 31) Ryan K. Plague and Other Bacterial Zoonotic Diseases. In: Sherris J.C., Ryan K.J., Ray C.G. (eds) *Medical Microbiology: An Introduction to Infectious Diseases.* Fourth Edition. McGraw-Hill, USA; 2004, 481–491.
- 32) Kimberlin DW. Herpes simplex virus infections of the central nervous system. *Semin Pediatr Infect Dis.* 2003 ; 14(2):83-9.
- 33) Bale JF JR. Human herpesviruses and neurological disorders of childhood. *Semin Pediatr Neurol.* 1999; 6 (4): 278-87.

- 34) Dimmock N, Easton A, Leppard K. Introduction to Modern Virology. 6. ed. 2007; Massachusetts: Wiley-Blackwell, 536.
- 35) Wagner E, Hewlett M. Basic Virology. 1999. Blackwell Science 30 th Edition, Inc., USA.
- 37) Tien RD, Dillon WP. Herpes trigeminal neuritis and rhombencephalitis on Gd-DTPA-enhanced MR imaging. AJNR Am J Neuroradiol. 1990; 11(2):413-4.
- 38) Markert M, Medlock MD, Rabkin SD, et al. Conditionally replicating herpes simplex virus mutant, G207 for the treatment of malignant glioma: results of a phase I trial. Gene Ther. 2000; 7: (10), 867–874.
- 39) Miranda MMFS. Viroses Dermatópicas *In: Introdução à Virologia Humana*. 2002; (Santos NOS, Romanos MTV, Wigg MD) 1ed. Guanabara Koogan. Capítulo 7, 75 – 85.
- 40) Ferreira W, Sousa J. Microbiologia. 1ªed, 3 v. Lisboa: Lidel – Edições. Técnicas Lda, 2002.
- 41) Roizman B, Sears AE. Herpes Simplex viruses an replication *In: Fields Knipe BN, Howley DM, (Ed.) Fields Virology*. 1996; Philadelphia: Lippincott-Raven. 2231-2295.
- 42) Whitley RJ. Herpes simplex encephalitis: adolescents and adults. Antiviral Res. 2006; 71(2-3): 141-8.
- 43) Dan K, Miyashita K, Seto Y *et al*. Quantitation of herpes simplex viral DNA in Vero cells for evaluation of an antiviral agent using the polymerase chain reaction. J Virol Methods. 1998; 76(1-2):73-9.
- 44) Livorsi D, Anderson E, Qureshi S, Howard M, Wang YF, Franco-Paredes C. Brainstem encephalitis: an unusual presentation of herpes simplex virus infection. J Neurol. 2010; 257(9):1432-7.
- 45) Whitley RJ, Soong SJ, Linneman C, et al. Herpes simplex encephalitis: clinical assessment. JAMA. 1982; 15, 247(3):317-20.

- 46) Koskiniemi M, Rantalaiho T, Piiparinen H, von Bonsdorff CH, Färkkilä M, Järvinen A. et al. Infections of the central nervous system of suspected viral origin: a collaborative study from Finland. *J Neurovirol.* 2001; 7(5):400-8.
- 47) Gilden HD, Mahalingam R, Cohrs RJ, Tyler KL. Herpesvirus infections of Nervous System. *Nature Clinical Practice.* 2007; 2 (3):82-94.
- 48) Disponível em: <http://www-ermm.cbcu.cam.ac.uk/03006987h.htm> [Acesso em 20 jun. 2013].
- 49) Bhattarakosol P, Visaprom S, Sangdara A, Mungmee V. Increase of genital HSV-1 and mixed HSV-1 and HSV-2 infection in Bangkok, Thailand. 2005; 88 (4): 300- 4.
- 50) Meyding-Lamadéu, Strank C. Herpesvirus infections of the central nervous system in immunocompromised patients. *Ther Adv Neurol Disord.* 2012; 5(5):279-96.
- 51) Kurt- Jones EA, Chan M, Zhou S, Wang J, Reed G, Bronson R, Arnold MM, Knipe DM. Herpes simplex virus 1 interaction with Toll-like receptor 2 contributes to lethal encephalitis. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2004; 3 101(5):1315-20.
- 52) Matteras A, Barrios P. *Temas de Bacteriología y Virología para CEFA.* 2001; Montevideo. Librería Médica Editorial, 535 – 566.
- 53) Varella RB, Pires IL, Saraiva CA et al. Diagnóstico laboratorial da infecção pelo vírus herpes simples (HSV) em pacientes transplantados e não- transplantados. *J Bras Patol Med Lab.* 2005; 41: 257-262.
- 54) Madigan M, Martinko J, Parker J. Brock – *Biology of Microorganisms* (9 th edition). Prentice Hall. 2000; New Jersey, USA.
- 55) Lupi O. Herpes Simples. *An Bras Dermatol.* 2000; 75 (3): 261-275.
- 56) Chen T, Hundall SD. Anatomical mapping of human herpesvírus reservoirs of infection. *Mod Pathol.* 2006;19(5):726-37.
- 57) Clemens SAC, Farhat CK. Soroprevalência de anticorpos contra vírus herpes simples 1-2 no Brasil. *Rev. Saúde Pública.* 2010; 44 (4): 726- 734.



- 58) Tedder DG, Ashley R, Tyler KL. et al. Herpes simplex virus infection as a cause of benign recurrent lymphocytic meningitis. *Ann Intern Med.*1994; 121(5): 334-338.
- 59) Tyler KL. Herpes simplex virus infections of the nervous system: encephalitis and meningitis, including Mollaret's. *Herpes.* 2004; 11 (2): 57 – 64.
- 60) Arvin A, Gershon A. Control of varicella: why is a two-dose schedule necessary? *Pediatr Infect Dis J.* 2006; 25(6):475-6.
- 61) Steiner I, Kennedy PG, Pacher AR. "The neurotropic herpes viruses: herpes simplex and varicella-zoster". *Lancet Neurol.* 2007; 6 (11): 1015-1028.
- 62) Weller TH. Varicella and herpes zoster, parts 1 and 2. *N Engl J Med.* 1983; 309:1362-1368; 1434-1440.
- 63) Disponível em: [www.mundosemdor.com.br](http://www.mundosemdor.com.br) [Acesso em 09 dez.2014].
- 64) Martinho A. Herpesvirus humanos. [monografia]. Évora (Portugal): Universidade de Évora; 2003.
- 65) Gregoire SM, van Pesch V, Goffette S, Peeters A, Sindic CJ. Polymerase chain reaction analysis and oligoclonal antibody in the cerebrospinal fluid from 34 patients with varicella-zoster virus infection of the nervous system. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2006; 77(8): 938-42.
- 66) Koskiniemi M, Piiparinen H, Rantalaiho T, Eränkö P, Färkkilä M, Räihä K, Salonen EM, Ukkonen P, Vaheri A. Acute central nervous system complications in varicella zoster virus infections. *J Clin Virol.* 2002; 25(3):293-301.
- 67) Kaga K, Kaga M, Tamai F, Shindo M. Auditory agnosia in children after herpes encephalitis. *Acta Otolaryngol.* 2003; 123 (2): 232-5.
- 68) Kaga M, Shindo M, Kaga K. Long-term follow-up of auditory agnosia as a sequel of herpes encephalitis in a child. *J Child Neurol.* 2000; 15(9):626-9.
- 69) La Guardia JJ, Gilden DH. Varicella-Zoster Virus:A re-emergin infection. *J Investig Dermatol Symp Proc.* 2001; 6(3):183-7.
- 70) Gershon AA, Steinberg SP, Schmidt NJ. Varicella-zoster virus. *In* A. Balows, W. J. Hausler, K. L. Herrman, H. D. Isenberg, and H. J. Shadomy (ed.), *Manual of*

clinical microbiology. American Society for Microbiology 1991; Washington, D.C, 838–852.

71) Carvalho C, Reis D, Raposo C. Linfomas uma perspectiva imunológica. Universidade de Évora; 1-14, 2002/2003.

72) Ribeiro-Silva AR, Zucoloto S. O papel do vírus Epstein-Barr na tumorigênese humana. Medicina Ribeirão Preto. 2003; 36:16-23.

73) Chan PK, Ho-Keung NG, Cheung JKL, Cheng AF. Survey for presence and Distribution of human herpesvirus 8 in healthy brain. J Clin Microbiol. 2000; 38 (7): 2772-3.

74) Tsao SW, Tsang CM, To KF, Lo KW. The role of Epstein–Barr virus in epithelial malignancies. J Pathol. 2015; 235(2): 323–333.

75) Rickinson AB, Kieff E. Epstein-Barr virus. In Fields Virology. Fields BN, Knipe DM, Howley PM, Chanock RM, Melnick JL, et al. Philadelphia: Lippincott, Williams & Wilkins. In press, 2006.

76) Hoover S., Ross J., Cohen J. Epstein-Barr virus. In: Scheld W., Whitley R., Marra C., editors. (eds), Infections of the Central Nervous System (3rd edition). Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins. 2004; 175–183.

77) Babcock GJ, Decker LL, Volk M, Lawson TD. EBV persistence in memory cells in vivo. Immunity. 1998; (9): 395-404.

78) Kobayashi R, Takeuchi H, Sasaki M, Hasegawa M, Hirai K. Detection of Epstein-Barr virus infection in the epithelial cells and lymphocytes of non-neoplastic tonsils by in situ hybridization and in situ PCR. Arch Virol. 1998; 143(4):803-13.

79) Fujimoto H, Asaoka K, Imaizumi T, Ayabe M, Shoji H, Kaji M. Epstein-Barr virus infections of the central nervous system. Intern Med. 2003; 42(1):33-40.

80) Weinberg A., Li S., Palmer M., Tyler K. Quantitative CSF PCR in Epstein-Barr virus infections of the central nervous system. Ann Neurol. 2002; 52(5):543-8.

81) Disponível em: [www.immunopaedia.org.za](http://www.immunopaedia.org.za) [ Acesso em 15 jan 2015].

- 82) Fields BN, Knipe DM, Howley PM. Fields Virology. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers; 1996.
- 83) Faulkner GC, Krajewski AS, Crawford DH. The ins and outs of EBV infection. Trends Microbiol. 2000; 8: (4), 185-9.
- 84) Junker AK. Epstein-Barr virus. Pediatrics. 2005; Elk Grove Village, 26: 3, 79-85.
- 85) Feinberg WM, Zonis J, Minnich LL. Epstein-Barr virus-associated myelopathy in an adult. Arch Neurol. 1984; 41(4):454-5.
- 86) Paskavitz JF, Anderson CA, Filley CM, Kleinschmidt-Demasters BK, Tyler KL. Acute arcuate fiber demyelinating encephalopathy following Epstein-Barr virus infection. Ann Neurol. 1995; 38: 127-31.
- 87) Bennett JL, Mahalingam R, Wellish MC, Gilden DH. Epstein-Barr virus-associated acute autonomic neuropathy. Ann Neurol. 1996; 40 (3) : 453-5.
- 88) Disponível em: Disponível em: <http://www.physiopedia.com/Mononucleosis> [acesso em 12 fev. 2015].
- 89) Imai S, Usui N, Sugiura M, Osato T, Sato T, Tsutsumi H, Tachi N, Nakata S, Yamanaka T, Chiba S. Epstein-Barr virus genomic sequences and specific antibodies in cerebrospinal fluid children with neurologic complications of acute and reactivated EBV infections. J Med Virol. 1993; 40: 278-284.
- 90) Griffiths PD, Clark DA, Emery VC. Betaherpesviruses in transplant recipients. J Antimicrob Chemother. 2000; 45 (3):29-34.
- 91) Disponível em : [www.romedic.ro](http://www.romedic.ro). [Acesso em 12 mar. 2014].
- 92) Ho M. The history of cytomegalovirus and its diseases. Med Microbiol Immunol. 2008;197(2):65-73.
- 93) Ribbert H. Ueber protozoenartige Zellen in der Niere eines Syphilitischen Neugeborenen und in der Parotis Von Kindern. Zentralblatt für allgemeine Pathologie. 1904;15:945-948.

- 94) Rafailidis PI, Mourtzoukov EG, Varbobitis IC, Falagos ME. Severe cytomegalovirus infection in apparently immunocompetent patients: a systematic review. *Virology*. 2008; 27, 5:47.
- 95) Mussi-Pinhata MM, Yamamoto AY. Congenital and perinatal infections. *J Pediatr*. 1999; 75 (1): S15-30.
- 96) Griffiths PD. Cytomegalovirus infection of the central nervous system. *Herpes*. 2004, 11(2): 95A-104 A.
- 97) Taylor GH. Cytomegalovirus. *Am Fam Physician*. 2003; 67(3):519-24, Review.
- 98) Ho M. Principles and practice of infectious disease: Cytomegalovirus. 2. Ed., New York, Churchill Livingstone. 1991; 1159-1172.
- 99) Van Der Merr JTM, Drew LW, Bowden RA *et al*. Summary of the International consensus symposium on advances in the diagnosis, treatment and prophylaxis of Cytomegalovirus infection. *Antiviral Res*. 1996; 32(3):119-40.
- 100) Junqueira JJM, Sancho TM, Santos VA DOS. Citomegalovirus: Revisão dos aspectos epidemiológicos, clínicos, diagnósticos e de tratamento. 2008. *News Lab*, 86: 88-104.
- 101) Kalil AC, Levitsky J, Lyden E, Stoner J, Freifeld AG. "Meta-analysis: the efficacy of strategies to prevent organ disease by cytomegalovirus in solid organ transplant recipients." *Ann Intern Med*. 2005; 143 (12): 870-80.
- 102) Murray PR, Rosenthal KS, Kobayashi JS *et al*. Human Herpesviruses. 1998; Cap 51, 3 ed., *Medical Microbiology*, 419-438.
- 103) Sia IG, Patel R. New strategies for prevention and therapy of Cytomegalovirus infection and disease in solid-organ transplant recipients. *Clinical Microbiology*. 2000; 13 (1): 83-121.
- 104) Lübeck PR, Doerr HW, Rabenau HF. Epidemiology of human cytomegalovirus (HCMV) in an urban region of Germany: what has changed? *Med Microbiol Immunol*. 2010; 199(1):53-60.
- 105) Black JB, Pellett PE. Human Herpesvirus 7. *Rev Med Virol*. 1999; 9(4):245-62.

- 106) Clark DA. Human herpesvirus 6. *Rev Med Virol.* 2000; 10(3): 155-73.
- 107) Dockrell DH, Smith TF, Paya CV. Human Herpesvirus 6. *Mayo Clin Proc.* 1999; 74(2):163-70.
- 108) Patel R, Paya CV. Infections in solid-organ transplant recipients. *Clin Microbiol Rev.* 1997; 10:( 1) 86-124.
- 109) Singh N, Carrigan DR. Human herpesvirus-6 in transplantation: an emerging pathogen. *Ann Intern Med.* 1996; 15, 124 (12):1065-71.
- 110) Mocarski ES JR, Courcelle CT. Cytomegaloviruses and their replication. In *Virology.* 2001; (4): 2629-2673 (Eds Knipe D *et al.*) Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins.
- 111) Devetag FC, Boscarolo L. Cytomegalovirus meningoencephalites with paroxysmal course in immunocompetent adults: a new nosographical entity. *Eur Neurol.* 2000; 44(4):242-7.
- 112) McLaughlin K, Sandhu S, Wu C, Muirhead N, Hollomby D, Jevnikar A. Transplanting kidneys from CMV-seropositive donors to CMV-seronegative recipients is not associated with poorer renal allograft function or survival. *Nephrol Dial Transplant.* 2005; 20 (1):176-80.
- 113) Snyderman DR, Werner BG, Heinze-Lacey B, Berardi VP, Tilney NL, Kirkman RL *et al.* "Use of cytomegalovirus immune globulin to prevent cytomegalovirus disease in renal-transplant recipients.". *N Engl J Med.* 1987; 317 (17): 1049-54.
- 114) Sain LC, Bubic I, Schnee M, Ruzsics Z, Mohr C, Jonjic S *et al.* "Targeted Deletion of Regions Rich in Immune-Evasive Genes From the Cytomegalovirus Genome as a Novel Vaccine Strategy". *J Virol.* 2007; 81(24): 13825–13834.
- 115) Reapa EA, Morris J, Dryga SA, Maughan M, Talarico T, Esch RE, *et al.* "Development and Preclinical Evaluation of an Alphavirus Replicon Particle Vaccine for Cytomegalovirus". *Vaccine.* 2007; 16, 25(42):7441-9.
- 116) Humphreys IA, Trez DE C, Kinkade A, Benedict CA *et al.* "Cytomegalovirus exploits IL-10–mediated immune regulation in the salivary glands." *Journal of Experimental Medicine.* 2007; 14, 204(5): 1217–1225.

