

Universidade Federal de Minas Gerais  
Programa de Pós-Graduação em Microbiologia

**Detecção de human gammaherpesvirus 4 (Epstein-Barr virus) no líquido cefalorraquidiano de crianças com suspeita de meningoencefalite no estado de Minas Gerais**

Belo Horizonte

2020

**NATHALIA MARTINS QUINTÃO**

**Detecção de human gammaherpesvirus 4 (Epstein-Barr virus - EBV) no líquido cefalorraquidiano de crianças com suspeita de meningoencefalite no estado de Minas Gerais**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito à obtenção do título de Mestre em Microbiologia.

**Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Erna Gessien Kroon**

Belo Horizonte

2020

043 Quintão, Nathalia Martins.

Detecção de human gammaherpesvirus 4 (Epstein-Barr virus - EBV) no líquido cefalorraquidiano de crianças com suspeita de meningoencefalite no estado de Minas Gerais [manuscrito] / Nathalia Martins Quintão. – 2020.

59 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Erna Gessien Kroon.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-graduação em Microbiologia.

1. Microbiologia. 2. Herpesvirus Humano 4. 3. Meningoencefalite. 4. Líquido Cefalorraquidiano. I. Kroon, Erna Gessien. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. III. Título.

CDU: 579



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA

ATA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE Nathalia Martins Quintão  
Nº REGISTRO: 2018685338

Às 13:00 horas do dia 20 de 02 de 2020, reuniu-se, no Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, a Comissão Examinadora composta pelos Dr. Danilo Bretas de Oliveira e Dr<sup>a</sup>. Graciela Kunrath Lima e a Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Erna Geessien Kroon – Orientadora, para julgar o trabalho final "Detecção de human gammaherpesvirus 4 (Epstein-Barr virus) no líquido cefalorraquidiano de crianças com suspeita de meningoencefalite", da aluna Nathalia Martins Quintão, requisito final para a obtenção do Grau de **MESTRE EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: MICROBIOLOGIA**. Abrindo a sessão, o Presidente da Comissão, Prof. Flávio Guimarães da Fonseca - Coordenador do Programa, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra à candidata, para a apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos Examinadores, com a respectiva defesa da candidata. Logo após, a Comissão se reuniu, sem a presença da candidata e do público, para julgamento e expedição de resultado final. A candidata foi considerada **APROVADA**. O resultado final foi comunicado publicamente à candidata pelo Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, o Presidente encerrou a reunião e lavrou a presente ata, que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. A candidata tem 60 (sessenta) dias, a partir desta data, para entregar a versão final da dissertação ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia da UFMG e requerer seu diploma.

Dr. Danilo Bretas de Oliveira (membro da banca)

Dr<sup>a</sup>. Graciela Kunrath Lima (membro da banca)

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Erna Geessien Kroon (orientadora)

Prof. Flávio Guimarães da Fonseca  
Coordenador do PPGM/UFMG

## RESUMO

Epstein-Barr virus pertence à subfamília *Gammaherpesvirinae* da família *Herpesviridae* e é o agente etiológico da mononucleose infecciosa. A transmissão de EBV geralmente é pela saliva, sendo o quadro clássico de infecção primária a mononucleose apenas 5% dos casos evoluem para quadros de meningoencefalites. Os grupos de risco são principalmente crianças na primeira infância e pacientes imunocomprometidos. No Brasil, nos últimos 10 anos foram registrados aproximadamente 22 mil casos de meningites e encefalites virais, sendo 52% dos casos em crianças com até 14 anos de idade. O ensaio de PCR em tempo real (qPCR) revoluciona o diagnóstico de neuroinfecções virais. O objetivo deste trabalho foi detectar a presença de DNA genômico e de mRNA de EBV por qPCR para casos de meningoencefalites em pacientes de Minas Gerais e construir, com base na análise de prontuário dos pacientes e dados disponíveis no DATASUS, um breve panorama dos casos de meningoencefalites por EBV. Amostras de líquido de 390 pacientes foram avaliados por qPCR SYBR Green empregando os iniciadores EBNA-1 e gp350. Das amostras testadas 78 foram positivas para EBV (qPCR e sequenciamento). Destes, 48,7% tinham até 5 anos de idade quando foram internados. Os resultados obtidos neste estudo corroboram com os casos descritos na literatura e alertam para a frequência de infecção por EBV em meningoencefalite, o que pode impactar no prognóstico e tratamento da doença.

## ABSTRACT

Epstein-Barr (EBV) belongs to the *Herpesviridae* family and it is the etiological agent of infectious mononucleosis (IM). EBV transmission usually its through saliva. Only 5% of the mononucleosis cases evolves to meningoencephalitis. The risk group are in major children on the early ages and immunocompromised patients. In Brazil, on the last 10 years almost 22 thousand cases of viral meningitis and encephalitis were registered, being in 52% of the cases children up to 14 years old. The real time PCR assay (qPCR) improve the neuroinfections diagnostic. The aim of this work was to detect the presence of EBV genomic DNA and mRNA by qPCR in meningoencephalitis cases in patients from Minas Gerais. Based on patients medical records analysis and epidemiological data available on DATASUS we build an overview of EBV associated meningoencephalitis cases. Cerebrospinal fluid (CSF) from 390 patients were evaluated by qPCR SYBR Green using EBNA-1 and gp350 primers, and 78 samples were EBV positive. From those, 48,7% were children up to 5 years old. The results obtained in this study corroborates with articles and cases reported in literature and warn about the frequency of EBV meningonencephalitis, which may impact on prognosis and treatment of the infection.

## SUMÁRIO

RESUMO.....	5
ABSTRACT .....	6
SUMÁRIO.....	7
ÍNDICE DE FIGURAS .....	10
ÍNDICE DE TABELAS .....	11
INTRODUÇÃO.....	12
1. Infecções virais do sistema nervoso central (SNC).....	12
2. Meningoencefalites.....	12
3. Epidemiologia.....	13
4. Agentes etiológicos .....	14
5. Meningoencefalites causadas por herpesvírus.....	15
6. Família Herpesviridae.....	16
7. Epstein-Barr (EBV) .....	17
7.1. Características do EBV e ciclo de multiplicação.....	18
7.2. Latência de Epstein-Barr .....	21
8. Rotas de entradas pelo SNC e latência de herpesvírus linfotrópicos em células nervosas .....	23
9. Diagnósticos de infecções virais no SNC.....	24
JUSTIFICATIVA .....	26
OBJETIVOS .....	27
1. Objetivos Gerais .....	27
2. Objetivos Específicos .....	27
METODOLOGIA.....	28
1. Controle positivo .....	28
2. Amostras clínicas.....	28
2.1. Diluição do LCR.....	28

2.2.	Extração de RNA com tratamento de DNase .....	28
2.3.	Síntese de cDNA .....	29
3.	Seleção dos iniciadores.....	29
3.1.	Diluição dos iniciadores .....	29
3.2.	Padronização da concentração dos iniciadores.....	30
3.3.	Curva Padrão .....	30
3.4.	Teste de Especificidade .....	30
4.	<i>Real-Time</i> PCR (qPCR).....	30
5.	Extração de DNA do gel.....	31
6.	Sequenciamento e alinhamento das sequências nucleotídicas .....	31
7.	Cultivo celular .....	32
8.	Isolamento de EBV.....	32
9.	Prontuários dos pacientes .....	33
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....		33
1.	Seleção dos iniciadores.....	33
2.	Padronização, curva padrão e teste de especificidade .....	34
3.	Triagem das amostras clínicas por qPCR para EBV .....	36
4.	Sequenciamento de DNA amplificado .....	37
5.	Isolamento de EBV.....	38
6.	Avaliação dos prontuários .....	39
7.	Relato de casos .....	42
7.1.	Caso 854 .....	43
7.2.	Caso 877 .....	44
7.3.	Caso 878 .....	46
7.4.	Caso 1027 e 1071 .....	47
7.5.	Caso 654 .....	49
CONCLUSÃO.....		50



REFERÊNCIAS ..... 51

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Casos registrados como meningites no Brasil em um período de 10 anos. Fonte: DATASUS...	13
Figura 2. Casos de meningites e encefalites virais registrados no Brasil entre agosto/2018 e agosto/2019. Fonte: DATASUS. ....	14
Figura 3. Envelope e visão interna do nucleocapsídeo de herpesvírus. Diagrama mostrando a estrutura do nucleocapsídeo onde em azul claro está o nucleocapsídeo de aproximadamente 125nm envolto pelo tegumento amorfo (laranja) e o envelope (azul escuro) com espículas glicoproteicas (em amarelo). Fonte: Pellet & Roizman, 2013. ....	16
Figura 4. Diagrama representativo do genoma do vírus Epstein-Barr. O genoma linear de DNA dupla fita de EBV é dividido em duas regiões principais a US (em azul, Unique short) e a região UL (em rosa, Unique long). A região longa (UL) de EBV é subdividida por regiões repetitivas internas (em laranja, IR1-4). Nas extremidades do genoma são apresentadas repetições terminais (em verde, TR1 e TR2).....	18
Figura 5. Esquema representativo do ciclo de multiplicação de herpesvírus. Adsorção da partícula viral na superfície celular do hospedeiro e penetração viral (A). O capsídeo é conduzido até o poro nuclear para liberação do DNA no núcleo (B). Cascata transcricional: proteínas imediatamente precoces, precoces e tardias (C, D e E). Replicação do genoma e montagem do nucleocapsídeo para liberação no citoplasma com formação de envelope primário (F). Compartimentalização dos nucleocapsídeo e formação do envelope definitivo (G). Liberação da partícula viral (H). Subversão de autofagia (I). Fonte: Lussignol & Esclatine, 2017 (Fig. Adaptada).....	21
Figura 6. Padronização da concentração de uso dos iniciadores. Foram testados os iniciadores EBNA-1 (A) e gp350 (B) em diferentes concentrações de uso (200nm, 500nm e 1µm) para decidir qual, entre estas, seria utilizada durante a condução de todos os experimentos. Para ambos os iniciadores a concentração de uso definida foi 500nm. ....	34
Figura 7. Curva padrão de EBNA-1(A) e gp350 (B). Foi feita a curva padrão para avaliar a sensibilidade de detecção do iniciador. O controle positivo foi diluído nas concentrações de 1ng até 1000fg e o iniciador foi capaz de amplificar o controle na faixa entre 1ng até 10pg. ....	35
Figura 8. Teste de especificidade de EBNA-1 (A) e gp350 (B). Foi testada a especificidade dos iniciadores em amplificar outro herpesvírus (HSV-1/2). Ambos são específicos para EBV.....	36
Figura 9. Relação de amostras EBV positivas e negativas apartir dos resultados obtidos por qPCR. Em 78% das amostras não foi detectado Epstein-Barr. Entre as amostras positivas, 14 amostras indicaram a presença de EBV, possivelmente em estado latente e 64 amostras positivas para EBV em possível estado de multiplicação. E apenas 2% das amostras apresentaram resultados inconclusivos na qPCR. ....	37
Figura 10. Isolamento de Epstein-Barr e confirmação por qPCR. Isolamento (A) observa-se o controle de células linhagem A549 sem alterações (CC) e a 4ª passagem da diluição inicial (1:5) diluída em 1:10 observa-se fusão celular. Confirmação por qPCR (B) da presenã de EBV. ....	39
Figura 11. Distribuição da faixa etária dos pacientes EBV-positivos. Os pacientes em sua maioria estão na faixa etária entre 1 mês a 5 anos de idade. ....	40
Figura 12. Diagnósticos reportados nos prontuários dos pacientes EBV positivos (faixa etária: 1 mês a 5anos). Dados obtidos a partir da avaliação dos prontuários dos pacientes EBV-positivos. A maioria foi diagnosticado com meningite (bacteriana e viral), bronquiolite e febre não especificada. ....	42
Figura 13. Resultado da análise líquórica da paciente 877. Foram feitas duas coletas de LCR da paciente, uma em 7/05/2018 e outra 14/05/2018. ....	45
Figura 14. Comparação da análise bioquímica e de celularidade do LCR de pacientes com meningite bacteriana e viral, respectivamente.....	49

Figura 15. Resultado da análise líquórica da paciente 654. Foram realizadas duas coletas de LCR da paciente, a primeira em 30/05/2016 e a outra 13/06/2016. Observa-se uma alteração significativa no leucograma da paciente. ....50

## ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Neuroinfecções causadas por herpesvírus. Fonte: Sejvar, 2014. ....	15
Tabela 2. Tipos de latência de Epstein-Barr .....	22
Tabela 3. Sequências utilizadas como banco de dados para as análises do sequenciamento .....	38
Tabela 4. Sexo, idade, distribuição geográfica e óbitos dos pacientes EBV Negativos .....	39
Tabela 5. Sexo, idade, distribuição geográfica e óbitos dos pacientes com resultado inconclusivo .....	40
Tabela 6. Sexo, idade, distribuição geográfica e óbitos dos pacientes EBV Positivos .....	40
Tabela 7. Dados referentes a avaliação do LCR do paciente 854.....	44
Tabela 8. Dados referentes a avaliação do LCR do paciente 878.....	46

## **INTRODUÇÃO**

### **1. Infecções virais do sistema nervoso central (SNC)**

O sistema nervoso central (SNC) é sede de infecção para diversos agentes, dentre eles os vírus. Infecções no SNC não ocorrem com facilidade, pois o cérebro apresenta uma proteção física que é a barreira hematoencefálica e o sistema imune, por isso a maioria das infecções sistêmicas não envolvem o SNC (Sejvar, 2014).