- 117) Lynn J. Transverse Myelitis: symptoms, causes and diagnosis. The Transverse Myelitis Association. 1997; 155-165.
- 118) Engman ML, Lewensohn-Fuchs I et al. Congenital cytomegalovirus infection: the impact of cerebral cortical malformations. *Acta Paediatr.* 2010; 99 (9):1344-9.
- 119) Ablashi DV, Balachandran SF, Josephs CL, Hung GRF *et al.*, Genomic polymorphism, growth properties, and immunologic variations in human herpesvirus – 6 isolates. *Virology.* 1991; 184, 545-552.
- 120) Aubin JT, Agut H, Collandre H, Yamanishi J. Antigenic and genetic differentiation of two putative types of human herpesvirus 6. *J Virol. Methods.* 1993; (41): 223-234.
- 121) Braun DK, Dominguez G, Pellett PE. Human Herpesvirus 6. *Clin. Microbiol Rev.* 1997; 10 (3): 521-567.
- 122) Caserta MT, Mock DJ, Dewhurst S. Human herpesvirus 6. *Clinical Infect Disease.* 2001;15,33(6):829-33.
- 123) Hunt R. Herpes Viruses – Chapter Eleven. *Virology* 5 th Ed, 1994.
- 124) Mori Y. Recent topics related to human herpesvirus 6 cell tropism. *Cell Microbiol.* 2009; 11(7): 1001-1006.
- 125) Disponível em: <http://www.emergingworlds.com> [ acesso em 24 abril 13].
- 126) Kondo K, Kondo T, Okuno T. et al. Latent human herpesvirus 6 infection of human monocytes/macrophages. *J Gen Virol.* 1991; 72 (6):1401-8.
- 127) Santoro F, Kenny PE, Locatelli G, Malnati MS, Berger EA, Lusso P. CD46 é um receptor celular para o herpesvirus humano 6. *Cell.* 1999; 23, 99(7):817-27.
- 128) Leach CT, Sumaya CV, Brow NA. Human herpesvirus-6: Clinical implications of a recently discovered, ubiquitous agent. *J Pediatr.* 1992; 121(2):173-81.
- 129) Farr TJ, Harnett GB, Pietroboni GR, Brucens MR. The distribution of antibodies to HHV-6 compared with other herpesviruses in young children. *Epidemiol Infect.* 1990; 105(3):603-7.

- 130) Komaroff AL. Is human herpesvirus-6 a trigger for chronic fatigue syndrome? *J Clin Virol.* 2006; 37, 1: 39-46. Review.
- 131) Wyatt LS, Frenkel N. Human herpesvirus 7 is a constitutive inhabitant of adult human saliva. *J Virol.* 1992; 66(5):3206-9.
- 132) Okuno T, Takahashi K, Balachandra K, Shiraki K, Yamanishi K, Takahashi M, Baba K. Seroepidemiology of human herpesvirus 6 infection in normal children and adults. *J Clin Microbiol.* 1989; 27(4):651-3.
- 133) Ward KN. The natural history and laboratory diagnosis of human herpesviruses-6 and -7 infections in the immunocompetent. *J Clin Virol.* 2005; 32(3):183-93.
- 134) Zerr DM, Meier AS, Selke SS, Frenkel LM, Huang ML, Wald A, Rhoads MP, Nguy L, Bornemann R, Morrow RA, Corey L. A population-based study of primary human herpesvirus 6 infection. *N Engl J Med.* 2005; 24, 352(8):768-76.
- 135) Barone SR, Kaplan MH, Krilov LR. Human herpesvirus 6 infection in children with first febrile seizures. *J Pediatr.* 1995; 127(1): 95-7.
- 136) Kondo K, Nagafuji H, Hata A, Tomomori C, Yamanishi K. Association of human herpesvirus 6 infection of the central nervous system with recurrence of febrile convulsions. *J Infect Dis.* 1993; 167(5):1197-200.
- 137) Asano Y, Yoshikawa T, Suga S, Kobayashi I, Nakashima T, Yazaki T, Kajita Y, Ozaki T. Clinical features of infants with primary human herpesvirus 6 infection (exanthem subitum, roseola infantum). *Pediatrics.* 1994; 93(1):104-8.
- 138) Yamanishi K, Okuno T, Shiraki K, Takahashi M, Kondo T, Asano Y, Kurata T. Identification of human herpesvirus-6 as a causal agent for exanthem subitum. *Lancet.* 1988; 14,1(8594):1065-7.
- 139) Disponível em: <http://www.herpesclinic.com> [Acesso em 15 jun 14].
- 140) Campadelli-Fiume G, Mirandola P, Menotti L. Human Herpesvirus 6: An Emerging Pathogen. *Emerging Inf. Diseases.* 1999; 5 (3): 353-366.
- 141) Stoeckle MY. The Spectrum of Human Herpesvirus 6 Infection: From Roseola Infantum to Adult Disease. *Annu Rev Med.* 2000; 51:423-30.

142) Yoshikawa T, Asano Y. Central nervous system complications in human herpesvirus-6 infection. *Brain Dev.* 2000; 22(5):307-14.

143) Laina I, Syriopoulou VP, Daikos GL, et al. Febrile Seizures and Primary Human Herpesvirus 6 Infection. *Pediatr Neurol.* 2010 ; 42(1):28-31.

144) Cirone M, Cuomo L, Zompetta C, Ruggieri S, Frati L, Faggioni A, Ragona G, Clark DA, Freeland ML, Mackie LK, Jarrett RF, Onions DE. "Prevalence of antibody to human herpesvirus 7 by age". *The Journal of Infectious Diseases* (University of Chicago Press). 1993; 168 (1): 251-2.

145) Donati D, Akhyani N, Fogdell-Hahn A, Cermelli C, Cassiani-Ingoni R, Vortmeyer A, Heiss JD, Cogen P, Gaillard WD, Sato S, Theodore WH, Jacobson S. Detection of human herpesvirus-6 in mesial temporal lobe epilepsy surgical brain resections. *Neurology.* 2003; 25,61(10):1405-11.

146) Soldan SS, Berti R, Salem N et al. Association of human herpes virus 6 (HHV-6) with multiple sclerosis: increased IgM response to HHV-6 early antigen and detection of serum HHV-6 DNA. *Nat Med.* 1997; 3(12):1394-7.

147) Chan PK, Ho-Keung NG, Hui M, Cheng AF. Prevalence and distribution of human herpesvirus 6 variants in adult human brain. *J Med Virol.* 2001; 64(1):42-6.

148) Cuomo LP, Trivedi P, Cardillo MR, Gagliardi FM, Vecchione A, Caruso R, Calogero A, Frati L, Faggioni A, Ragona G. Human herpesvirus 6 infection in neoplastic and normal brain tissue. *J Med Virol.* 2001; 63(1):45-51.

149) Suga S, Yoshikawa T, Asano Y et al. Clinical and virological analyses of 21 infants with exanthem subitum (roseola infantum) and central nervous system complications. *Ann Neurol.* 1993; 33(6):597-603.

150) Drobyski WR, Knox KK, Majewski D, Carrigan DR. Brief report: fatal encephalitis due to variant B human herpesvirus-6 infection in a bone marrow-transplant recipient. *N Engl J Med.* 1994; 12, 330(19):1356-60.

151) McCullers JA, Lakeman FD, Whitley RJ. Human herpesvirus 6 is associated with focal encephalitis. *Clin. Infect. Dis.* *Clin Infect Dis.* 1995; 21(3):571-6.



152) Kamei A, Ichinohe S, Onuma R, Hiraga S, Fujiwara T. Acute disseminated demyelination due to primary human herpesvirus-6 infection. *Eur J Pediatr.* 1997; 156(9):709-12.

153) Novoa LJ, Nagra RM, Nakawatase T, Edwards LT, Tourtellotte WW, Cornford ME. Fulminant demyelinating encephalomyelitis associated with productive HHV-6 infection in an immunocompetent adult. *J Med Virol.* 1997; 52(3):301-8.

154) Mackenzie IR, Carrigan DR, Wiley CA. Chronic myelopathy associated with human herpesvirus-6. *Neurology.* 1995; 45(11):2015-7.

155) Caserta MT, Hall CB, Schnabel K, McIntyre K, Long C, Costanzo M et al. Neuroinvasion and persistence of human herpesvirus 6 in children. *J Infect Dis.* 1994; 170 (6):1586-9.

156) Wang, FZ, Linde A, Hagglund H, Testa M, Locasciulli A, Ljungman P. Human herpesvirus 6 DNA in cerebrospinal fluid specimens from allogeneic bone marrow transplant patients: does it have clinical significance? *Clin Infect Dis.* 1999; 28(3):562-8.

157) Ablashi DV, Devin LC, Yoshikawa T, Lautenschlager I, Luppi M. Review Part 3: Human Herpesvirus-6 in Multiple Non-Neurological Diseases. *J Med Virol.* 2010; 82(11):1903-10.

158) Caserta MT, Mcdermott MP, Dewhurst S, Schnabel K, Crnaahan JA, Gilbert L, Lathan G, Lofthus GK, Hall CB. Human herpesvirus 6 (HHV6) DNA persistence and reactivation in healthy children. *J Pediatr.* 2004; 145(4):478–84.

159) Caserta MT, Hall CB, Schnabel K, Lofthus G, Mcdermott MP. Human herpesvirus (HHV)-6 and HHV-7 infections in pregnant women. *J Infec Dis.* 2007; 196 (9):1296–303.

160) Caruso A, Caselli E, Fiorentini S, Rotola A, Prandini A, Garrafa E, Saba E, Alessandri G, Cassai E, Di Luca D. U94 of human herpesvirus 6 inhibits in vitro angiogenesis and lymphangiogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2009; 106 (48): 20446-51.

161) Pichereau C, Desseaux K, Janin A, Scieux C, et al. The complex relationship between human herpesvirus 6 and acute graft-versus-host disease. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2012; 18(1):141–4.

162) Deback C, AGBALIKA F, Scieux C, Marcelin AG, Gautheret-Dejean A, Cherot J, Hermet L, Roger O, Agut H. Detection of human herpesviruses HHV-6, HHV-7 and HHV-8 in whole blood by real-time PCR using the new CMV, HHV-6, 7, 8 R-gene kit. *J Virol Methods*. 2008; 149(2):285–91.

163) Pritchett JC, Nanau RM, Neuman MG. The link between Hypersensitivity Syndrome Reaction Development and Human Herpes Virus-6 Reactivation. *Int J Hepatol*. 2012; 2012:723062.

164) Nicholas J. Determination and analysis of the complete nucleotide sequence of human herpesvirus. *J. Virol*. 1996; 70(9): 5975-89.

165) Megaw AG, Rapaport D, Avidor B, Frenkel N, Davison AJ .The DNA sequence of the RK strain of human herpesvirus 7. *Virology*. 1998; 25, 244(1):119-32.

166) Lusso P, Secchiero P, Crowley RW et al. CD4 is a critical component of the receptor for human herpesvirus 7: interference with human immunodeficiency virus. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994; 26, 91 (9):3872-6.

167) Levy JA. Three new human herpesviruses (HHV6, 7, and 8). *Lancet*. 1997; 22, 349(9051):558-63.

168) Wyatt LS, Rodriguez WJ, Balachandran N, Frenkel N. Human herpesvirus 7: antigenic properties and prevalence in children and adults. *J Virol*. 1991; 65(11):6260-5.

169) Tanaka K, Kondo T, Torigoe S, Okada S, Mukai T, Yamanishi K. Human herpesvirus 7: another causal agent for roseola (exanthem subitum). *J Pediatr*. 1994; 125(1):1-5.

170) Clark DA, Freeland JML, Mackie PLK, Jarrett RF, Onions DE. Prevalence of antibody to human herpesvirus 7 by age. *J Infect Dis*. 1993; 168:251–252.

171) Cermelli C, Fabio G, Montorsi M, Sabbatini AM, Portolani M. "Prevalence of antibodies to human herpesviruses 6 and 7 in early infancy and age at primary infection". *New Microbiologica*. 1996; 19 (1): 1–8.

- 172) Yoshikawa T. Human Herpesvirus- 6 and 7 Infections in transplantation". *Pediatric Transplantation*. 2003; 7 (1): 11–17.
- 173) Torigoe S, Koide W, Yamada M, Miyashiro E, Tanaka-Taya K, Yamanishi K. Human herpesvirus 7 infection associated with central nervous system manifestations. *J Pediatr*. 1996; 129(2):301-5.
- 174) Torigoe S, Kumamoto T, Koide W, Taya K, Yamanishi K. Clinical manifestations associated with human herpesvirus 7 infection. *Arch Dis Child*. 1995; 72(6):518-9.
- 175) Caserta MT, Hall CB, Schnabel K, Long CE, D'Heron N. Primary human herpesvirus 7 infection: a comparison of human herpesvirus 7 and human herpesvirus 6 infections in children. *J Pediatr*. 1998; 133(3):86-9.
- 176) Clark DA, Kidd IM, Collingham KE, Tarlow M, Ayeni T, Riordan A, Griffiths PD, Emery VC, Pillay D. Diagnosis of primary human herpesvirus 6 and 7 infections in febrile infants by polymerase chain reaction. *Arch Dis Child*. 1997; 77 (1): 42-5.
- 177) Ward RL, Pax KA, Sherwood JR, Young EC, Schiff GM, Bernstein DI. Salivary antibody titers in adults challenged with a human rotavirus. *J Med Virol*. 1992; 36(3):222-5.
- 178) Chang Y, Cesarman E, Pessin MS, Lee F, Culpepper J. Identification of herpesvirus-like DNA sequences in AIDS-associated Kaposi's sarcoma. *Science*. 1994; 16, 266(5192):1865-9.
- 179) Ablashi DV, Chatlynne LG, Whitman JE, Cesarman E. Spectrum of Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus, or Human Herpesvirus 8 Diseases. *Clinical Microbiology Reviews*. 2002; 15(3): 439 - 464.
- 180) O'Leary J, Kennedy MM, McGee JO. Kaposi's sarcoma associated herpesvirus (KSHV/HHV-8): epidemiology, molecular biology and tissue distribution. *Mol Pathol*. 1997; 50(1):4-8.
- 181) Schulz TF. KSHV/HHV8 associated lymphoproliferations in the AIDS setting. *Eur J Cancer*. 2001; 37(10):1217-26.
- 182) Bubman D, Cesarman E. Pathogenesis of Kaposi's sarcoma. *Hematol Oncol Clin North Am*. 2003; 17(3):717- 45.

- 183) Lennette ET, Blackbourn DJ, Levy JA. Antibodies to human herpesvirus type 8 in general population and Kaposi's sarcoma patients. *Lancet*. 1996; 28, 348 (9031):858-61.
- 184) Blackbourn D, Ambroziak J, Lennette E, Adams M, Ramachandran B. Infection human herpesvirus 8 in healthy North American blood donor. *Lancet*. 1997 1; 349(9052):609-11.
- 185) Disponível em: [www.prn.org](http://www.prn.org) [Acesso em 23 maio 14].
- 186) Specter S, Hodinka RL, Stephen A. *Clinical virology manual*. 2000; 3 rd ed. Washington. Library of Congress Cataloging-in-Publication Data.458.
- 187) Arvanitakis L, Geras RE, Varma A, Gershengorn MC, Cesarman E. Human herpesvirus KSHV encodes a constitutively active G protein- coupled receptor linked to cell proliferation. *Nature*. 1997; (385): 347-350.
- 188) Renne R, Lagunoff M, Zhong W, Ganem D. The size and conformation of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (human herpesvirus 8) DNA in infected cells and virions. *J. Virol*. 1996; 70: (11) 8151-8154.
- 189) Foreman KE. Kaposi's sarcoma: the role of HHV-8 and HIV-1 in pathogenesis. *Expert Rev Mol Med*. 2001; 26, 2001:1-17.
- 190) Diamond C, Brodie SJ, Krieger JN. et al. Human herpesvirus 8 in the prostate glands of men with Kaposi's sarcoma. *J Virol*. 1998; 72(7):6223-7.
- 191) Chen T, Hundall SD. Anatomical mapping of human herpesvírus reservoirs of infection. *Mod Pathol*. 2006;19(5):726-37.
- 192) Decker LL, Shankar P, Khan G *et al*. The Kaposi sarcoma-associated herpesvirus (KSHV) is present as an intact latent genome in KS tissue but replicates in the peripheral blood mononuclear cells of KS patients. *J Exp Med*. 1996; 1, 184(1):283-8.
- 193) Blasig C, Zietz C, Haar B. Monocytes in Kaposi's sarcoma lesions are productively infected by human herpesvirus 8. *J Virol*. 1997; 71(10):7963-8.
- 194) Coberllino M, Parravicini C, Aubin JT, Berti E. Kaposi's sarcoma and herpesvirus- like DNA sequences in sensory ganglia. *N Engl J Med*. 1996, 334:1341-1342.