Não há restrições de hospedeiros nas neuroinfecções virais, entretanto, crianças até 5 anos de idade e imunocomprometidos compõem o grupo de risco mais propenso à desenvolver doenças no SNC. Em recém-nascidos e crianças os sintomas são inespecíficos e iniciam com febre e, não indicam de imediato, se tratar de uma infecção viral no SNC (CDC, 2016).

### **2. Meningoencefalites**

A resposta inflamatória de neuroinfecções pode levar a quadros de encefalites, meningites ou meningoencefalites (Koyuncu & Hogue, 2013).

Encefalite é definida como uma condição inflamatória do parênquima cerebral e os sinais clínicos mais comuns são dores de cabeça, confusão mental e convulsões. Em análises laboratoriais de líquido cefalorraquidiano (LCR) constata-se aumento nos níveis proteicos. As causas mais comuns de encefalites assépticas são virais (Sejvar, 2014; Klemola, et al., 1965; Pönkä & Pettersson, 1982; Ongrádi, Ablashi, Yoshikawa, Sterez, & Ogata, 2017).

A meningite é uma inflamação do tecido que recobre o cérebro e a medula espinhal (as meninges) e é mais frequente do que a encefalite (Sejvar, 2014). Meningites virais (também classificada como meningite asséptica) são menos graves do que meningites bacterianas e geralmente o quadro de recuperação (sem necessidade de tratamento) ocorre em torno de 7 a 10 dias (Sejvar, 2014; CDC, 2016; Pönkä & Pettersson, 1982). Os sintomas mais comuns em bebês são: febre, irritabilidade, dificuldade para se alimentar, letargia e problemas para dormir. Em adultos, além dos sintomas supracitados, acrescentem-se as dores de cabeça, vômito, sensibilidade à luz e falta de apetite (CDC, 2016; Sejvar, 2014).

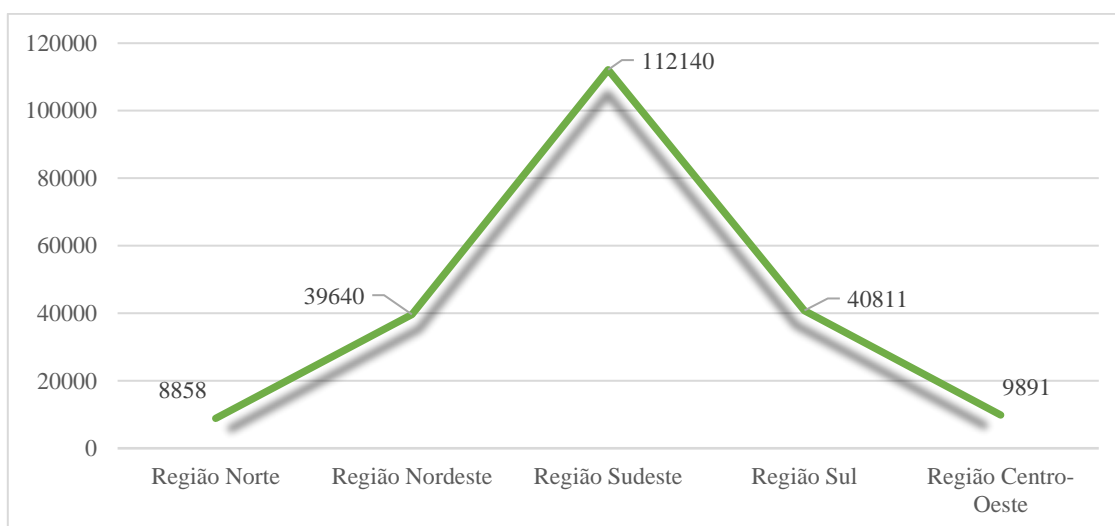
O que difere as encefalites das meningites é o comprometimento sensorial em curto prazo, os quadros variam de breves confusões mentais ao delírio, torpor e coma.

Quando as infecções virais afetam tanto as meninges quanto o cérebro, nestes casos o quadro é chamado de meningoencefalite (Sejvar, 2014; Ongrádi, Ablashi, Yoshikawa, Sterez, & Ogata, 2017)

### 3. Epidemiologia

Estudos epidemiológicos das décadas de 60 a 90 estimavam cerca de 7 casos a cada 100.000 pessoas/ano para encefalites e meningites assépticas (Sejvar, 2014; Klemola, et al., 1965; Pönkä & Pettersson, 1982). A incidência de meningite viral nos Estados Unidos varia, ao longo dos anos, dependendo da idade e histórico de vacinação da população, podendo chegar em até 17 casos a cada 100.000 habitantes (McGill & Griffiths, 2017; Khetsuriani & Quiroz, 2003).

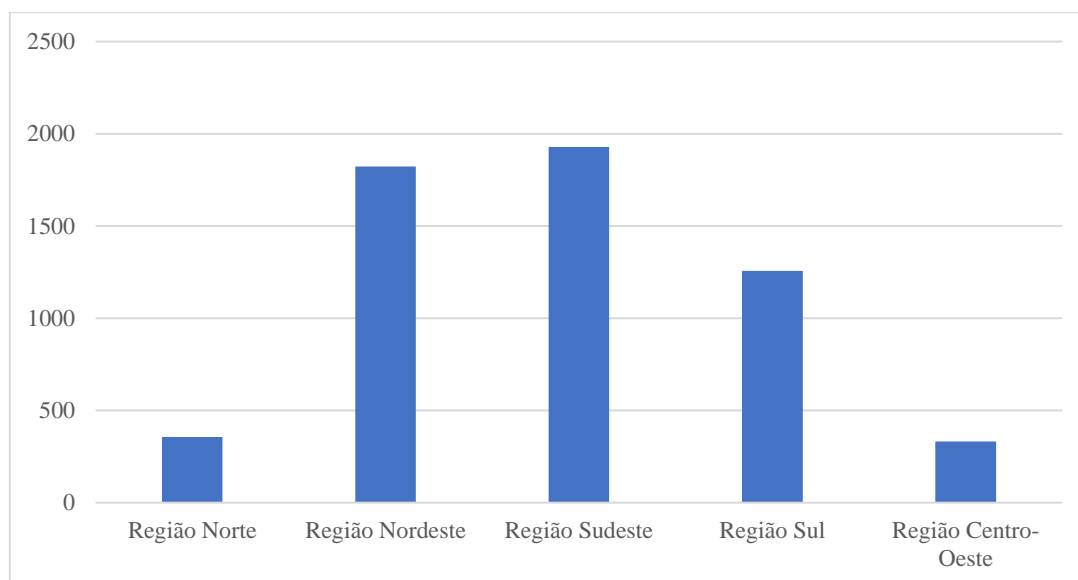
De acordo com os dados divulgados pelo DATASUS do Ministério da Saúde/SVS – Sistema de Informações de Agravos de Notificação – Sinan Net, entre os anos de 2008 a 2018 foram registradas mais de 210 mil casos de meningite no Brasil (**Figura 1**), sendo que 56% dos casos registrados foram em crianças de até 14 anos de idade.



**Figura 1.** Casos registrados como meningites no Brasil em um período de 10 anos. Fonte: DATASUS.

As encefalites são menos frequentes que as meningites, de acordo com o CDC – *Center for Disease Control and Prevention* – a cada ano, nos Estados Unidos, são registrados entre 1.000 a 5.000 novos casos de encefalites virais em média. No Brasil, o DATASUS registrou um pouco mais de 16 mil casos de encefalites virais de 2008 a 2018.

Nos últimos 5 anos (2015 a 2019), de acordo com as informações divulgadas pelo DATASUS já foram registrados 21.884 casos de meningites e encefalites virais (**Figura 2**), sendo que 52% eram crianças de até 14 anos de idade. No período entre agosto/2018 e agosto/2019 foram notificados 5.696 casos.



**Figura 2.** Casos de meningites e encefalites virais registrados no Brasil entre agosto/2018 e agosto/2019. Fonte: DATASUS.

#### 4. Agentes etiológicos

Os agentes etiológicos das infecções virais do SNC são principalmente os herpesvírus, arbovírus, coxsackievírus, ecovírus e enterovírus (CDC, 2016).

Os enterovírus não-pólio são os agentes mais comuns de meningites no mundo, mas nem todos os indivíduos que contraem enterovírus desenvolvem meningite. Em geral o quadro apresenta melhora sem uso de medicamentos (CDC, 2016; Sejvar, 2014). Doenças conhecidas como ‘doença mão-pé-boca’ em crianças causadas por enterovírus podem levar à complicações neurológicas (McGill & Griffiths, 2017; Ooi, et al., 2007).

Dentre os arbovírus causadores de meningite ou encefalite podem ser citados: West Nile virus, dengue virus, yellow fever virus, Zika virus (McGill & Griffiths, 2017). Os casos mais comuns de encefalite virais são endêmicos. Os arbovírus são transmitidos por vetores artrópodes e são causadores de doenças endêmicas com surtos periódicos (Sejvar, 2014; Gubler, 2001). Encefalites causadas por arbovírus podem deixar sequelas graves como demência e convulsões (Araújo, 2010).

Nos casos de infecções por herpesvírus e influenza a administração de antivirais é recomendada (CDC, 2016; Sejvar, 2014). As neuroinfecções herpéticas são as mais comuns detectadas entre a população, principalmente a meningite causada por human alphaherpesvirus 1 (HHV-1), human alphaherpesvirus 2 (HHV-2) e human alphaherpesvirus 3 (HHV-3). Os indivíduos que sobrevivem à encefalite herpética podem desenvolver danos motores, epilepsia ou distúrbios de comportamento (Araújo, 2010). Nas encefalites causadas por herpesvírus, se não tratadas, o índice de mortalidade é em torno de 70% (Chadwick, 2005; McGill & Griffiths, 2017).

## 5. Meningoencefalites causadas por herpesvírus

Os herpesvírus HHV-1, HHV-2 e HHV-3 são os agentes etiológicos mais frequentes nos casos de encefalite viral (**Tabela 1**) (Sejvar, 2014).

**Tabela 1. Neuroinfecções causadas por herpesvírus.** Fonte: Sejvar, 2014.

VÍRUS	DISTRIBUIÇÃO PADRÃO EPIDEMIOLÓGICO	MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS NEUROLÓGICAS
human alphaherpesvirus 1 e 2	Mundial / Esporádico	Causa mais comum de encefalites e meningites assépticas.
human alphaherpesvirus 3	Mundial / Endêmico	Pode causar meningite e encefalite; associado a artrite granulomatosa; reativação (pós-latência) pode levar a ganglionite e radiculite.
human gammaherpesvirus 4	Mundial / Esporádico	Causas ocasionais de meningite e encefalite; associações com síndrome GB e linfoma primário do SNC.
human betaherpesvirus 5	Mundial / Esporádico	Manifestações neurológicas graves: desordens congênitas, meningite, encefalite, associação com a síndrome GB <sup>1</sup> e imunossupressão.
human betaherpesvirus 6 e 7	Mundial / Esporádico	Causa ocasional de encefalites, particularmente em imunodeprimidos.

Encefalites por HHV-1 ocorrem mundialmente esporadicamente e a transmissão viral se dá por contato direto (Sejvar, 2014). Human gammaherpesvirus 4 (Epstein-Barr vírus ou EBV), human betaherpesvirus 5 (Citomegalovírus ou CMV), HHV-3 e human betaherpesvirus 6 (HHV-6) são associados à meningoencefalites em pacientes imunocomprometidos. (S., F., J., & M., 2015; Asano, et al., 1992; Chadwick, 2005). Citomegalovírus está associado também a casos crônicos de meningoencefalites em pacientes portadores do human immunodeficiency virus 1 (HIV) em estágio avançado (Chadwick, 2005). EBV é frequentemente detectado em casos de coinfeção no SNC, este fato é associado ao aumento da resposta inflamatória e o vírus é capaz de se multiplicar ativamente durante a coinfeção (Weinberg, Bloch, Li, & Tang, 2005).