- 195) Chang Y, Cesarman E, Pessin MS, Lee F, Culpepper J. Identification of herpesvirus-like DNA sequences in AIDS-associated Kaposi's sarcoma. *Science*. 1994; 16, 266(5192):1865-9.
- 196) Lyall H, Patton GS, Sheldon J et al. Evidence for horizontal and not vertical transmission of Human Herpesvirus 8 in children born to human immunodeficiency virus-infected mothers. *Journal of Pediatric Infectious Disease*. 1999; 18(9):795-799.
- 197) Whiby D, Howard MR, Tenant-Flowers M. et al. Detection of Kaposi's sarcoma associated herpesvirus in peripheral blood of HIV-infected individuals and progression to Kaposi's sarcoma. *Lancet*. 1995; 346:799-802.
- 198) Howard M, Whiby D, Bahadur G et al. Detection of human herpes-virus 8 DNA in semen from HIV-infected individuals but not healthy semen donors. *AIDS*. 1997;11(2):15-9.
- 199) LaDuca JR, Love JL, Abbott LZ, Dube S, Freidman-Kien AE, Poesz BJ. Detection of Human Herpesvirus 8 DNA sequences in tissues and bodily fluids. *J Infect Dis*. 1998;178(6):1610-5.
- 200) Andreoni M, Sarmati L, Nicastrì E, El Sawaf G, El Zalabani M, Uccella I, Bugarini R, Parisi SG, Rezza G. Primary human herpesvirus 8 infection in immunocompetent children. *JAMA*. 2002; 13,287(10):1295-300.
- 201) Niedt GW, Prioleau PG. Kaposi's sarcoma occurring in a dermatome previously involved by herpes zoster. *J Am Acad Dermatol*. 1988; 18(2):448-51.
- 202) Solomon T, Hart IJ, Beeching NJ. Viral encephalitis: a clinician's guide. *Pract Neurol*. 2007; 7(5):288-305.
- 203) Laboratório Fleury- Centro de Medicina Diagnóstica. Manual de Neurodiagnóstico <[http://www.fleury.com.br/htmls/manuais/manualneuro/3.liquido\\_cefalorraquidiano.htm](http://www.fleury.com.br/htmls/manuais/manualneuro/3.liquido_cefalorraquidiano.htm)>.[Acesso em 24 março 15].
- 204) American Academy of Neurology. Report of the quality Standards Subcommittee. Practice parameters: lumbar puncture. *Neurology*. 1993; 43: 625-7.
- 205) Adams R, Victor M. Principles of Neurology. 4a. ed. EUA. McGraw-Hill, 1989.

206) Almeida SM. Líquido Cefalorraquidiano. In: Teive HAG, Nývák EM. Condutas em emergências Neurológicas. Única Edição. São Paulo, Lemos Editorial, 2001; 171-181.

207) Puccioni- Sholer M, machado LR, Canuto R, Takaynagui OM, Almeida SM, Livramento JÁ. Coleta do líquido cefalorraquidiano, termo de consentimento livre e esclarecido e aspectos éticos em pesquisa. Recomendações do Departamento Científico de LCR da Academia brasileira de Neurologia. Arq Neuropsiquiatr; 2002;60:681-4.

208) Addy DP. When not to do a lumbar puncture. Arch Dis Child. 1987; 62:873-5.

209) Kjeldsberg C, Knight J. Body Fluids: laboratory examination of cerebrospinal, seminal, serous & sinovial fluids. 3a ed. Chicago: American Society of Clinical Pathologists; 1992.

210) Coyle PK. CSF analysis for infections and non-infections disorders. American Academy of Neurology, 2002.

211) Machado LR, Livramento JA, Nobrega JPS, Gomes HR, Spina França A. Neuroinfecção 98. Clínica Neurológica HCFMUSP/Academia Brasileira de Neurologia, São Paulo, 1998, 223.

212) Fishman RA. Cerebrospinal fluid. 2nd Ed. Philadelphia, W.B.Saunders Company,1992.431.

213) Casas I, Pozo F, Trallero G, Echevarría JM, Tenorio A. Viral diagnosis of neurological infection by RT multiplex PCR: a search for entero- and herpes viruses in a prospective study. J Med Virol. 1999; 57(2):145-51.

214) Steiner I, Schmutzhard E, Sellner J. et al. EFNS-ENS guidelines for the use of PCR technology for diagnosis of infections of the nervous system. Eur J Neurol. 2012; 19(10):1278-91.

215) Raschilas F, Wolff M, Delatour F, Chaffaut C, De Broucker T, Chevret S, et al. Outcome of and prognostic factors for herpes simplex encephalitis in adult patients: results of a multicenter study. Clin Infect Dis. 2002; 1, 35(3):254-60.

- 216) Kneen R, Solomon T. Management and outcome of viral encephalitis in Children. *Paediatrics and Child Health*. 2008; 18: (1), 7-16.
- 217) Lupi O. Herpesvírus e imunodepressão. In: Lupi O, Silva AG, Pereira Jr. AC. *Herpes: clínica, diagnóstico e tratamento*. 2000; Rio de Janeiro: Medsi, 157-78.
- 218) Lupi O. Terapêutica anti-herpética. In: Lupi O, Silva AG, Pereira Jr. AC. *Herpes: clínica, diagnóstico e tratamento*. 2000; Rio de Janeiro: Medsi, 233-54.
- 219) Elion GB. Acyclovir: discovery, mechanism of action, and selectivity. *J Med Virol*. 1993; Suppl 1:2-6.
- 220) Prober CG, Kirk LE, Keeney RE. Acyclovir therapy of chickenpox in immunosuppressed children: a collaborative study. *J Pediatr*. 1982; 101(4):622-5.
- 221) Haake DA, Zakowski PC, Haake DL, Bryson YJ. Early treatment with acyclovir for varicella pneumonia in otherwise healthy adults: retrospective controlled study and review. *Rev Infect Dis*. 1990; 12(5):788-98.
- 222) McKendrick MW, McGill JI, White JE, Wood MJ. Oral acyclovir in acute herpes zoster. *Br Med J (Clin Res Ed)*. 1986; 13, 293(6561):1529-32.
- 223) Wood MJ, Mckendrick MW, McGill JI. Oral acyclovir for acute herpes zoster infections in immune-competent adults. *Infection*. 1987;15 Suppl 1:S9-13.
- 224) Agut H, Aubin JT, Huraux JM. Homogeneous susceptibility of distinct human herpesvírus 6 strains to antivirals in vitro. *J Infect Dis*. 1991; 163: 1382-1383.
- 225) Beutner KR, Friedman DJ, Forszpaniak C, Andersen PL, Wood MJ. Valaciclovir compared with acyclovir for improved therapy for herpes zoster in immunocompetent adults. *Antimicrob. Agents Chemother*. 1995; 39:1546–1553.
- 226) Medical Letter on Drugs and Therapeutics. Famciclovir for herpes zoster. *Med. Lett. Drugs*. 1994; Ther. 36:97–98.
- 227) Saltzman R, Jurewicz R, Boon R. Safety of famciclovir in patients with herpes zoster and genital herpes. *Antimicrob Agents Chemother*. 1994; 38(10):2454-7.

- 228) Nascimento MC, Sumita LM, Souza VAF, Pannuti CS. Detection and direct typing of herpes simplex virus in perianal ulcers of patients with AIDS by PCR. *J Clin Microbiol.* 1998; 36(3):848-9.
- 229) Kokuba H, Imafuku S, Burnett JW. Longitudinal study of patient with HSV associated erythema multiforme: viral gene expression and t cell repertoire usage. *Dermatology.* 1999; 198 (3): 233-242.
- 230) Arvin AM. Varicella Zoster-Virus. *Clin Microbiology.* 1996. Reviews, 361-381.
- 231) Tselis A, Duman R, Storch GA, Lisak RP. Epstein-Barr virus encephalomyelitis diagnosed by polymerase chain reaction: detection of the genome in the CSF. *Neurology.* 1997; 48(5):1351-5.
- 232) Merelli E, Bedin R, Sola P, Gentilini M, Pietrosevoli P, Meacci M, et al. Encephalomyeloradiculopathy associated with Epstein-Barr virus: primary infection or reactivation. *Acta Neurol Scand.* 1997; 96 (6):416-20.
- 233) Demmler GJ, Buffone GJ, Schimbor CM, May RA. Detection of cytomegalovirus in urine from newborns by using polymerase chain reaction DNA amplification. *J Infect Disease.* 1988;158 (6):1177-84.
- 234) Flamand L, Gravel A, Boutolleau D, Alvarez-Lafuente R, Jacobson S. Multicenter Comparison of PCR Assays for Detection of Human Herpesvirus 6 DNA in Serum. *J. Clin. Microbiol.* 2008; 46(8): 2700-2706.
- 235) Ihira M, Yoshikawa T, Suzuki K, Ohashi M, Suga S, Asonuma K, Tanaka KI, Asano Y. Correlation between human herpesvirus 6 and 7 infections after living related liver transplantation. *Microbiology and Immunology.* 2001; 45: 225-232.
- 236) Mendez JC, Dockrell DH, Espy MJ, Smith TF, Wilson JA, Harmsen WS, Ilstrup D, Paya CV. Human  $\beta$ -Herpesvirus interactions in solid organ transplant recipients. *J Infect Dis.* 2001;15, 183(2):179-184.
- 237) Miyake F, Yoshikawa T, Sun H, Kakimi A, Ohashi M, Akimoto S, Nishiyama Y, Asano Y. Latent infection of human herpesvirus 7 in CD4+ T lymphocytes. *J Med Virol.* 2006; 78(1):112-6.



- 238) Chang Y, Cesarman E, Pessin MS, Lee F, Culpepper J, Knowles DM, Moore PS. Identification of herpesvirus-like DNA sequences in AIDS-associated Kaposi's sarcoma. *Science*. 1994;266:1865–1869.
- 239) Edelman DC. Human herpesvirus 8 – A novel human pathogen *Virology*. 2005; 2: 78.
- 240) Davis DA, Humphrey E, Busch M *et al*. Detection of serum antibodies to Kaposi's sarcoma - associated herpesvirus - specific peptide. *J Infect Dis*. 1997; 175(5):1071-9.
- 241) Danise A, Cinque P, Vergani S, Candino M, Racca S *et al*. Use of polymerase Chain reaction Assays of Aqueous humor in the Differential Diagnosis of retinitis in patients Infected with human Immunodeficiency virus. *Clinical Infectious Diseases*. 1997; 24: 1100-1106.
- 242) Cinque P, Brytting M, Vago L, Castagna A, Parravicini C. *et al*. Epstein –Barr virus DNA in cerebrospinal Fluid from patients with Aids related primary lymphoma of the central nervous system. *Lancet*. 1993; 14, 342(8868):398-401.
- 243) Ehrnst A, Barkholt L, Lewensohn-Fuchs I, Ljungman P, Teodosiu O *et al*. CMV PCR monitoring in leukocytes of transplant patients. *Clin Diagn Virol*. 1995; 3(2):139-53.
- 244) Wang FZ, Dahl H, Linde A, Brytting M, *et al*. Lymphotropic herpesviruses in allogeneic bone marrow transplantation. *Blood*. 1996 ; 1, 88(9):3615-20.
- 245) Yalcin S, Karpuzoglu T, Suleymanlar G, Mutlu G, Mukai T *et al*. Human herpesvirus 6 and human herpesvirus 7 infections in renal transplant recipients and healthy adults in Turkey. *Arch Virol*. 1994;136(1-2):183-90.
- 246) Disponível em: (Genbank: [www.ncbi.nih.gov](http://www.ncbi.nih.gov)) [Acesso em 15 abril 13].
- 247) Altman DG. Categorising continuous variables. *Br J Cancer*. 1991; 64(5): 975.
- 248) Kleinschmidt-DeMasters BK, Gilden DH. The expanding spectrum of Herpesvirus infections of the nervous system. *Brain Pathol*. 2001; 11(4):440-51.

- 249) Sköldenberg B, Aurelius E, Hjalmarsson A, Sabri F, Forsgren M, Andersson B, Linde A, Strannegård O, Studahl M, Hagberg L, Rosengren L. Incidence and pathogenesis of clinical relapse after herpes simplex encephalitis in adults. *J Neurol*. 2006; 253(2):163-70.
- 250) Tan KM, Lennon VA, Klein CJ et al. Clinical spectrum of voltage-gated potassium channel autoimmunity. *Neurology*. 2008; 13, 70(20):1883-90.
- 251) Steiner I, Budka H, Chaudhuri A. Et al. Viral meningoencephalitis: a review of diagnostic methods and guidelines for management. *Eur J Neurol*. 2010; 17(8):999-e57.
- 252) Jeffery KJ, Read SJ, Peto TE, Mayon-White RT, Bangham CR. Diagnosis of viral infections of the central nervous system: clinical interpretation of PCR results. *Lancet*. 1997; 349(9048):313-7.
- 253) Schovoerer E, Frechin V, Fritsch S, Freitag R, Fuchs A, Gutt JP, Stoll-Keller F. Atypical symptoms in patients with herpesvirus DNA detected by PCR in cerebrospinal fluid. *J Clin Virol*. 2006; 35(4):458-62.
- 254) Gaeta A, Verzaro S, Cristina LM, Mancini C, Nazzari C. Diagnosis of neurological herpesvirus infections: real time PCR in cerebral spinal fluid analysis. *New Microbiol*. 2009;32(4):333-40.
- 255) Weber T, Frye S, Bodemer M, Otto M, Luke W. Clinical implications of nucleic acid amplification methods for the diagnosis of viral infections of the nervous system. *J Neurovirol*. 1996; 2(3):175-90.
- 256) Davis LE, Tyler KL. Molecular diagnosis of CNS viral infections. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2005;76(1):10.
- 257) Bastos MS, Lessa N, Naveca FG, Monte RL, Braga WS, Figueiredo LT, Ramasawmy R, Mourão MP. Detection of Herpesvirus, Enterovirus, and Arbovirus infection in patients with suspected central nervous system viral infection in the Western Brazilian Amazon. *J Med Virol*. 2014; 86(9):1522-7.
- 258) Kupila L, Vuorinen T, Vainionpää R, Hukkanen V, Marttila RJ, Kotilainen P. Etiology of aseptic meningitis and encephalitis in an adult population. *Neurology*. 2006; 10 (1):75-80.

- 259) Więdoła M, Marcinowicz P, Stańczykiewicz B. Psychiatric Aspects of Herpes Simplex Encephalitis, Tick-Borne Encephalitis and Herpes Zoster Encephalitis Among Immunocompetent Patients. *Adv Clin Exp Med*. 2015;24(2):361-371.
- 260) Cinque P, Bossolasco S, Lundkvist A. Molecular analysis of cerebrospinal fluid in viral diseases of the central nervous system. *J Clin Virol*. 2003;26(1):1-28.
- 261) Theil D, Horn AK, Derfuss T, Strupp M, Arbusow V, Brandt T. Prevalence and distribution of HSV-1, VZV, and HHV-6 in human cranial nerve nuclei III, IV, VI, VII, and XII. *J Med Virol*. 2004;74(1):102-6.
- 262) Gallo MF, Warner L, Macaluso M, Stone KM, Brill I, Fleenor ME, et al. Risk factors for incident herpes simplex type 2 virus infection among women attending a sexually transmitted disease clinic. *Sex Transm Dis*. 2008 ;35(7):679-85.
- 263) Cassinotti P, Siegl G. A nested-PCR assay for the simultaneous amplification of HSV-1, HSV-2, and HCMV genomes in patients with presumed herpetic CNS infections. *J Virol Methods*. 1998;71(1):105-14.
- 264) Wada K, Kubota N, Ito Y, Yagasaki H, Kato K, Yoshikawa T, Ono Y, et al. Simultaneous quantification of Epstein-Barr virus, cytomegalovirus, and human herpesvirus 6 DNA in samples from transplant recipients by multiplex real-time PCR assay. *J Clin Microbiol*. 2007; 45(5):1426-32.
- 265) Landergren M, Kyllerman M, Bergstrom T, Dotevall L, Ljungstrom L, Ricksten A. Diagnosis of Epstein-Barr virus induced central nervous system infections by DNA amplification from cerebrospinal fluid. *Ann Neurol*. 1994; 35, 631-635.
- 266) Studahl M, Ricksten A, Sandberg T, Elowson S, Herner S, Säll C, Bergström T. Cytomegalovirus infection of the CNS in non-compromised patients. *Acta Neurol Scand*. 1994;89(6):451-7.
- 267) Thoren A, Widell A. PCR for the diagnosis of enteroviral meningitis. *Scand J Infect Dis*. 1994;26(3):249-54.
- 268) Martelius T, Lappalainen M, Palomäki M, Anttila VJ. Clinical characteristics of patients with Epstein Barr virus in cerebrospinal fluid. *BMC Infect Dis*. 2011; 21, 11:281.

269) Evans AS, Niederman JC. Epidemiology of infectious mononucleosis: a review. In: Biggs, P. M. *et al.*, eds. Oncogenesis and herpes virus. 1972; Lyon, IARC, 351-6.

270) Ellenby MS, Tegtmeyer K, Lai S, Braner D, Lumbar Puncture. *N Engl J Med* 2006; 355:12.

271) Sempere AP, Berenguer-Ruiz L, Lezcano-Rodas M, Mira-Berenguer F, Waez M. A punção lombar: suas indicações, contra-indicações, complicações e técnica. *Rev Neurol* 2007 outubro 01-15; 45 (7): 433-6.

272) Schmutzhard E. Viral infections of the CNS with special emphasis on herpes simplex infections. *J Neurol*. 2001; 248(6):469-77.

273) Arribas JR, Pulido F, González-García JJ, Miró JM. Antiretroviral treatment in patient with advanced immunosuppression. *Med Clin (Barc)*. 2006; 126 (4):157-8.

274) Boivin G, Goyette N, Gilbert C, Humar A, Covington E. Clinical impact of ganciclovir-resistant cytomegalovirus infections in solid organ transplant patients. *Transpl Infect Dis*. 2005; 7(3-4):166-70.

275) Prösch S, Schielke E, Reip A, Meisel H, Volk HD, Einhäupl KM, Krüger DH. Human cytomegalovirus (HCMV) encephalitis in an immunocompetent young person and diagnostic reliability of HCMV DNA PCR using cerebrospinal fluid of nonimmunosuppressed patients. *J Clin Microbiol*. 1998;36(12):3636-40.

276) Schäfer P, Tenschert W, Cremaschi L, Schröter M, Gutensohn K, Laufs R. Cytomegalovirus cultured from different major leukocyte subpopulations: association with clinical features in CMV immunoglobulin G-positive renal allograft recipients. *J Med Virol*. 2000;61(4):488-96.

277) Seehusen DA, Reeves MM, Fomin DA. Cerebrospinal fluid analysis. *Am Fam Physician*. 2003 Sep 15; 68(6):1103-8.

278) Studahl M, Hagberg L, Rekabdar E, Bergström T. Herpesvirus DNA detection in cerebral spinal fluid: differences in clinical presentation between alpha-, beta-, and gamma-herpesviruses. *Scand J Infect Dis*. 2000; 32(3):237-48.

279) Davies NW , Brown LJ , Gonde J , Irish D , Robinson RO. et al. Fatores que influenciam a detecção de DNA de vírus no líquido cefalorraquidiano de pacientes com suspeita de infecção do sistema nervoso central. J Neurol Neurosurg Psychiatry. 2005; 76 (1): 82-7.

280) Sghaier W, Bahri O, Kedous E, Fazaa O, Rezig D, Touzi H, Ben Yahia A, Meddeb Z, Triki H. Retrospective study of viral causes of central nervous system infections in Tunisia (2003-2009). Med Sante Trop. 2012; 22(4):373-8.

281) Kaji M, Shoji H. Detection of Epstein-Barr virus genome in peripheral leucocytes and CSF by the polymerase chain reaction in two patients with Epstein-Barr virus related to aseptic meningitis. J Neurol Neurosurg Psychiatry. 1995; 59(1):99.

282) Studahl M, Bergström T, Hagberg L. Acute viral encephalitis in adults-a prospective study. Scand J Infect Dis. 1998; 30 (3):215-20.

283) Studahl M, Petzold M , Cassel T. Disease burden of herpes zoster in Sweden - predominance in the elderly and in women - a register based study. BMC Infect Dis. 2013 Dec 12;13:586.

284) Portolani M, Leoni S, Guerra A, Cermelli C, Mantovani G, Pietrosemoli P, Meacci M, Sabbatini AM, Pecorari M. Human herpesvirus-7 DNA in cerebrospinal FLuid. Minerva Pediatr. 1998; 50(1-2):39-44.

285) Studahl M, Hagberg L, Rekabdar E, Bergström T. Hematogenously spread herpesvirus are detected as frequently as neuronally spread herpesviruses in cerebrospinal fluid by polymerase chain reaction assay. Clin Infect Dis. 1999; 29: 216-7.

286) Weinberg A, Bloch K, Li S, Tang YW. et al. Dual Infections of the Central Nervous System with Epstein-Barr Virus. J Infect Dis. 2005; 15,191(2):234-7.

287) Kleines M, Scheifer J, Steienen A et al. Expanding the spectrum of neurological disease associated with Epstein-Barr virus activity. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2011; 30(12):1561-9.

288) Aberle SW, Puchhammer-Stöckl E. Diagnosis of herpesvirus infections of the central nervous system. *J Clin Virol.* 2002; 25(1):79-85.

289) Doja A, Bitnun EL, Jones F, Richardson S, Tellier R, Petric M. Pediatric Epstein-Barr virus-associated encephalitis: 10-year. Review *J Child Neurol.* 2006; 21: 384–391.

290) Benjamin LA, Kelly M, Cohen D, Neuhaan F, Galbraith S, Mallewa M, Hopkins M, Hart IJ, Guiver M, Lalloo DG, Heyderman RS, Solomon T. Detection of herpes viruses in the cerebrospinal fluid of adults with suspected viral meningitis in Malawi. *Infection.* 2013;41(1):27-31.

291) Juhl D, Mosel C, Nawroth F, Funke AM, Dadgar SM, Hagenstrom H, Kirchner H, Henning H. Detection of herpes simplex virus DNA in plasma of patients with primary but not with recurrent infection: implications for transfusion medicine? *Transfus Med.* 2010; 20, (1) 38-47.

292) Tanaka-Taya K, Sashihara J, Kurahashi H, Amo K, Miyagawa H et al. Human herpesvirus 6 (HHV-6) is transmitted from parent to child in an integrated form and characterization of cases with chromosomally integrated HHV-6 DNA. *Journal of Medical Virology.* 2004; 73, (3):465–473.

293) Clark DA, Nacheva EP, Leong HN. et al. Transmission of integrated human herpesvirus 6 through stem cell transplantation: implications for laboratory diagnosis. *J Infect Dis.* 2006; 193(7):912-6.

294) Leong HN, Tuke PW, Tedder RS, Khanom AB, Eglin RP, et al. The prevalence of chromosomally integrated human herpesvirus 6 genomes in the blood of UK blood donors. *J Med Virol.* 2007; 79(1):45-51.

295) Ward KN, Leong HN, Thiruchelvam AD, Atkinson CE, Clark DA. Human herpesvirus 6 DNA levels in cerebrospinal fluid due to primary infection differ from those due to chromosomal viral integration and have implications for diagnosis of encephalitis. *Journal of Clinical Microbiology.* 2007; 45(4): 1298–1304.

296) Denes E, Magy L, Pradeau K, Alain S, Weinbreck P, Ranger-Roguez S. Successful treatment of human herpesvirus 6 encephalomyelitis in an immunocompetent patient. *Emerg Infect Dis.* 2004;10(4):729-31.

- 297) Isaacson E., Glaser C., Forghani B., Amad Z., Wallace M., Armstrong R., et al. Evidence of human herpesvirus 6 infection in 4 immunocompetent patients with encephalitis. *Clin Infect Dis.* 2005; 15, 40(6):890-3.
- 298) Sawada J, Nakatani-Enomoto S, Aizawa H, Katayama T, Ito T, Aburakawa Y, et al. An adult case of relapsing human herpesvirus-6 encephalitis. *Intern Med.* 2007; 46 (18): 1617–1620.
- 299) Crawford JR, Santi MR, Thorarinsdottir HK, Cornelison R, Rushing EJ, Zhang H, Yao K, Jacobson S, Macdonald TJ. Detection of human herpesvirus-6 variants in pediatric brain tumors: association of viral antigen in low grade gliomas. *J Clin Virol.* 2009 Sep;46(1):37-42.
- 300) Ljungman P, Singh N. Human herpesvirus-6 infection in solid organ and stem cell transplant recipients. *J Clin Virol.* 2006 ;37 Suppl 1:S87-91.
- 301) Kimberlin D. Neuroinvasion of Human Herpesviruses 6 and 7. *Herpes*, 1999; 6, 60-63.
- 302) Montoya JG, Neely MN, Gupta S, Lunn MR, Loomis KS, Pritchett JC, Polsky B, Medveczky PG. Antiviral therapy of two patients with chromosomally-integrated human herpesvirus-6A presenting with cognitive dysfunction. *J Clin Virol.* 2012;55(1):40-5.
- 303) Gildea DH. Acute viral central nervous system diseases. *ACP Medicine.* 2008; 1-13.
- 304) Gosselin J, Flamand L, D'Addario M, Hiscott J, Stefanescu I, Ablashi DV, Gallo RC, Menezes J. Modulatory effects of Epstein-Barr, herpes simplex, and human herpes-6 viral infections and coinfections on cytokine synthesis. A comparative study. *J Immunol.* 1992; 149(1):181-7.
- 305) Kanangat S, Thomas J, Gangappa S, Babu JS, Rouse BT. Herpes simplex virus type 1-mediated up-regulation of IL-12 (p40) mRNA expression. Implications in immunopathogenesis and protection. *J Immunol.* 1996; 1, 156 (3):1110-6.
- 306) Tang YW, Espy MJ, Persing DH, Smith TF. Molecular Evidence and Clinical Significance of Herpesvirus Coinfection in the Central Nervous System. *J. of Clinical Microbiology.* 1997; 35: (11) 2869-2872.

- 307) Kupila L, Vuorinen T, Vainionpää R, Hukkanen V, Marttila RJ, Kotilainen P. Etiology of aseptic meningitis and encephalitis in an adult population. *Neurology*. 2006; 10, 66(1):75-80.
- 308) Berrington WR, Jerome KR, Cook L, Wald A, Corey L, Casper C. Clinical correlates of herpes simplex virus viremia among hospitalized adults. *Clin Infect Dis*. 2009; 49:1295–1301.
- 309) Enbom M. Multiple sclerosis and Kaposi's sarcoma--chronic diseases associated with new human herpesviruses? *Scand J Infect Dis*. 2001;33(9):648-58.
- 310) Ory de F, Avellón A, Echevarría JE, Sánchez-Seco MP, Trallero G, Cabrerizo M, Casas I. et al. Viral infections of the central nervous system in Spain: a prospective study. *J Med Virol*. 2013; 85(3):554-62.
- 311) Steiner I. Herpes simplex virus encephalitis: new infection or reactivation? *Curr Opin Neurol*. 2011;24(3):268-74.
- 312) Sköldenberg B, Forsgren M, Alestig K, Bergström T, Burman L, Dahlqvist E, Forkman A, Frydén A, Lövgren K, Norlin K, et al. Acyclovir versus vidarabine in herpes simplex encephalitis. Randomised multicentre study in consecutive Swedish patients. *Lancet*. 1984; 29;2(8405):707-11.
- 313) Whitley RJ. Herpes simplex virus. In: Scheld WM, Whitley RJ, Durack DT. (Eds). *Infections of the central nervous system*. Lippincott-Raven. Philadelphia. 1997: 73-89.
- 314) Liedtke W, Opalka B, Zimmermann CW, Lignitz E. Age distribution of latent herpes simplex virus 1 and varicella-zoster virus genome in human nervous tissue. *J Neurol Sci*. 1993;116:6–11.
- 315) Alexander RC, Cabirac G, Lowenkopf T, et al. Search for evidence of herpes simplex virus, type 1, or varicella-zoster virus infection in postmortem brain tissue from schizophrenic patients. *Acta Psychiatr Scand*. 1992;86:418–420.
- 316) Vinters HV, Wang R, Wiley CA. Herpesviruses in chronic encephalitis associated with intractable childhood epilepsy. *Hum Pathol*. 1993;24:871–879.



- 317) Lin WR, Casas I, Wilcock GK, Itzhaki RF. Neurotropic viruses and Alzheimer's disease: a search for varicella zoster virus DNA by the polymerase chain reaction. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 1997;62:586–589.
- 318) Sanders VJ, Felisan S, Waddell A, Tourtellotte WW. Detection of herpesviridae in postmortem multiple sclerosis brain tissue and controls by polymerase chain reaction. *J Neurovirol*. 1996;2:249–258.
- 319) Nordborg C, Nordborg E, Petursdottir V, et al. Search for varicella zoster virus in giant cell arteritis. *Ann Neurol*. 1998;44:413–414.
- 320) Weidenheim KM, Bodhireddy SR, Nuovo GJ, Nelson SJ, Dickson DW. Multicystic encephalopathy: review of eight cases with etiologic considerations. *J Neuropathol Exp Neurol*. 1995;54:268–275.
- 321) Gildeen HD. Varicella zoster virus and central nervous system syndromes. *Herpes*. 2004; 11( 2):89A-94A.
- 322) Centifanto-Fitzgerald YM, Varnell ED, Kaufman HE. Initial herpes simplex virus type 1 infection prevents ganglionic superinfection by other strains. *Infect Immun*. 1982; 35(3):1125-32.
- 323) Javier RT, Thompson RL, Stevens JG. Genetic and biological analyses of a herpes simplex virus intertypic recombinant reduced specifically for neurovirulence. *J Virol*. 1987 .61; (6):1978-84.
- 324) Chou SW, Scott KM. Rises in antibody to human herpesvirus 6 detected by enzyme immunoassay in transplant recipients with primary cytomegalovirus infection. *J Clin Microbiol*. 1990; 28(5): 851-4.
- 325) Corey L, Benedetti J, Critchlow C, Mertz G, Douglas J, Fife K, Fahnländer A, Remington ML, Winter C, Dragavon J. Treatment of primary first-episode genital herpes simplex virus infections with acyclovir: results of topical, intravenous and oral therapy. *J Antimicrob Chemother*. 1983 ;12 ,Suppl B:79-88.
- 326) Cohen JI. VZV: molecular basis of persistence (latency and reactivation). In: Arvin A, Campadelli-Fiume G, Mocarski E, Moore PS, Roizman B, Whitley R, Yamanishi K, editors. *Human Herpesviruses: Biology, Therapy, and Immunoprophylaxis*. Cambridge: Cambridge University Press; 2007. Chapter 38.