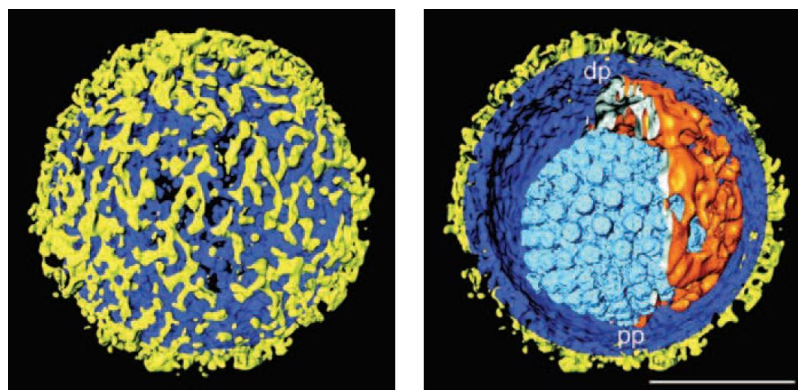
<sup>1</sup> Síndrome *Guillain-Barré*

Vírus linfotrópicos, principalmente os herpesvírus, podem causar o que é chamado de meningite linfocítica recorrente (meningite de Mollaret). Dos pacientes acometidos com meningite herpética, 1/3 relatam repetitividade do quadro (McGill & Griffiths, 2017). A meningite recorrente de Mollaret foi descrita pela primeira vez em 1944 pelo autor cujo nome batizou a síndrome. É caracterizada por 3 a 10 episódios de febre e meningismo com duração de 2 a 5 dias, seguido por recuperação espontânea. No LCR ocorre pleocitose linfocítica, elevação média das proteínas e níveis normais de glicose (Shalabi & Whitley, 2006; SAINT-MARTIN, et al., 1982).

## 6. Família Herpesviridae

A família *Herpesviridae* pertence a ordem *Herpesvirales*, e apresenta 3 subfamílias: *Alphaherpesvirinae*, *Betaherpesvirinae* e *Gammaherpesvirinae* (ICTV, 2020). São vírus de DNA fita-dupla de forma toroidal com nucleocapsídeo de simetria icosaédrica contendo 162 capsômeros. O capsídeo é envolto de um tegumento proteico e amorfo seguido pelo envelope composto de poliaminas, lipídios e espículas de glicoproteínas que conferem propriedades virais distintas e fornece antígenos para resposta do hospedeiro (Figura 3) (Pellet & Roizman, 2013; Steiner, Kennedy, & Pachner, 2007).

A divisão das subfamílias de Herpesvirinae é baseado em propriedades biológicas e nas espécies que infecta. A sub-família *Alphaherpesvirinae* é uma subfamília com vírus que infectam vários hospedeiros, a infecção primária é aguda e o vírus entra em latência nos gânglios sensoriais. Alguns dos vírus mais conhecidos são neurotrópicos: HHV-1, HHV-2 e HHV-3 (Varicela-Zoster vírus) (ICTV, 2020).



**Figura 3.** Envelope e visão interna do nucleocapsídeo de herpesvírus. Diagrama mostrando a estrutura do nucleocapsídeo onde em azul claro está o nucleocapsídeo de aproximadamente 125nm envolto pelo tegumento amorfo (laranja) e o envelope (azul escuro) com espículas glicoproteicas (em amarelo). Fonte: Pellet & Roizman, 2013.



Membros da subfamília Betaherpesvirinae apresentam uma faixa restrita de hospedeiros, seus principais representantes são os HHV-5 ou citomegalovírus, HHV-6 e HHV-7. A subfamília Gammaherpesvirinae é composta por vírus linfotrópicos, seus representantes são: HHV-4 (Epstein-Barr vírus, EBV) e human gammaherpesvirus 8 (HHV-8), são vírus cujo o estado de latência ocorre em tecido linfoide, diferentemente dos vírus neurotrópicos nos quais a latência é nos gânglios (Lussignol & Esclatine, 2017; ICTV, 2020).

Dentre os herpesvírus os que são neurotrópicos podem ser divididos em dois grupos: vírus oportunistas que acidentalmente infectam o sistema nervoso (EBV e HHV-6, por exemplo) e vírus que têm tropismo para as células nervosas (HHV-1 e HHV-2, HHV-3, por exemplo) (Koyuncu & Hogue, 2013). EBV tem tropismo por linfócitos B que podem migrar para o SNC (Tselis, b, 2014). HHV-6 é pleiotrópico (infecta vários tipos celulares) pois se liga ao receptor CD46 (presente em todas as células humanas), embora seja considerado um vírus neurotrópico oportunista (Hill & Venna, 2014).

## **7. Epstein-Barr (EBV)**

EBV pertence ao gênero *Lymphocryptovirus* da subfamília *Gammaherpesvirinae* e é o agente etiológico da mononucleose infecciosa e também é associado ao linfoma de Burkitt.

A transmissão de EBV geralmente é pela saliva. A soroconversão de EBV pode ocorrer de forma assintomática ou apresentar manifestações clínicas graves com o desenvolvimento da Mononucleose Infecciosa (MI). A mononucleose infecciosa é uma doença auto limitada e pode levar a sintomas como febre, fadiga, linfadenopatia, tonsilite e esplenomegalia (Sharon L. Silins, 2001; Tselis, b, 2014). A infecção assintomática geralmente ocorre na primeira infância sem linfocitose significativa (Sharon L. Silins, 2001). Na maioria dos casos a recuperação não deixa sequelas e muitas vezes pode estar correlacionado à infecção primária do vírus (Mathur, Muchantef, & Sze, 2014; Villo & O'Brien, 2018; Mathew & Parvez, 2013). O vírus persiste ao longo da vida adulta do indivíduo em estado de latência nos linfócitos B (Niesters, et al., 2000; LUPTON & LEVINE, 1985).

Apenas 5% dos casos evoluem para neuroinfecções (Tselis, b, 2014). A maioria dos quadros de infecção no SNC por EBV são relacionados a reativação do vírus

(Hatanpaa & Kim, 2014). Encefalite causada por EBV na infância é uma complicação grave da infecção causada pelo vírus. As crianças e jovens adultos compõem o grupo de risco. Além dos sintomas clássicos da mononucleose infecciosa o paciente pode apresentar febre, dores de cabeça, alterações da consciência, convulsões e indução de estado epiléptico. Pode ocorrer também a síndrome chamada ‘Alice no país das maravilhas’ que causa oscilações de personalidade, ilusão e metamorfopsia (alucinações de tamanho/espço/forma), encefalopatia difusa, ataxia, e em casos mais graves o paciente pode ir à coma. Geralmente, associada a encefalite o paciente pode apresentar mielite transversa (afetando a locomoção e a realização de movimentos do paciente) (Bonthius & James F. Bale, 2008).