- 337) Van der Maas NA, Bondt PE, de Melker H, Kemmeren JM. Acute cerebellar ataxia in the Netherlands: a study on the association with vaccinations and varicella zoster infection. *Vaccine*. 2009; 18, 27(13):1970-3.
- 338) Roizman B, D Knipe, vírus Herpes simplex R. Whitley. In: Knipe D, Howley P, Griffin DE, Cordeiro RA, Martin MA, Roizman B, Straus SE, editores. *Fields Virology*. 2007; New York: Lippincott Williams e Wilkins. 2501-2601.
- 339) Puchhammer-Stöckl E, Presterl E, Croÿ C, Aberle S, Popow-Kraupp T et al. Screening for possible failure of herpes simplex virus PCR in cerebrospinal fluid for the diagnosis of herpes simplex encephalitis. *J. Med. Virol*; 2001, 64, (4), 531–536.
- 340) Hjalmarsson A, Blomqvist P, Skoldenberg B. Herpes simplex encephalitis in Sweden, 1990–2001: incidence, morbidity, and mortality. *Clin Infect Dis*. 2007; 45 (7):875–880.
- 341) Persson A, Bergström T, Lindh M, Namvar L, Studahl M. Varicella-zoster virus CNS disease – viral load, clinical manifestations and sequels. *J Clin Virol*; 2009, 46: 249–253.
- 342) Barker KR, Sarafino-Wani R, Khanom A, Griffiths PD, Jacobs MG, Webster DP. Encephalitis in an immunocompetent man. *J Clin Virol*. 2014; 59(1):1-3.



**Universidade Estadual de Campinas**

Departamento de Clínica Médica

Laboratório de Diagnóstico de Doenças Infecciosas por

Técnicas de Biologia Molecular e Antigenemia

**REGULAMENTO DO LABORATÓRIO DE DIAGNÓSTICO DE DOENÇAS INFECCIOSAS POR TÉCNICAS DE BIOLOGIA MOLECULAR E ANTIGENEMIA, FCM-UNICAMP QUANTO AO ARMAZENAMENTO E UTILIZAÇÃO DE MATERIAL BIOLÓGICO HUMANO**

Orientados pela Resolução N° 347 do Conselho Nacional de Saúde determinamos que o armazenamento e utilização de material biológico humano para pesquisa no laboratório de Diagnóstico de Doenças Infecciosas por Técnicas de Biologia Molecular e Antigenemia da FCM-UNICAMP somente será permitido de acordo com as regras abaixo:

1. Deverão ser apresentadas ao CEP local as justificativas quanto à necessidade e oportunidade para usos futuros do material biológico humano em questão.
2. Será obtido consentimento dos sujeitos de pesquisa, doadores do material biológico, autorizando a guarda do referido material.
3. Será incluída uma declaração esclarecendo que “TODA NOVA PESQUISA A SER FEITA COM O MATERIAL SERÁ SUBMETIDA À APROVAÇÃO DESTE CEP, E SE CABÍVEL, TAMBÉM DA CONEP”.
4. Seguiremos as seguintes normas para armazenagem do material biológico em questão:

- a. As amostras serão armazenadas em equipamentos de congelação (freezers -20° C e/ou -80° C) específicos e utilizados somente para este fim. As amostras serão codificadas apenas por números e a chave de ligação entre números e nomes de pacientes será armazenada em programa de computador protegido por senha. Somente 2 pessoas terão acesso a esta chave de código (pela posse da senha) a **Profa. Dra. Sandra Cecília Botelho Costa**, (matrícula UNICAMP 05.617-1), Docente do Departamento de Clínica Médica, FCM-UNICAMP e a responsável pelos projetos desenvolvidos no laboratório, a bióloga **Dra. Sandra Helena Alves Bonon** (matrícula UNICAMP 22.976-8), bióloga do laboratório.
- b. A guarda e a autorização do uso do referido material estará sob a responsabilidade exclusiva das pessoas acima citadas.
- c. Serão assegurados a todos os sujeitos de pesquisa, doadores do material, a garantia de que os resultados obtidos que sejam de seu interesse lhes seja comunicada (e/ou ao médico responsável por seu tratamento, quando for o caso). Para tanto, informações sobre endereço para contato e telefone serão armazenadas num programa de computador protegido por senha, e utilizado como descrito no **item a** acima.
- d. Serão assegurados a todos os sujeitos de pesquisa, doadores do material, a garantia de que consentimento específico para uso em novo projeto de pesquisa desenvolvido no futuro com o material.

Regulamento em vigor a partir de 25/04/2006

***Profa. Dra. Sandra Cecília Botelho Costa***

Responsável pelo Laboratório de Diagnóstico de Doenças Infecciosas por  
Técnicas de Biologia Molecular e Antigenemia - FCM-UNICAMP

## *Anexo 2*

### **TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)**

Eu, \_\_\_\_\_

nº de identidade: \_\_\_\_\_, paciente/responsável (grau de parentesco: \_\_\_\_\_), aceito colaborar com o estudo **“DETECÇÃO DE**

**HERPESVÍRUS HUMANOS EM SISTEMA NERVOSO CENTRAL PELA REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE”** que será realizado na Faculdade de

Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas, para pesquisa da infecção ativa e coinfeção pelo herpesvírus humanos, utilizando uma técnica rápida e precoce: a N-PCR. Para isso, sei que colherão amostras de sangue e líquido cefalorraquidiano **(4,0 mL de sangue em tubo contendo EDTA como anticoagulante e 1,0 mL de líquido cefalorraquidiano em frasco estéril)**. Estou

ciente de que poderei desistir da participação deste estudo a qualquer momento, e que isto nada irá prejudicar o tratamento, além de que esta colaboração em muito auxiliará o tratamento dos pacientes que apresentam complicações no sistema nervoso central. Estou ciente de que todos os dados colhidos através de informações clínicas obtidas dos prontuários médicos serão sigilosos, e que o nome do colaborador não será utilizado em qualquer tipo de publicação. Após o estudo, as amostras coletadas serão descartadas, e caso (quando se fizer necessário) sejam utilizadas em outro trabalho, o mesmo será submetido ao Comitê de Ética desta instituição.

Declaro ainda que fui orientado claramente que o exame de líquido é um importante método auxiliar diagnóstico dos processos neurológicos, infecciosos ou neoplásicos do sistema nervoso. O exame consiste em punção com agulha descartável para coleta e análise do líquido. A dor que acompanha a punção é semelhante àquela da coleta de sangue. Para este exame é comum a coleta em região dorsal (punção lombar) ou, excepcionalmente, em região cervical (punção suboccipital), dependendo da suspeita clínica e da indicação médica. Após a

punção lombar, se tiver alta, posso ir para casa depois de cerca de 30 minutos e, imediatamente a seguir, deverei permanecer em REPOUSO (no mínimo por 4 horas). Mesmo com este cuidado, aproximadamente 10% dos indivíduos poderão sentir dor de cabeça ao se levantar. Esta dor pode ser forte, mas apresenta rápida melhora ao deitar. Se eu tiver dor de cabeça, deverei ficar em REPOUSO ABSOLUTO POR 48 HORAS SEGUIDAS, e entrar em contato com o laboratório responsável pelo exame o mais rápido possível para me orientar sobre como proceder. Em casos raros, a dor de cabeça pode durar de 4 a 7 dias, impossibilitando a realização das minhas atividades habituais, pessoais e profissionais. Nas coletas por punção suboccipital eu poderei voltar às minhas atividades normais, porém poderei sentir dor de cabeça ou desconforto passageiro. A coleta de líquido como toda técnica invasiva, apresenta riscos inerentes ao próprio procedimento. Acidentes derivados da punção, com danos neurológicos, são raros e descritos apenas na punção suboccipital, podendo ocorrer, por exemplo, lesão de centro respiratório, cardíaco e hemorragia no espaço subaracnóide. Na punção lombar podem ocorrer dormências transitórias, dor local e, muito raramente, infecção. A incidência destas complicações é muito pequena.

Autorizo o Dr. (a) \_\_\_\_\_  
a realizar a coleta de líquido cefalorraquidiano.

Campinas, \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_.

---

### **Assinatura**

Pesquisador (a) responsável: Carla Aparecida Tavares Rimério  
Laboratório de Vírus – Ramal: 17734

Orientador (a): Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Sandra Helena Alves Bonon  
E-mail: sbonon@unicamp.br  
Laboratório de Vírus – Ramal: 17734

Coorientadoras: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Sandra Cecília Botelho Costa (costa@fcm.unicamp.br) e  
Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Anamarli Nucci (anucci@hc.unicamp.br)

Comitê de Ética em Pesquisa – (19) 3521-8936

**DEVE SER PREENCHIDO PELO MÉDICO:**

Certifico que expliquei detalhadamente o procedimento de punção liquórica, seus benefícios, riscos, suas alternativas e as consequências da não realização. Respondi satisfatoriamente a todas as perguntas do paciente e acredito que o paciente/responsável compreendeu tudo o que expliquei.

Assumo total responsabilidade pela realização da coleta a que será submetido.

Campinas, \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_.

Nome completo \_\_\_\_\_

---

**Assinatura / CRM ou Carimbo**

# Anexo 3



CEP, 28/08/12.  
(PARECER CEP: Nº 808/2008)

FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS  
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

[www.fcm.unicamp.br/fcm/pesquisa](http://www.fcm.unicamp.br/fcm/pesquisa)

## PARECER

### I – IDENTIFICAÇÃO:

PROJETO: “DETECÇÃO DOS HERPESVIRUS HUMANOS 6 E 7 (HHV-6 E HHV-7) POR TÉCNICAS DE BIOLOGIA MOLECULAR E IMUNOHISTOQUÍMICA EM PACIENTES SUBMETIDOS À CIRURGIAS NEUROLÓGICAS POR DIVERSAS CAUSAS”.

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Carla Aparecida Tavares Rimério

### II – PARECER DO CEP.

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP tomou ciência e aprova o adendo que inclui o projeto “DETECÇÃO DE HERPESVÍRUS HUMANOS EM SISTEMA NERVOSO CENTRAL PELA REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE”, finalidade de doutorado da aluna Carla Aparecida Tavares Rimério, referente ao protocolo de pesquisa supracitado.

O conteúdo e as conclusões aqui apresentados são de responsabilidade exclusiva do CEP/FCM/UNICAMP e não representam a opinião da Universidade Estadual de Campinas nem a comprometem.

### III – DATA DA REUNIÃO.

Homologado na VIII Reunião Ordinária do CEP/FCM, em 28 de agosto de 2012.

**Prof. Dr. Carlos Eduardo Steiner**  
PRESIDENTE do COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA  
FCM / UNICAMP

---

Comitê de Ética em Pesquisa - UNICAMP  
Rua: Tessália Vieira de Camargo, 126  
Caixa Postal 6111  
13083-887 Campinas – SP

FONE (019) 3521-8936  
FAX (019) 3521-7187  
cep@fcm.unicamp.br



# Human Herpesvirus Infections of the Central Nervous System: Laboratory Diagnosis Based on DNA Detection by Nested PCR in Plasma and Cerebrospinal Fluid Samples

Carla Aparecida Tavares Rimério,<sup>1</sup> Renato Souza De Oliveira,<sup>1</sup> Murilo Queiroz de Almeida Bonatelli,<sup>1</sup> Anamarli Nucci,<sup>2</sup> Sandra Cecília Botelho Costa,<sup>1</sup> and Sandra Helena Alves Bonon<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Internal Medicine, Faculty of Medical Sciences, State University of Campinas - Unicamp, Campinas, SP, Brazil

<sup>2</sup>Department of Neurology, Faculty of Medical Sciences, State University of Campinas - Unicamp, Campinas, SP, Brazil

Infections of the central nervous systems (CNS) present a diagnostic problem for which an accurate laboratory diagnosis is essential. Invasive practices, such as cerebral biopsy, have been replaced by obtaining a polymerase chain reaction (PCR) diagnosis using cerebral spinal fluid (CSF) as a reference method. Tests on DNA extracted from plasma are noninvasive, thus avoiding all of the collateral effects and patient risks associated with CSF collection. This study aimed to determine whether plasma can replace CSF in nested PCR analysis for the detection of CNS human herpesvirus (HHV) diseases by analysing the proportion of patients whose CSF nested PCR results were positive for CNS HHV who also had the same organism identified by plasma nested PCR. In this study, CSF DNA was used as the "gold standard," and nested PCR was performed on both types of samples. Fifty-two patients with symptoms of nervous system infection were submitted to CSF and blood collection. For the eight HHV, one positive DNA result—in plasma and/or CSF nested PCR—was considered an active HHV infection, whereas the occurrence of two or more HHVs in the same sample was considered a coinfection. HHV infections were positively detected in 27/52 (51.9%) of the CSF and in 32/52 (61.5%) of the plasma, difference not significant, thus nested PCR can be performed on plasma instead of CSF. In conclusion, this findings suggest that plasma as a useful material for the diagnosis of cases where there is any difficulty to perform a CSF puncture. **J. Med. Virol.** © 2015 Wiley Periodicals, Inc.

**KEY WORDS:** herpesvirus; central nervous systems; nested PCR; plasma; CSF; diagnosis

## INTRODUCTION

Viral infections of the central nervous system (CNS) are not uncommon occurrences in clinical practice, the prevalence of these cases is not well defined. Whereas the etiology of many cases remains unknown, an increasing number of positive viral identifications have been made, particularly since the advent of molecular diagnostics. Though specific therapies are unfortunately only available for a few viruses (e.g., herpesviruses and the human immunodeficiency virus), efforts to find causative organisms remain important for the effective management and prognosis of patients. Clinical and laboratory features common to particular viral etiologies can guide clinicians in identifying potential pathogens [Big et al., 2009]. Herpesviruses may be associated with various types of CNS infections [Sauerbrei and Wutzler, 2002]. There are eight human herpesvirus: herpes simplex virus type 1 (HSV-1), herpes simplex virus type 2 (HSV-2), Varicella-Zoster virus (VZV), Epstein-Barr virus (EBV), human cytomegalovirus (HCMV), herpesvirus type 6 (HHV-6), herpesvirus type 7 (HHV-7), and herpesvirus type 8 (HHV-8) (Kaposi sarcoma [KS] herpesvirus). All herpesviruses have similar molecular structures: they contain

Declaration of interest: The authors have no commercial relationship or potential conflict of interest related to this study to declare. No funding was received for conducting the study.

\*Correspondence to: Sandra Bonon, State University of Campinas - Faculty of Medical Sciences - Laboratory of Virus/FCM - Rua Vital Brasil, 251, - Cidade Universitária "Zeferino Vaz" - CEP 13083-970-Campinas/SP, Brazil.  
E-mail: sbonon@fcm.unicamp.br

Accepted 28 November 2014

DOI 10.1002/jmv.24134

Published online in Wiley Online Library  
(wileyonlinelibrary.com).

double-stranded DNA and share similar biological characteristics, including the unique ability to establish latency and reactivation [Whitley and Gnann, 2002; Meyding-Lamadè and Strank, 2012].

Most HHV are neurotropic and a common cause for serious, acute, and chronic neurological disease of the CNS. Each HHV infection produces different clinical features and imaging abnormalities. Fortunately, however, many of them can now be treated [Gilden et al., 2007].

Neurological diseases (e.g., encephalitis, meningitis, myelitis, cerebellitis) occur either during primary infection or during the course of viral reinfection or reactivation [Meyding-Lamadè and Strank, 2012]. The most common symptoms and indications of CNS disease are fever and signs of meningeal irritation, such as headache, altered consciousness, and seizures [Shoji et al., 2002].

Because HHV often present varied and non-specific symptoms, accurate diagnosis is necessary. PCR analysis of CSF is currently considered the gold standard [Kleinschidt-DeMasters et al., 2001; Boivin, 2004; Gregoire et al., 2006; Schvoerer et al., 2006; Vrioni et al., 2007].

A PCR analysis of CSF and plasma has helped in the diagnoses of viral infections of the CNS [Calvario et al., 2002], particularly those caused by HHV, because it allows for the detection of minuscule quantities of DNA in bodily fluids and tissues. Negative PCR results have provided evidence contrary to herpesviruses as a causative agent [DeBiasi et al., 2002].

With the goal of substantially increasing the sensitivity and specificity of PCR analysis, this variant of classical PCR, termed nested PCR, is used to analyze samples in which very few viral particles are presumed to be present, such as in CSF and plasma [Mitchell et al., 1999].

In this study, HHV infections of the CNS were examined in CSF. Additionally, the efficiency of laboratory diagnostic methods based on the HHV-DNA detection using nested PCR of plasma was evaluated.

## MATERIALS AND METHODS

### Patients and Samples of Plasma and CSF

This prospective study was approved by the Institutional Ethics Committee of our Institution and included 52 patients aged from 1 day to 74 years with suspected CNS disorders who attended in the emergency room at Unicamp Teaching Hospital, between January 2008 and April 2012. Both a plasma and a CSF sample were obtained from each individual and 832 nested PCR tests were performed (52 CSF  $\times$  8 HHV plus 52 plasma  $\times$  8 HHV).

The following isolated or combined symptoms were considered for the hypothesis of nervous system infection: fever, headache, abdominal pain, seizure,

alteration in behavior, low levels of consciousness, mental confusion, motor alteration, neuropathy, paresthesia, drowsiness, vomiting, weakness, weight loss, myoclonia, memory loss, altered vision, and psychomotor impairment.

Patients underwent blood collection for routine exams and CSF by lumbar puncture for cytological, biochemical, and microbiology examination during the acute phase of their neurological symptoms. Immunosuppressed patients and those with confirmed fungal and bacterial infections of the CNS were excluded from the study. Plasma and CSF were also sent to the Virus Laboratory of the Faculty of Medical Sciences, State University of Campinas. DNA was extracted using commercial kits. Nested PCR was used to detect active HHV infections in both plasma and CSF DNA.

In the patients' samples studied, the criteria for defining the presence of active HHV infection was a positive nested PCR result for one of the eight HHV in plasma and or the CSF. Two or more positive subtypes of HHV-DNA results in the same sample either CSF or plasma were considered a coinfection.

### Statistical Methods

The data were analyzed using descriptive statistics (median and range for continuous variables and percentages for categorical variables). Sensitivity, specificity, and positive and negative predictive values were obtained as previously described [Altman, 1991]. Data for studying the concordance between the tests were analyzed using the McNemar test. A *P*-value of  $\geq 0.05$  indicated concordance between tests. All statistical analyses were performed using SPSS 16.0 software.

**CSF and plasma DNA extraction.** DNA was extracted from 200  $\mu$ L of CSF using a QIAamp DNA Blood Mini Kit (Cologne, Germany). The resulting DNA pellet was eluted in 20  $\mu$ L of TE-buffer. Plasma DNA extraction was performed using the same procedure.

### Nested Polymerase Chain Reaction (Nested PCR)

A primer set for the conserved regions of HSV-1, HSV-2, VZV, EBV, HCMV, HHV-6 (regions A and B), HHV-7, and HHV-8 DNA was used. HHV-DNA in plasma and CSF samples were detected using the nested PCR technique. The primers used were: for HSV-1, HSV-2, VZV [Danise et al., 1997]; for EBV [Cinque et al., 1993]; for HCMV [Ehrnst et al., 1995]; for HHV-6 [Wang et al., 1996]; for HHV-7 [Yalcin et al., 1994] and for HHV-8 [Chan et al., 2000]. The sizes of the nested PCR amplification products were 138, 101, 266, 209, 167, 195 (HHV-6 type A), 423 (HHV-6 type B), 264, and 213 base pairs, respectively. The same protocol was used to amplify the human  $\beta$ -globin gene sequence to ensure the quality



TABLE I. Patient Characteristics, Neurological Hypothesis, Positive and Negative HHV Infections Detected by CSF Nested PCR

Characteristics		(n = 52)		
Age, median years (range)		23.0 (0.1–74.4 years old)		
Sex, male/female (%/%)		25/27 (48/52)		
Initial clinical hypothesis	n (%)	Positive mono-infection	Positive coinfection	Negative infection
Encephalitis	22 (42.3)	4	11	7
Encephalopathy	13 (25)	2	2	9
Meningitis	3 (5.8)	—	1	2
Meningoencephalitis	3 (5.8)	1	1	1
Seizure	2 (3.8)	—	—	2
Lumbosacral plexopathy	1 (1.9)	1	—	—
Facial paralysis	1 (1.9)	—	1	—
Cerebellar syndrome	1 (1.9)	1	—	—
Mononeuritis	1 (1.9)	—	—	1
Polyneuropathy	1 (1.9)	—	—	1
Multiple sclerosis	1 (1.9)	1	—	—
Paresthesia	1 (1.9)	—	—	1
Myelitis	1 (1.9)	—	1	—
Polyradiculoneuropathy	1 (1.9)	—	—	1
TOTAL	52 (100)	10 (19.2)	17 (32.7)	25 (48.1)

of the extracted DNA and to confirm the absence of inhibitors in plasma and CSF. To avoid contamination, the following precautions were standardized: screw-cap tubes were used for all sample preparations and reaction mixtures. Each step of the experimental procedure (i.e., reaction mixture preparation, DNA extraction, PCR amplification, and analysis of PCR products) was performed in a separate room. Disposable filter tips were used for each sample and changed for each step of the experimental procedure. To exclude carryover contamination, at least two negative controls, including one with no DNA template were processed along with the actual samples in each PCR assay. All fragments amplified by nested PCR were subsequently sequenced, and the sequence was confirmed.

## RESULTS

Patient characteristics, neurological hypothesis, positive and negative HHV infections detected by CSF nested PCR are shown in Table I.

Laboratory findings obtained from all tests in CSF and plasma were as follows: 59/832 (7%) tests were positive and 773/832 (93%) tests were negative for all eight HHV DNA. In relation to CSF tests, 27/416 (6.5%) were positive and 32/416 (7.7%) of the plasma tests were positive, as shown in Table II.

TABLE II. Laboratory Findings in CSF and Plasma in Relation to the Numbers of Tests Performed

	Positives	Negatives	Total
Plasma	32 (7.7%)	384 (92.3%)	416
CSF	27 (6.5%)	389 (93.5%)	416
Total	59 (7%)	773 (93%)	832

Among the positive tests, the frequency of virus found in CSF samples was 55.6% for HCMV, 44.4% for EBV, 37% for HHV-6, 33.3% for HHV-7, 18.5% for HSV-1, 11.1% for VZV, and 7.4% for HSV-2.

## Correlation Between Nested PCR Tests of CSF and Plasma

DNA samples extracted from the CSF of neurological patients were positive in 27/52 (51.9%) for HHV infection using nested PCR. Unique HHV-DNA strand was detected in 10/27 (37%) samples. Detection of two or more HHV-DNA occurred in 17/27 (63%). In PCR analysis from plasma, the prevalence of only one HHV subtype was 13/32 (40.7%), whereas the prevalence of two or more HHV subtypes was 19/32 (59.3%). Table III and Table IV show virus identified in the CSF and plasma samples, respectively.

The sensitivity and specificity values obtained from the results of nested PCR assay in plasma, using CSF as the gold standard reference. The sensitivity was low for HSV-1 and EBV, whereas the positive predictive value (PPV) was low for HSV-1 and HSV-2. False positive values from the nested PCR for HCMV occurred in five of the 52 samples (9.6%) that were taken from negative CSF results (Table V).

The nested PCR tests performed on plasma were found to be in concordance with those performed on CSF for HHV-2 ( $P \geq 0.063$ ), HCMV ( $P \geq 0.754$ ), and HHV-6 ( $P \geq 0.508$ ); however, HHV-2 positive cases had low PPV.

Only one patient among 27/52 (51.9%), EBV, and HCMV positive in CSF died after respiratory insufficiency and sepsis despite the diagnosis of viral encephalitis and treatment with acyclovir. Four patients in a total of 25/52 (48%) who were negative for

TABLE III. HHV-DNA Positive in CSF From Patients with Neurological Hypothesis (27/52)

Neurological hypothesis	n	%	Number of positive nested PCR tests												
			Singular infection						Plural infection						
			HSV1 alone	HSV2 alone	VZV alone	EBV alone	EBV+HCMV	EBV+HCMV+HHV6	EBV+HCMV+HHV7	EBV+HCMV+HHV6+HHV7	EBV+HCMV+HHV6+HHV7	EBV+HCMV+HHV6+HHV7	EBV+HCMV+HHV6+HHV7	EBV+HCMV+HHV6+HHV7	EBV+HCMV+HHV6+HHV7
Positive CSF samples (n = 27)	27/52	51.9	2	2	1	2	2	2	1	1	1	1	2	2	2
Encephalitis	15/22	68.2	2	-	-	2	1	2	1	1	1	-	2	1	-
Encephalopathy	4/13	31	-	1	-	1	-	-	-	-	-	-	-	1	-
Meningitis	1/3	33.3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
Meningoencephalitis	2/3	66.6	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
Lumbosacral plexopathy	1/1	100	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Multiple sclerosis	1/1	100	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Facial paralysis	1/1	100	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-
Cerebellar syndrome	1/1	100	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Myelitis	1/1	100	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-

Singular HHV = 10

Plural Infection = 17

TABLE IV. HHV- Positive in Plasma from Patients with Neurological Hypothesis (32/52 patients)

Neurological hypothesis	n	%	Number of positive Nested PCR test												
			Singular infection						Plural infection						
			HSV1 alone	HSV2 alone	HCMV alone	HHV6 alone	HHV7 alone	HHV6+HHV7	EBV+HCMV	EBV+HCMV+HHV6	EBV+HCMV+HHV7	EBV+HCMV+HHV6+HHV7	EBV+HCMV+HHV6+HHV7	EBV+HCMV+HHV6+HHV7	EBV+HCMV+HHV6+HHV7
Positive plasma samples (n = 32)	32/52	61.5	3	1	6	2	2	1	1	1	2	1	1	3	1
Encephalitis	14/22	63.6	1	-	4	2	-	-	-	-	2	-	1	1	1
Encephalopathy	6/13	46.1	-	1	1	-	-	-	1	-	-	-	-	1	-
Meningitis	3/3	100	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-
Meningoencephalitis	2/3	66.6	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Epilepsy	1/2	50	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Lumbosacral plexopathy	1/1	100	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Multiple Sclerosis	1/1	100	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Facial Paralysis	1/1	100	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Cerebellar Syndrome	1/1	100	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-
Myelitis	1/1	100	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Paresthesia	1/1	100	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-

Singular HHV = 13

Plural Infections = 19

TABLE V. Comparison Between CSF Nested PCR and Plasma Nested PCR, Using CSF as the Standard Reference

LCR N-PCR assay	Plasma N-PCR assay		PPV	NPV	Specificity	Sensitivity
	Positive	Negative				
HSV-1						
Positive	1	5	16.7%	91.3%	89.4%	20%
Negative	4	42				
HSV-2					90%	100%
Positive	2	5	28.6%	100%		
Negative	0	45				
EBV					87.5%	41.7%
Positive	5	5	50%	83.3%		
Negative	7	35				
HCMV					83.8%	73.3%
Positive	11	6	64.7%	88.6%		
Negative	4	31				
HHV-6					85.7%	70%
Positive	7	6	53.8%	92.3%		
Negative	3	36				
HHV-7					88.4%	55.6%
Positive	5	5	50%	90.5%		
Negative	4	38				

PPV, Positive predictive value; NPV, Negative predictive value; VZV and HHV-8, the test was not applicable. Concordance between samples was taken from the same patient.

HHV in CSF/plasma died due to: epileptic status, acute liver failure, and sepsis; epileptic status and sepsis; septic shock by *Staphylococcus aureus*, all initially treated with conventional doses of antiviral drugs. Another patient died due to malignant cerebrovascular thrombosis.

EBV-DNA was detected in the CSF in 44.4% (12/27) and in the plasma 18.5% (5/27); 50% (6/12) had initial clinical hypothesis of encephalitis and the data from EEG, TC, and RM were abnormal.

**Detection of HHV-DNA in CSF and plasma paired samples from patients with acute neurological disease.** In total of 52 paired CSF/plasma samples (one paired sample per patient) were tested. Positive results were defined as any positive HHV sample for a given patient. Among the CSF, the DNA of at least one form of HHV was detected in 10/27 patients (37%). Among the plasma samples, at least one form of viral DNA was detected in 13/32 patients (40.6%).

HHV coinfection was detected in 17/27 (62.9%) of HHV-positive CSF and in 19/32 (59.3%) of HHV-positive plasma (Tables III and IV). Table VI shows results of McNemar test for paired samples.

## DISCUSSION

HHV may cause CNS infections during primary infection or following viral reactivation from a latent state. Particularly in immunosuppressed patients, an infection can become life threatening and the early diagnosis of HHV-associated neurological diseases should thus have high priority. Clinical presentation in these patients usually occurs without typical features, making diagnosis even more challenging [Meyding-Lamandè and Strank, 2012].

Therefore, general broad testing for different HHV infections in CSF samples is highly recommended. PCR analysis to determine viral DNA in CSF has revolutionized the diagnosis of viral nervous system

TABLE VI. Comparison of HHV Infection Detected With Nested PCR on CSF and Plasma

Herpesvirus	Positive result	Positive result	McNemar Test	Fisher test	% Concordance
	CSF (%) <sup>*</sup>	Plasma (%)	( <i>P</i> = 0.53)	( <i>P</i> > 0.05)	
HSV-1	5 (18.5)	1 (3.7)	1.000 <sup>a</sup>	0.4726	20.0
HSV-2	<b>2 (7.4)</b>	<b>2 (7.4)</b>	<b>0.063<sup>a</sup></b>	<b>0.0158</b>	<b>100</b>
VZV	3 (11.1)	0		NA	0
EBV	12 (44.4)	5 (18.5)	0.774 <sup>a</sup>	0.0388	41.6
HCMV	<b>15 (55.6)</b>	<b>11 (40.7)</b>	<b>0.754<sup>a</sup></b>	<b>0.0002</b>	<b>73.3</b>
HHV-6	<b>10 (37)</b>	<b>7 (25.9)</b>	<b>0.508<sup>a</sup></b>	<b>0.0011</b>	<b>70.0</b>
HHV-7	<b>9 (33.3)</b>	<b>5 (18.5)</b>	<b>1.000<sup>a</sup></b>	<b>0.0084</b>	<b>55.5</b>
HHV-8	0	1 (3.7)			
TOTAL	56	32			-

<sup>a</sup>Binomial distribution used.

<sup>\*</sup>CSF: Gold Standard Test. In bold, these HHV showed more accuracy. Results obtained by using the McNemar test in paired samples.



infections [Jeffery et al., 1997], particularly those caused by HHV. Most HHVs are neurotropic and a common cause for serious, acute, and chronic neurological diseases of the CNS, which can be monophasic, recurrent, or chronic. Each particular HHV infection produces different clinical features and imaging abnormalities and many can now be treated [Gilden et al., 2007].

This work shows the frequency of eight HHV infection in 52 immunocompetent patients with several nervous system diseases using nested PCR, thereby replacing diagnostic uncertainties and avoiding invasive brain biopsy [Schmutzhard, 2001].

After analyzing the relation between active HHV infections in patients who were suspected of having HHV infections of the nervous system and nested PCR, this study proposed the use of plasma instead of CSF in HHV-DNA detection in patients with infectious CNS symptoms.

Nested PCR technique performed in plasma and CSF made a clear separation between positive and negative HHV infection. Although the PCR technique is highly sensitive in nature because of the million-fold amplification of the genome present in the tested sample, its exact sensitivity in particular clinical situations is not known. The detection of viral DNA in plasma, but not in CSF, may be interpreted as indicating a precocious infection phase, a hypothesis that has been verified by other authors [Thorén and Widell, 1994].

Using primers specific to each of the studied HHV subtypes, it was possible using molecular methods, to confirm the presence of viral genetic material in the samples, verify the frequency of HHV infections causing encephalitis, and other CSF syndromes and determine whether there was concordance between the results obtained from assays performed on DNA extracted from plasma and those performed on DNA extracted from CSF.

In this study, 59/832 (7%) samples were identified as being positive for HHV-DNA and shows that special attention must be given to both immunosuppressed and immunocompetent patients with HHV infections, particularly in the CNS, to provide adequate treatment and prevent unnecessary hospitalization. Another positive aspect of using plasma instead of CSF to diagnose infections of suspected viral origins (including other viruses such as enterovirus) is that it saves patients from the unnecessary CSF collection.