### 7.1. Características do EBV e ciclo de multiplicação

O genoma de EBV tem 172kb e codifica por volta de 100 proteínas. A partícula viral tem em torno de 180 a 200nm de diâmetro (Portegies & Corssmit, 2000). A organização do genoma é similar aos demais herpesvírus compostos pelas regiões US (*Unique Short*) e UL (*Unique Long*) separados por segmentos repetitivos (IRs) (**Figura 4**). Os genes de EBV são separados em dois grandes grupos: genes de latência e genes do ciclo lítico (Tselis, b, 2014; Kieff, et al., 1982).



**Figura 4.** Diagrama representativo do genoma do vírus Epstein-Barr. O genoma linear de DNA dupla fita de EBV é dividido em duas regiões principais a US (em azul, Unique short) e a região UL (em rosa, Unique long). A região longa (UL) de EBV é subdividida por regiões repetitivas internas (em laranja, IR1-4). Nas extremidades do genoma são apresentadas repetições terminais (em verde, TR1 e TR2).

O ciclo de herpesvírus apresenta duas fases distintas: fase lítica e fase latente. Inicialmente a partícula viral se adsorve à superfície celular do hospedeiro e penetra a célula através da fusão de seu envelope com a membrana plasmática ou por endocitose (Pellet & Roizman, 2013; Lussignol & Esclatine, 2017; Koyuncu & Hogue, 2013). A entrada de EBV em células B ou células epiteliais é atribuída a 8 glicoproteínas (Swaminathan & Kenney, 2009).

EBV infecta células B da cavidade oral, e por hiperestimulação começam a multiplicar e diferenciar em células B de memória que enviam um sinal às células T que produzem o ligante CD40L que previne as células B da apoptose. O vírus se liga na

superfície das células B à proteína viral gp350/220 ao receptor CR2 (CD21) (Kristine Niss Arfelt, 2015; Tselis, b, 2014). O vírus utiliza a maquinaria da própria célula para maturação das mesmas, este processo costuma se desenvolver nas amígdalas (Tselis, b, 2014). A versatilidade do vírus em interagir com as células do sistema imune resulta em imunossupressão. O endotélio funciona como um reservatório de vírus que infectam os leucócitos circulantes, que pode dar seguimento à uma viremia que, por sua vez, pode estender a infecção para o sistema nervoso central (Tselis, a, 2014).

A transcrição e a multiplicação ocorrem no núcleo, bem como a montagem inicial do nucleocapsídeo. A multiplicação é detectada com 12h-24h após a infecção (Lussignol & Esclatine, 2017; Vancíková & Dvorák, 2001; Koyuncu & Hogue, 2013). Herpesvírus utilizam a DNA polimerase da célula hospedeira para transcrever o genoma viral em mRNA, iniciando uma cascata transcricional: a fita de mRNA é transcrita e encaminhada para o citosol onde ocorre a cascata transcricional (Lussignol & Esclatine, 2017; Vancíková & Dvorák, 2001; Tselis, a, 2014).

Os primeiros genes transcritos do ciclo lítico são os imediatamente precoces (IE, *immediate-early proteins*), a transcrição é ativada pelas proteínas do tegumento viral; estes genes são transcritos na presença de inibidores da replicação de DNA. Como uma cascata, a transcrição das proteínas IE ativa a transcrição das proteínas precoces (E, *early proteins*); as proteínas precoces mediam a replicação do DNA viral. A replicação de DNA ocorre pelo mecanismo círculo-rolante. Seguido da replicação de DNA viral são transcritas as proteínas tardias (L, *late proteins*) que codificam proteínas estruturais (como por exemplo as glicoproteínas gp350/220) e permitem a formação do capsídeo e de vírions (Swaminathan & Kenney, 2009).

A glicoproteína gp350/220 é uma das mais abundantes no envelope viral (Johannsen, et al., 2004) que é responsável pela adsorção do vírus nas células B (ocorre ligação com o receptor do tipo 2 – CR2). A gp350/220 é uma proteína de membrana glicosilada, que, como resultado de um *splicing* alternativo pode apresentar duas formas: com massa de 350 ou 220kDa. A ligação de gp350 ao receptor CR2 da célula ativa a penetração viral por endocitose (Hutt-Fletcher, 2007; Swaminathan & Kenney, 2009).

Durante o processo de formação do vírus ocorrem duas etapas de envelopamento. A primeira é durante a travessia do nucleocapsídeo pela membrana nuclear, seguido por

um desenvolvimento, aquisição das proteínas do tegumento e então ocorre a segunda etapa de envelopamento na travessia trans-Golgi ou pela membrana plasmática, no momento de liberação do vírus (Swaminathan & Kenney, 2009; Lussignol & Esclatine, 2017; Vancíková & Dvorák, 2001).