The results show that the values of nested PCR on plasma can be considered in relation to specificity, such that truly negative patients can be detected and empirical treatment can be avoided. The findings suggested that this test could be used on patients who may face problems related to the collection of CSF, even though there were false negative results. The consequences of this are difficult to assess, although false reassurance leading to delayed diagnosis and treatment.

HCMV had a frequency of 28.8% and was the most prevalent of eight HHV studied, particularly with cases of initial clinical hypothesis of encephalitis (60%). HCMV encephalitis in adult non-immunosuppressed patients has rarely been reported. The highly sensitive PCR-mediated detection of HCMV DNA in CSF remains a suitable method for the ante mortem diagnosis of HCMV-related neurological diseases, as shown in our and many other laboratories, though the positive PCR results could not be correlated with an HCMV-associated CNS disease in a small number of cases. The clinical significance of these findings remains unclear and needs further prospective evaluation. A positive HCMV PCR result obtained using the CSF of immunocompetent patients requires careful interpretation with regard to the individual clinical context [Prösch et al., 1998].

Despite the important diagnostic role of HCMV plasma DNAemia, its biological properties are not fully understood. One hypothesis is that it reflects active virus replication. Alternately, the high abundance of HCMV leukocyte DNAemia in actively HCMV-infected patients has led to the hypothesis that plasma DNAemia may be, at least in part, a result of peripheral blood lysis. This hypothesis would imply that for patients with HCMV leukocyte DNAemia, long-term storage of whole blood samples before separation may cause the release of viral DNA into the plasma fraction, thus distorting PCR results [Schäfer et al., 2000].

In a study [Calvario et al., 2002] using 320 CSF samples from 286 patients and 154 serum samples investigated the detection of viral diseases of the CNS using the Herpes Consensus PCR test in association with nested PCR. This study made important contributions to the diagnosis of HHV in neurological diseases by serum nested PCR. In contrast to many other studies focusing on immunosuppressed patients, the authors selected a cohort of immunocompetent patients to compare the concordance between virus detection in CSF and plasma using nested PCR. Using a very high number of samples and kits, which were sufficiently sensitive for the multiplex detection of six herpesviruses, 15.9% of the 320 CSF samples analyzed were found to be positive. Of the 154 serum samples, 17 (11%) were positive for the six herpesviruses studied [Calvario et al., 2002].

Studahl et al., studied the presence of HCMV, EBV, HHV-6, and HSV in CSF samples obtained from patients with suspected viral etiology (87% were immunocompetent) and found an incidence of HHV-DNA in 10.4% in the CSF [Studahl et al., 2000]. Davies et al., 2005 found that 7% (53/753) of CSF samples for six HHV (HSV-1, HSV-2, VZV, EBV, HCMV, HHV-6) had a clinical correlation with CNS disorders. Other authors showed similar percentages of positivity in their analyses, including Sghaier et al., 2012, who found a positivity of 8.5%.

In this current study, 44.4% EBV was primarily detected in the CSF compared with plasma (18.5%),





and 50% of these patients had clinical hypothesis of encephalitis. CSF PCR has been extremely useful in the diagnosis of EBV CNS infections [Imai et al., 1993; Landgren et al., 1994; Studahl et al., 1994; Kaji and Shoji, 1995; Studahl et al., 1998, 2000; Fujimoto et al., 2003]. One study used nested PCR to detect EBV DNA in the CSF of 7.4% of the studied immunocompetent individuals who presented with CNS disease of unknown etiology [Portolani et al., 1998]. Surprisingly, given that seropositivity approaches 90% in older adults, CSF PCR is not positive in patients with latent EBV infection, and false positives rarely occur in EBV-seropositive individuals who develop non-EBV meningoencephalitis.

In many cases, there was a delay in positive detection between the CSF and plasma samples, which may explain the negative plasma PCR results in cases of transient viremia caused by EBV. Similar results were found in previous reports; unfortunately, in these cases, the patients' material was examined inconsistently [Martelius et al., 2011]. Samples should be collected on the same day. The time between symptom onset and sample collection is critical for a successful viral detection [Abele and Puchhammer-Stöckl, 2002]. Positive EBV and HCMV PCR results should, therefore, be interpreted with caution. Though EBV and HCMV detection may result from the unusual presentation of a CNS viral infection in some cases, it may represent an epiphenomenon in other cases. EBV and HCMV detection in CSF may occur either from a reactivation of the virus caused by concurrent stress on the host or from latent infection with leukocytes trafficking into the intrathecal space [Stahl et al., 2000; Davies et al., 2005].

Quantitative PCR studies have been performed at some research laboratories, and the determination of an EBV-DNA copy number may help further distinguish true-positive active infections from rare cases with false-positive results that are related to virus latency or unusual cases with dual-positive CSF PCRs [Studahl et al., 2000].

The predictive value of any test depends not only on its specificity and sensitivity but also on the pathogen or disease prevalence being tested in a given population. A good example of this dependence is the results related to plasma testing for HSV-1 and HSV-2 in immunocompetent hosts.

Among the family of HHV, only HCMV and, to a lesser extent, HHV-8 are relevant in transfusion medicine. Due to neurotropism, HSV types 1 and 2 are considered to be of minor relevance. However, several reports have offered evidence that a HSV DNAemia may occur and that HSV may, therefore, be transmissible by blood products [Juhl et al., 2010].

The detection of human HHV-6 DNA in the CSF was 37% and may express an inherited integrated genome and may, thus, not be the cause of CNS disease [Leong et al., 2007; Ward et al., 2007]. HHV-7 DNA was detected in CSF in 33.3% and was a cause meningoencephalitis.

Although various methods for simultaneously identifying HHV infection have been developed [Cassinotti and Siegl, 1998; Wada et al., 2007], nested PCR with specific primers has been used to detect the eight viruses of the *Herpesviridae* family "in house" without the use of expensive kits for multiplex PCR.

Particularly after entering the body, the virus multiplies both locally and at secondary sites, generally leading to viremia. In favorable conditions, viral particles can invade the CNS, despite the cerebral capillaries, choroid plexuses, or peripheral nerves, thus causing a variety of clinical and pathological manifestations, depending on the particular susceptibilities of each virus in the CNS cell population [Calvario et al., 2002].

Documented reports of viral coinfections in immunocompetent patients, as determined by PCR, have also been uncommon. In the present study, among the 27 patients who had positive HHV-DNA detected in their CSF samples, 17 had HHV coinfection, and 11 were clinically diagnosed with viral encephalitis. In the 11 HHV-infected patients with encephalitis, only one died, with CNS coinfection (HSV-1, HSV-2, and HCMV) confirmed by molecular methods. The significance of HHV coinfection in the CNS and the associated clinical manifestations requires further investigation. Furthermore, this study proposes the use of real-time PCR (qPCR) in the quantification of the viral load found in infected patients, aiming to ensure the best interpretation of viral nervous system diseases.

## REFERENCES

- Abele SW, Puchhammer-Stöckl E. 2002. Diagnosis of herpesvirus infections of the central nervous system. *J Clin Virol* 25:S79-S85.
- Altman DG. 1991. Practical statistics for medical research. London: Chapman and hall, pp 410-411.
- Big C, Reineck LA, Aronoff DM. 2009. Viral infections of the central nervous system: A case-based review. *J Clin Med Res* 7:142-146.
- Boivin G. 2004. Diagnosis of herpesvirus infections of the central nervous system. *Herpes* 11:48-56.
- Calvario A, Bozzi A, Scarasciulli M, Ventola C, Stomati D, Brancasi B. 2002. Herpes consensus PCR test: A useful diagnostic approach to the screening of viral diseases of the central nervous system. *J Clin Virol* 25:S71-S78.
- Cassinotti P, Siegl G. 1998. A Nested-PCR assay for the simultaneous amplification of HSV-1, HSV-2, and HCMV genomes in patients with presumed herpetic CNS infections. *J Virol Methods* 71:105-114.
- Chan PK, Ho-Keung NG, Cheung JLK, Cheng AF. 2000. Survey for presence and distribution of human herpesvirus 8 in healthy brain. *J Clin Microbiol* 38:2772-2773.
- Cinque P, Brytting M, Vago L, Castagna A, Parravicini C, Zanchetta N, D'Arminio Monforte, Wahren A, Lazzarin B, Linde A. 1993. Epstein-Barr virus DNA in cerebrospinal fluid from patients with Aids related primary lymphoma of the central nervous system. *Lancet* 342:398-401.
- Danise A, Cinque P, Vergani S, Candino M, Racca S, De Bona A, Novati R, Castagna A, Lazzarin A. 1997. Use of polymerase chain reaction assays of aqueous humor in the differential diagnosis of retinitis in patients infected with human immunodeficiency virus. *Clin Infect Dis* 24:1100-1106.
- Davies NWS, Brown LJ, Gonde J, Irish D, Robinson RO, Swan AV, Banatvala J, Howard RS, Sharief MK, Muir P. 2005. Factors influencing PCR detection of viruses in cerebrospinal fluid of patients with suspected CNS infections. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 76:82-87.



- DeBiasi R, Kleinschmidt-Demasters B, Weinberg A, Tyler K. 2002. Use of PCR for the diagnosis of herpesvirus infections of the central nervous system. *J Clin Virol* 25:S5–S11.
- Ehrnst A, Barkholt L, Lewensohn-Fuchs I, Ljungman P, Teodosiu O, Staland A, Ringdén O, Tydén G, Johansson B. 1995. HCMV PCR monitoring in leukocytes of transplant patients. *Clin Diagn Virol* 3:139–153.
- Fujimoto H, Asaoka K, Imaizumi T, Ayabe M, Shoji H, Kaji M. 2003. Epstein-Barr virus infections of the central nervous system. *Intern Med* 42:33–40.
- Gilden D, Mahalingam R, Cohrs R, Tyler K. 2007. Herpesvirus infection of the nervous system. *Nat Clin Pract Neuro* 3:82–94.
- Gregoire SM, Van Pesch V, Goffete S, Peeters A, Sindic CJ. 2006. Polymerase chain reaction analysis and oligoclonal antibody in the cerebrospinal fluid from 34 patients with Varicella-Zoster virus infection of the nervous system. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 77:938–942.
- Imai S, Usui N, Sugiura M, Osato T, Sato T, Tsutsumi H, Tachi N, Nakata S, Yamanaka T, Chiba S. 1993. Epstein-Barr virus genomic sequences and specific antibodies in cerebrospinal fluid in children with neurologic complications of acute and reactivated EBV infections. *J Med Virol* 40:278–284.
- Jeffery KJM, Read SJ, Peto TEA, Mayon-White RT, Bangham CRM. 1997. Diagnosis of viral infections of central nervous system: Clinical interpretation of PCR results. *Lancet* 249:313–317.
- Juhl D, Mosel C, Nawroth F, Funke AM, Dadgar SM, Hagenstrom H, Kirchner H, Hennig H. 2010. Detection of herpes simplex virus DNA in plasma of patients with primary but not with recurrent infection: Implications for transfusion medicine. *Transfusion Med* 20:38–47.
- Kaji M, Shoji H. 1995. Detection of Epstein-Barr virus genome in peripheral leucocytes and CSF by the polymerase chain reaction in two patients with Epstein-Barr virus related to aseptic meningitis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 59:99.
- Kleinschmidt-DeMasters BK, De Biasi RL, Tyler KL. 2001. Polymerase chain reaction as a diagnostic adjunct in herpesvirus infections of the nervous system. *Brain Pathol* 11:452–446.
- Landgren M, Kyllerman M, Bergstrom T, Dotevall L, Ljungstrom L, Ricksten A. 1994. Diagnosis of Epstein-Barr virus-induced central nervous system infections by DNA amplification from cerebrospinal fluid. *Ann Neurol* 35:631–635.
- Leong HN, Tuke PW, Tedder RS, Khanom AB, Eglin RP, Atkinson CE. 2007. The prevalence of chromosomally integrated human herpesvirus 6 genomes in the blood of UK blood donors. *J Med Virol* 79:45–51.
- Martelius T, Lappalainen M, Palomäki M, Anttila VJ. 2011. Clinical characteristics of patients with Epstein Barr virus in cerebrospinal fluid. *BMC Infect Dis* 11:281–287.
- Meyding-Lamadé U, Strank C. 2012. Herpesvirus infections of the central nervous system in immunocompromised patients. *Ther Adv Neurol Disord* 5:279–296.
- Mitchell PS, Espy MJ, Smith TF, Persing DH. 1999. Molecular diagnosis of herpes simplex virus infections in the central nervous system. *J Clin Microbiol* 37:2127–2136.
- Portolani M, Pietrosempoli P, Meacci M, Sabbatini AM, Pecorari M, Mantovani G, Cermelli C. 1998. Detection of Epstein-Barr virus DNA in cerebrospinal fluid from immunocompetent individuals with brain disorders. *New Microbiol* 21:77–79.
- Prösch S, Schielke E, Reip A, Meisel H, Volk HD, Einhäupl KM, Krüger DH. 1998. Human cytomegalovirus (HCMV) encephalitis in an immunocompetent young person and diagnostic reliability of HCMV DNA PCR using cerebrospinal fluid of nonimmunosuppressed patients. *J Clin Microbiol* 36:3636–3640.
- Sauerbrei A, Wutzler P. 2002. Laboratory diagnosis of central nervous system infections caused by herpesviruses. *J Clin Virol* 25:S45–S51.
- Schäfer P, Tenschert W, Schröter M, Gutensohn K, Laufs R. 2000. False-positive results of plasma PCR for cytomegalovirus DNA due to delayed sample preparation. *J Clin Microbiol* 9:3249–3253.
- Schmutzhard E. 2001. Viral infections of the CNS with special emphasis on herpes simplex infections. *J Neurol* 248:469–477.
- Schoveroer E, Frechin V, Fritsch S, Freitag R, Fuchs A, Gutt JP, Stoll-Keller F. 2006. Atypical symptoms in patients with herpesvirus DNA detected by PCR in cerebrospinal fluid. *J Clin Virol* 35:458–462.
- Sghaier W, Bahri O, Kedous E, Fazaa O, Rezig D, Touzi H, Ben Y, Meddeb Z, Triki H. 2012. Retrospective study of viral causes of central nervous system infections in Tunisia (2003-2009). *Med Sante Trop* 2:373–378.
- Shoji H, Wakasugi K, Miura Y, Imaizumi T, Kazuyama Y. 2002. Herpesvirus infections of the central nervous system. *Jpn J Infect Dis* 55:6–13.
- Stahl HD, Hubner B, Seid B, Liebert U, van der Heijden IM, Wilbrink B, Kraan MC, Emmrich F, Tak PP. 2000. Detection of multiple viral DNA species in synovial tissue and fluid of patients with early arthritis. *Ann Rheum Dis* 59:342–346.
- Studahl M, Bergstrom T, Hagberg L. 1998. Acute viral encephalitis in adults - A prospective study. *Scand J Infect Dis* 30:215–220.
- Studahl M, Hagberg L, Rekdar E, Bergström T. 2000. Herpesvirus DNA detection in cerebral spinal fluid: Differences in clinical presentation between Alpha-, Beta- and Gamma-herpesviruses. *Scand J Infect Dis* 32:237–8.
- Studahl M, Richten A, Sandberg T, Elowson S, Herner S, Sall C, Bergstrom T. 1994. Cytomegalovirus infection of the CNS in non-compromised patients. *Acta Neurol Scand* 89:451–457.
- Thorén A, Widell A. 1994. PCR for the diagnosis of enteroviral meningitis. *Scand J Infect Dis* 26:249–254.
- Vrioni G, Kalogeropoulos C, Gartzonika C, Priavali E, Levidiotou S. 2007. Usefulness of Herpes Consensus PCR methodology to routine diagnostic testing for herpesviruses infections in clinical specimens. *Virol J* 4:59–62.
- Wada K, Kubota N, Ito Y, Yagasaki H, Kato K, Yoshikawa T, Yasuyuki O, Hisami A, Yasuhiro F, Tetsuya K, Seiji K, Yukihiko N, Hiroshi K. 2007. Simultaneous quantification of Epstein-Barr virus, Cytomegalovirus, and Human Herpesvirus 6 DNA in samples from transplant recipients by multiplex real-time PCR Assay. *J Clin Microbiol* 45:1426–1432.
- Ward KN, Leong HN, Thiruchelvam AD, Atkinson CE, Clark DA. 2007. Human herpesvirus 6 DNA levels in cerebrospinal fluid due to primary infection differ from those due to chromosomal viral integration and have implications for diagnosis of encephalitis. *J Clin Microbiol* 45:1298–1304.
- Wang FZ, Dahl H, Linde A, Brytting M, Ehrnst A, Ljungman P. 1996. Lymphotropic herpesviruses in allogeneic bone marrow transplantation. *Blood* 88:3615–3620.
- Whitley RJ, Gnann J. 2002. Viral encephalitis: Familial infections and emerging pathogens. *Lancet* 359:507–513.
- Yalcin S, Karpuzoglu T, Suleymanlar G, Mutlu G, Mukai T, Yamamoto T, Isegawa Y, Yamanishi K. 1994. Human herpesvirus 6 and human herpesvirus 7 infections in renal transplant recipients and healthy adults in Turkey. *Arch Virol* 136:183–190.

## *Anexo 5*

Na tabela anexada abaixo, apresentamos as descrições de todos os casos estudados para herpesvírus pela Reação em Cadeia da Polimerase (n=52).

N	SEXO	LOCAL	HD	COLETA	NASC.	IDADE	ÓBITO	DATA ÓBITO	DIA	CAUSA	TRAT	COINF
1	M	3	1	23/01/2008	14/01/1985	23	0				2	0
2	M	2	2	04/02/2008	14/05/1977	30	0				1	1
3	F	1	3	01/03/2008	12/04/1997	11	0				1	1
4	M	3	3	14/04/2008	06/12/1994	13	0				0	0
5	M	1	3	11/07/2008	20/05/2001	7	0				1	1
6	M	2	3	11/08/2008	26/01/1962	46	0				0	1
7	F	5	3	20/05/2008	06/09/1961	46	0				1	1
8	F	3	3	22/05/2008	08/04/2002	6	0				0	1
9	M	2	4	15/09/2008	14/09/1944	64	0				0	0
10	M	2	5	02/07/2008	10/01/1968	40	0				0	1
11	F	1	5	14/11/2008	23/12/1994	13	0				0	0
12	M	1	3	18/05/2008	06/09/2006	2	1	31/07/2008	74	SARA+EP+ENCEF	1	1
13	F	1	3	25/11/2008	13/01/1999	9	0				1	0
14	M	1	6	24/11/2008	15/06/2003	5	0				0	0
15	M	1	6	24/11/2008	27/03/1996	12	0				0	0
16	F	2	3	17/11/2008	15/12/1988	20	0				3	1
17	F	2	7	04/02/2009	25/05/1954	54	0				2	1
18	M	2	8	06/02/2009	22/12/1987	21	0				0	0
19	F	1	3	06/02/2009	30/08/1998	10	0				0	0
20	F	2	9	16/02/2009	01/08/1957	51	0				0	1
21	M	5	3	27/02/2009	12/06/1977	31	0				0	0
22	F	2	3	04/03/2009	19/08/1965	43	0				2	1
23	M	4	3	17/03/2009	26/02/2009	0,05	0				1	0
24	M	1	5	02/04/2009	02/05/2007	1,9	0				0	0
25	F	3	5	27/03/2009	06/04/2007	1,9	0				0	1
26	F	2	10	12/05/2009	12/08/1989	19	0				0	0
27	M	2	3	15/07/2009	06/03/1935	74	0				1	1
28	F	6	5	23/07/2009	24/08/2008	1	1	08/11/2009	108	CS+IHA+IRA+EP	1	0
29	F	4	3	07/07/2009	02/02/1996	13	0				1	0
30	M	2	11	09/09/2009	26/01/1943	66	0				0	0
31	F	5	3	15/09/2009	08/06/1948	61	1	01/11/2009	47	CS+PN+PCR	3	0
32	F	4	5	16/09/2009	12/02/1997	12	0				0	0
33	F	7	12	18/11/2009	11/09/1980	29	0				0	0
34	F	5	5	03/12/2009	12/11/1940	69	0				1	0
35	M	5	3	15/12/2009	27/09/1994	23	0				1	0
36	M	5	5	16/12/2009	11/07/1971	38	1	19/12/2009	3	CS+EP	0	0
37	F	5	5	21/02/2008	24/10/1955	53	0				0	0
38	M	7	13	01/02/2010	13/09/1968	41	0				0	0
39	F	2	8	15/03/2010	28/09/1985	24	0				1	1
40	F	7	3	18/02/2010	01/05/1990	19	0				1	1
41	F	2	5	01/03/2010	26/10/1970	40	0				0	0
42	M	1	5	14/07/2008	25/06/2008	0,05	0				0	0
43	F	4	14	21/01/2011	05/11/2001	9	0				0	0
44	M	5	3	14/12/2010	16/10/1961	49	0				1	0
45	F	1	3	09/02/2011	03/08/2007	3	0				1	0
46	M	2	5	11/02/2011	24/10/1942	68	1	17/02/2011	6	AVC+PCR	1	0
47	F	3	3	14/02/2011	14/01/2003	8	0				1	0
48	M	2	5	14/02/2011	29/10/1982	28	0				0	0
49	F	2	3	31/08/2011	20/02/1964	47	0				2	0
50	F	6	8	05/12/2011	25/04/2010	1	0				1	0
51	M	2	10	12/01/2012	11/11/1986	25	0				0	0
52	M	7	15	19/04/2012	02/02/1947	64	0				1	0

N	HHV+	HSV-1 So	HSV-1 LCR	HSV-2 So	HSV-2 LCR	HSV-3 So	HSV-3 LCR	EBV So	EBV LCR	CMV So	CMV LCR
1	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0
2	1	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1
3	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0
4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1
6	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
7	1	0	1	0	0	0	0	0	1	1	1
8	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
9	1	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0
10	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1
11	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
12	1	1	0	1	0	0	0	0	1	1	1
13	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
14	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0
15	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
16	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1
17	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0
18	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
19	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
20	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1
21	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
22	1	0	1	0	0	0	0	0	1	0	1
23	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
24	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
25	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
26	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0
27	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1
28	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
29	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
30	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
31	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
32	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0
33	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0
34	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
35	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
36	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
37	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
38	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
39	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1
40	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0
41	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0
42	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
43	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
44	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
45	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0
46	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
47	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
48	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
49	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
50	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
51	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
52	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

N	HHV-6 So	HHV-6 LCR	HHV-7 So	HHV-7 LCR	HHV-8 So	HHV-8 LCR	PROT	GLIC	PLEO	IgG	EEG	TC
1	1	0	0	0	0	0	0		0	1	1	
2	0	0	1	1	0	0	1		0		1	
3	1	1	0	0	0	0	1				1	
4	0	0	0	0	0	0	1		0	0	1	0
5	0	1	0	0	0	0	0	1			1	0
6	1	1	1	0	0	0					1	
7	0	0	0	0	0	0	1		1	0	1	1
8	1	1	0	1	0	0	1	1	0	1	1	
9	0	0	0	0	0	0	1		0	1		
10	0	0	0	0	0	0	0		0	1	1	1
11	0	0	0	0	0	0	1	0			0	
12	0	0	0	0	0	0					1	1
13	0	0	0	0	0	0	1					0
14	0	0	0	0	0	0					1	
15	0	0	0	0	0	0						
16	1	1	1	1	0	0	1	1		0		1
17	1	1	1	1	0	0	0		1	0	1	
18	0	0	0	0	0	0	1		1	0	0	
19	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0		
20	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1		
21	0	0	0	0	0	0	1		0	0		
22	0	1	0	0	0	0	0	1			1	
23	0	0	0	0	0	0	0		1		1	
24	0	0	0	0	0	0						
25	1	1	1	1	0	0	1		1	0	0	
26	0	0	0	0	0	0	1		1	1	1	
27	0	0	1	0	0	0					1	
28	0	0	0	0	0	0	1				1	0
29	0	0	0	1	0	0	0					0
30	0	0	0	0	0	0	0	1			1	
31	0	0	0	0	0	0	0		1		1	
32	1	0	0	0	0	0	0				1	
33	1	0	0	0	0	0	1					
34	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	
35	1	0	0	0	0	0	1		0		0	0
36	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	
37	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	1	1
38	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1		1
39	0	1	0	1	0	0	0	1			1	
40	1	0	0	1	0	0	0		0		1	0
41	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0
42	0	0	1	0	0	0	0					
43	0	0	0	0	0	0	1		1	1		1
44	0	0	0	0	0	0	0					
45	0	0	0	0	0	0	1	1			1	1
46	0	0	0	0	0	0	0				1	1
47	0	0	0	0	0	0	1	0			1	
48	0	0	0	0	0	0	0	1	0			
49	0	0	0	0	0	0	0		1	1		1
50	0	0	1	0	0	0	0				1	1
51	0	0	1	0	1	0	0					0
52	0	0	0	0	0	0	0		1	1		

N	RM	Encefalite	Paralisia	Febre	Dor de cabeça	Dor abdominal	Convulsão	Alt.comportam.	Baixo nível consc.
1	0	0	0	0	0	0	0	0	N
2		0	1	1	0	0	0	0	N
3	0	1	0	0	0	0	1	0	N
4	1	1	0	0	0	0	0	0	N
5	0	1	0	0	0	0	1	0	N
6	1	1	0	0	0	0	1	0	N
7	0	1	0	0	0	0	1	0	N
8	1	1	0	1	0	1	0	0	N
9		0	0	0	0	0	0	0	N
10	1	0	0	0	1	0	0	1	N
11	0	0	0	0	0	0	0	0	N
12	1	1	0	1	0	0	1	0	S
13		1	0	0	0	0	0	0	N
14	1	0	0	0	0	0	0	0	N
15	0	0	0	0	0	0	0	0	N
16	1	1	0	0	1	0	0	0	N
17		0	0	0	0	0	0	0	N
18		0	0	0	0	0	0	0	N
19	1	1	0	0	0	0	0	0	N
20	0	0	0	0	1	0	0	0	N
21		1	0	0	1	0	0	0	N
22	1	1	0	0	1	0	0	0	N
23	0	1	0	0	0	0	0	0	N
24		0	0	0	0	0	1	0	N
25	1	0	0	1	0	0	0	0	N
26	1	0	0	0	0	0	1	0	N
27		1	0	0	0	0	1	0	N
28	1	0	0	0	0	0	0	0	N
29	0	1	0	1	0	0	1	1	N
30	1	0	0	0	0	0	0	0	N
31	1	1	0	0	0	0	0	0	N
32	1	0	0	0	0	0	0	0	N
33		0	0	0	0	0	0	0	N
34		0	0	0	0	0	0	0	N
35		1	0	0	0	0	0	0	N
36	1	0	0	0	0	0	0	0	N
37		0	0	0	0	0	0	0	N
38		0	0	0	0	0	0	0	N
39	1	0	0	0	1	0	0	0	N
40	1	1	0	0	1	0	1	1	N
41	1	0	0	0	0	0	0	0	N
42		0	0	0	0	0	0	0	N
43		0	0	0	0	0	0	0	N
44	1	1	0	0	0	0	0	0	N
45		1	0	0	0	0	1	0	N
46		0	0	0	0	0	0	0	N
47	1	1	0	0	0	0	0	0	N
48		0	0	0	0	0	0	0	N
49	1	1	0	0	1	0	0	0	N
50		0	0	0	0	0	0	0	N
51	1	0	0	0	0	0	0	0	N
52	0	0	0	0	0	0	0	0	N

N	Conf. mental	Alt. Motora	Neuropatia	Parestesia	Sonolência	Vômitos	Fraqueza	Perda de peso	Mioclonia
1	N	N	N	S	N	N	N	N	N
2	N	N	S	N	N	N	N	N	N
3	N	N	N	N	N	N	N	N	N
4	N	N	N	N	N	N	N	N	N
5	N	N	N	N	N	N	N	N	N
6	N	N	N	N	N	N	N	N	N
7	S	N	N	N	N	N	N	N	N
8	N	N	N	N	N	S	N	S	N
9	N	S	N	N	N	N	N	N	N
10	N	N	N	N	N	N	N	N	N
11	N	N	N	N	N	N	N	N	N
12	N	N	N	N	N	S	N	N	N
13	N	N	N	N	S	S	N	N	N
14	N	N	N	N	N	N	N	N	N
15	N	N	N	N	N	N	N	N	N
16	N	N	N	N	N	N	N	N	N
17	N	N	N	N	N	N	N	N	N
18	N	N	N	S	N	N	N	N	N
19	N	N	N	N	N	N	N	N	N
20	N	N	N	N	N	S	N	N	N
21	N	N	N	N	N	N	N	N	N
22	N	N	N	N	N	S	S	N	N
23	N	N	N	N	N	N	N	N	N
24	N	N	N	N	N	N	N	N	N
25	N	N	N	N	N	N	N	N	N
26	N	N	N	N	N	N	N	N	N
27	S	N	N	N	N	N	N	N	N
28	N	N	N	N	N	N	N	N	N
29	N	N	N	N	N	N	N	N	N
30	N	N	N	N	N	N	N	N	N
31	N	N	N	N	N	N	N	N	N
32	N	N	N	N	N	N	N	N	N
33	N	N	N	N	N	N	N	N	N
34	N	N	N	N	N	N	N	N	N
35	N	N	N	N	N	N	N	N	N
36	N	N	N	N	N	N	N	N	N
37	N	N	N	N	N	N	N	N	N
38	N	N	N	N	N	N	N	N	N
39	N	N	N	N	N	S	N	N	N
40	N	N	N	N	N	N	N	N	N
41	N	N	N	N	N	N	N	N	S
42	N	N	N	N	N	N	N	N	N
43	N	N	N	N	N	N	N	N	N
44	N	N	N	N	N	N	N	N	N
45	N	N	N	N	N	N	N	N	N
46	N	N	N	N	N	N	N	N	N
47	N	N	N	N	N	N	N	N	N
48	N	N	N	N	N	N	N	N	N
49	N	S	N	N	N	N	N	N	N
50	N	N	N	N	N	N	N	N	N
51	N	N	N	N	N	N	N	N	N
52	N	N	N	N	N	N	N	N	N

N	Perda de memória	Visão alterada	Lentificação
1	N	N	N
2	N	N	N
3	N	N	N
4	N	N	N
5	N	N	N
6	N	N	N
7	N	N	N
8	N	N	N
9	N	N	N
10	N	N	N
11	N	N	N
12	N	N	N
13	N	N	N
14	N	N	N
15	N	N	N
16	N	N	N
17	N	N	N
18	N	N	N
19	N	N	N
20	N	N	N
21	N	N	N
22	N	N	N
23	N	N	N
24	N	N	N
25	N	N	N
26	N	N	N
27	N	N	N
28	N	N	N
29	N	N	N
30	N	N	N
31	N	N	N
32	N	N	N
33	N	N	N
34	N	N	N
35	N	N	N
36	N	N	N
37	N	N	N
38	N	N	N
39	N	N	N
40	N	N	N
41	N	N	S
42	N	N	N
43	N	N	N
44	N	N	N
45	N	N	N
46	N	N	N
47	N	N	N
48	N	N	N
49	S	S	N
50	N	N	N
51	N	N	N
52	N	N	N

## Legenda:

### Local Coleta

- 1-Enfermaria pediátrica
- 2- Neurologia
- 3- Neuropediatria
- 4- Pediatria
- 5- Pronto socorro
- 6- UTI pediátrica
- 7- Outros: Medicina Interna, Reumatologia, Oncologia e Psiquiatria

### Tratamento

- 1- aciclovir,
- 2- ganciclovir,
- 3- imunoglobulina
- 4- Aciclovir+ Ganciclovir

### Encefalite

- 0- não apresenta encefalite,
- 1- 1- apresenta encefalite

### Hipótese Diagnóstica: (HD)

- 1-Plexopatia lombossacral
- 2- Paralisia facial
- 3- Encefalite
- 4- Síndrome cerebelar
- 5- Encefalopatia
- 6- Epilepsia
- 7- Mielite
- 8- Meningoencefalite
- 9- Meningite
- 10- Esclerose múltipla
- 11- Mononeurite
- 12- Parestesia
- 13- Polineuropatia
- 14- Meningite asséptica
- 15- Polirradiculopatia

Trat = Tratamento  
Coinf = coinfeção