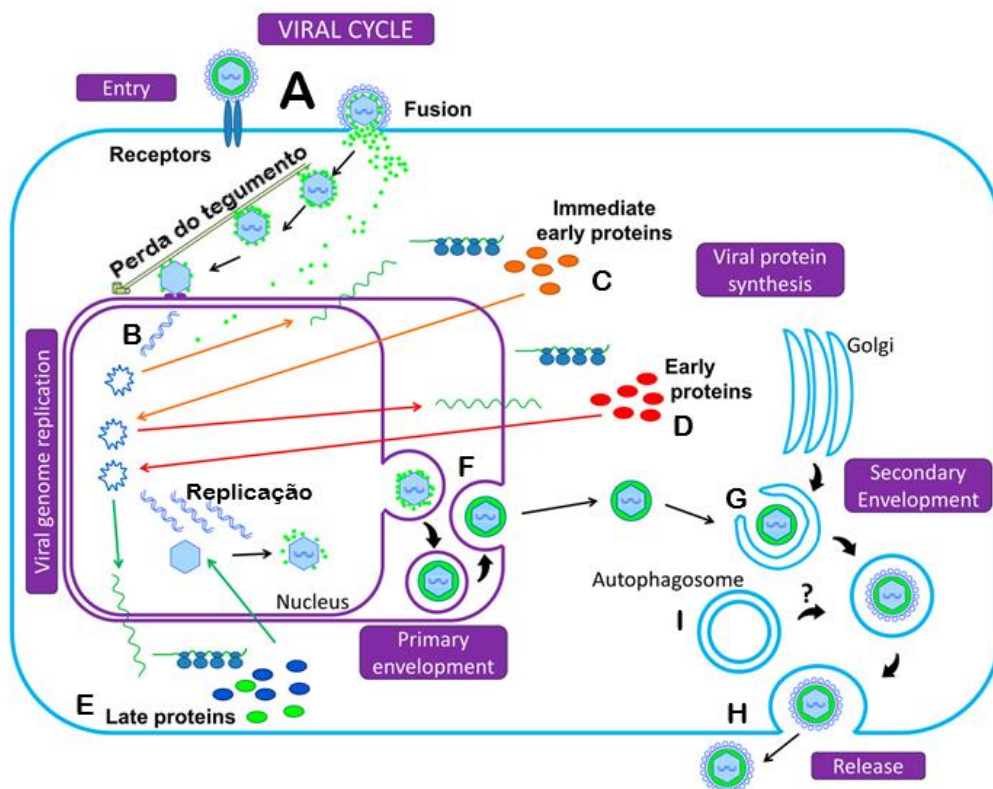
Por fim, a partícula viral é liberada extracelularmente pela fusão da vesícula de Golgi com a membrana plasmática da célula (Lussignol & Esclatine, 2017; Owen, Crump, & Graham, 2015; Tandon & Mocarski, 2012; Vancíková & Dvorák, 2001).

Estudos indicam que os herpesvírus são capazes de promover uma subversão de autofagia no processo de aquisição final do envelope (**Fig 5. – I**) (Lussignol & Esclatine, 2017; Nowag, et al., 2014). Autofagia está envolvida nas respostas inata e adaptativa como um mecanismo antiviral, entretanto os herpesvírus codificam proteínas que contra-atacam este processo. Os vírus exploram este mecanismo a seu favor, durante a multiplicação viral ou para auxiliar sua persistência durante o estado de latência. Alguns herpesvírus conseguem bloquear a degradação do lisossomo e por consequência bloqueia a autofagia e utilizam as membranas autofágicas para montar e liberar novas partículas virais (Lussignol & Esclatine, 2017; Pujals, et al., 2015; Koyuncu & Hogue, 2013).

O genoma linear de EBV circulariza após a infecção e mantém-se no núcleo da célula infectada (período de latência) como se fosse um plasmídeo, na forma episomal (número de cópias entre 5 a 500) (MIDDLETON & SUGDEN, 1992).

Durante a fase lítica de EBV ocorre a produção de partículas virais e permite a proliferação do vírus e sua transmissão entre células e entre hospedeiros (**Figura 5**). Devido a citotoxicidade das células T – que respondem diretamente contra proteínas virais do ciclo lítico - há uma certa dificuldade na detecção de células EBV-positivas que estejam na fase lítica (Swaminathan & Kenney, 2009).

Aciclovir e Ganciclovir são anti-virais comumente usados e seu princípio de atuação é a inibição da replicação lítica de EBV (reduz os riscos de proliferação) (Swaminathan & Kenney, 2009).



**Figura 5.** Esquema representativo do ciclo de multiplicação de herpesvírus. Adsorção da partícula viral na superfície celular do hospedeiro e penetração viral (A). O capsídeo é conduzido até o poro nuclear para liberação do DNA no núcleo (B). Cascata transcricional: proteínas imediatamente precoces, precoces e tardias (C, D e E). Replicação do genoma e montagem do nucleocapsídeo para liberação no citoplasma com formação de envelope primário (F). Compartimentalização dos nucleocapsídeo e formação do envelope definitivo (G). Liberação da partícula viral (H). Subversão de autofagia (I). Fonte: Lussignol & Esclatine, 2017 (Fig. Adaptada).

## 7.2. Latência de Epstein-Barr

Latência é definida pela presença de DNA viral no hospedeiro sem a produção de vírus, o genoma mantém-se na forma circular (epissoma). É um mecanismo utilizado por alguns vírus para sobreviver em condições que comprometam sua multiplicação (Caccuri, et al., 2017; Tselis, a, 2014).

A regulação da expressão do gene BZLF1 por fatores de transcrição da célula desempenham um papel na determinação do tipo de infecção de EBV (latente ou lítica), o estímulo da produção de BZLF1 é o gatilho para reativação do ciclo de infecção lítica (Swaminathan & Kenney, 2009).

Durante a latência o vírus expressa 6 antígenos nucleares codificados (EBNA 1-6, em inglês: *EBV-encoded nuclear antigens*), 3 proteínas latentes de membrana (LMPs), dois RNAs não-codificantes (EBER-1 e -2), sRNAs e miRNAs (Lussignol & Esclatine, 2017; Austin, Flemington, Yandava, Strominger, & Speck, 1988; Tselis, b, 2014).

Para EBV existem quatro fenótipos de latência (0, I, II e III) que diferem em quais proteínas de latência são expressas e as possíveis combinações de fenótipos (**Tabela 2**). EBNA-1 está presente no núcleo de todas as células infectadas por EBV, sua expressão é regulada pelo ciclo celular (Lussignol & Esclatine, 2017; Lee & Sugden, 2008; LUPTON & LEVINE, 1985; Humme, et al., 2003).

O antígeno LMP-1 (proteína latente de Epstein-Barr) é análogo ao CD40L e durante a latência induz a sobrevivência das células B. Os linfócitos B proliferam e diferenciam-se em células de memória (Kaykas, Worringer, & Sugden, 2001). Durante a latência EBV provoca a imortalização, proliferação, ativação e infiltração dos linfócitos infectados nos tecidos sistêmicos (Tselis, b, 2014).

**Tabela 2. Tipos de latência de Epstein-Barr**

TIPO DE LATÊNCIA	GENES TRANSCRITOS	OCORRÊNCIA
<b>0</b>	EBERs	Células B de memória
<b>I</b>	EBERs + EBNA-1	Linfoma de Burkitt e carcinomas
<b>II</b>	EBERs + EBNA-1 + LMP-1 + LMP-2	Linfoma Hodgkin e outros linfomas
<b>III</b>	EBERs + EBNA-1 + EBNA-2 + EBNA-3 + EBNA-LP + LMP-1 + LMP-2	Células blastoides

Herpesvírus têm a capacidade de estabelecer latência em diferentes tipos celulares e persistir durante a vida toda do hospedeiro. As células mieloides, células tronco CD34+, monócitos CD14+ e órgãos parenquimais transplantados provenientes de doadores soropositivos são reservatórios virais (Lussignol & Esclatine, 2017; Steiner, Kennedy, & Pachner, 2007; Dupont & Reeves, 2016; Knipe & Cliffe, 2008; Tselis, a, 2014). A latência é uma forma pela qual os herpesvírus evitam reconhecimento pelo sistema imune. ref

EBNA-1 é importante para o estabelecimento da infecção latente em células proliferativas (LEE, DIAMOND, & YATES, 1999). O epissoma de EBV replica um por célula, em sincronia com o genoma do hospedeiro (Humme, et al., 2003). EBNA-1 é uma fosfoproteína que se liga na extremidade C-terminal do DNA da célula hospedeira, envolvida no processo de ativação transcricional, replicação do DNA e manutenção do plasmídeo e sobrevivência da célula hospedeira (LUPTON & LEVINE, 1985; Humme, et al., 2003; Lu, et al., 2010).

A regulação da autofagia permite ao herpesvírus de manter-se em latência e estender a sobrevivência celular por meio de atividades anti-apoptóticas. HHV-1 expressa

um dos programas de latência mais simples, os genes LAT. Os gamaherpesvírus estabelecem latência em tecido linfoide. EBV, além da expressão dos genes latentes, o vírus regula a proliferação celular (Lussignol & Esclatine, 2017; Pujals, et al., 2015; Vancíková & Dvorák, 2001).

#### **8. Rotas de entradas pelo SNC e latência de herpesvírus linfotrópicos em células nervosas**

Os vírus utilizam diversas rotas de entrada no SNC (Chadwick, 2005). As infecções no SNC podem ser originárias de infecções no sistema nervoso periférico (SNP) ou células do sistema circulatório que podem atravessar a barreira hematoencefálica e alcançar o SNC (Koyuncu & Hogue, 2013). Os herpesvírus infectam o endotélio microvascular cerebral em condições de imunossupressão (Koyuncu & Hogue, 2013).

EBV é associado a uma gama de doenças neurológicas como por exemplo esclerose múltipla, Alzheimer, ataxia cerebelar, linfoma do SNC, síndrome de Guillain-Barré, meningoencefalites e outros. Os indícios dessa associação é devido ao comprometimento do LCR pela infecção do vírus (Jha, et al., 2016). Em estudos feitos na detecção de EBV em pacientes com esclerose múltipla, foram analisados por qPCR o tecido cerebral de pacientes e 35% dos pacientes foram EBV positivos. Este estudo reforça a capacidade do vírus infectar o SNC (Hassani, Corboy, Al-Salam, & Khan, 2018).

Herpesvírus são capazes de infectar neurônios e penetram a membrana celular axonal por endocitose. A disseminação viral geralmente ocorre entre neurônios conectados, através de sinapses neuroquímicas ou contato célula-célula (Koyuncu & Hogue, 2013). Os vírus também podem ser carregados por linfócitos infectados e atravessar a barreira hematoencefálica do cérebro e disseminar para o espaço subaracnoide provocando meningite ou podem infectar o tecido nervoso e gânglios diretamente através dos leucócitos. (Chadwick, 2005; Hatanpaa & Kim, 2014). Os linfócitos infectados podem acessar o sistema nervoso pelos vasos parenquimais e alcançar o fluído cerebrospinal e se acumular no SNC. A resposta inflamatória aumenta a permeabilidade da barreira hematoencefálica e a circulação de imunoglobulinas; os vírus, por sua vez, conseguem evadir da resposta imune e atravessar a membrana (Chadwick, 2005).

Os astrócitos são as células em maior número no cérebro e desempenha diversas funções importantes. O receptor CR2 (CD21), presente nos astrócitos, é o principal receptor para EBV (onde se liga a glicoproteína viral gp350/220), facilitando a penetração do vírus nas células nervosas. O receptor CR2 é uma glicoproteína de 145 kDa descrita inicialmente como receptor C3d componente do complemento expresso em linfócitos B (Akhtar, Vranic, Cyprian, & Moustafa, 2018; Menet, et al., 1999). Os sítios de ligação de EBV e C3d contém duas sequências amino-terminal consenso repetitivas (SCR – *short consensus repeats*). Um receptor CR2 truncado composto por dois SCR, transmembrana e a região introcitoplasmática é suficiente para mediar a adsorção e multiplicação de EBV. A funcionalidade do receptor CR2 foi avaliada pela especificidade de ligação com C3d e gp350 comprovando que astrócitos humanos e fetais podem interagir com o vírus Epstein-Barr (Akhtar, Vranic, Cyprian, & Moustafa, 2018; Menet, et al., 1999).

A recém descoberta de vasos linfáticos meníngeos representam uma nova possibilidade de rota de infecção viral. O mau funcionamento dos vasos linfáticos cerebrais poderia ser a causa de uma variedade de doenças neurológicas (Louveau, et al., 2015).

## **9. Diagnósticos de infecções virais no SNC**

O isolamento em cultura de células e tecidos e os testes sorológicos foram considerados por muito tempo como padrão-ouro no diagnóstico de infecções virais. Entretanto, diversos obstáculos no desenvolvimento das técnicas (tempo de detecção, por exemplo), podem retardar o diagnóstico e afetar o tratamento dos pacientes (Peaper & Landry, 2014; Mortimer, 2009; Prince, Calma, Pham, & Seaton, 2009; Chadwick, 2005).

Em encefalites causadas por herpesvírus o diagnóstico de imagem é muito importante (Mathur, Muchantef, & Sze, 2014; Baringer, 2008). Exames como eletroencefalograma (EEG), ressonância magnética (RM) e tomografia computadorizada (TC) também auxiliam na confirmação do diagnóstico (Mathur, Muchantef, & Sze, 2014). Os exames de imagem auxiliam principalmente no diagnóstico de neuroinfecções no SNC em pacientes pediátricos. Em pacientes neonatal com suspeita de encefalite herpética são indicados a RM ao invés da TC. Nestes casos a RM acusa hiperintensidades no lobo temporal medial, na região orbitofrontal e no girus cingulado. Anormalidades também podem ser observadas como edema cerebral, hérnias. Em crianças com mielite



viral as anormalidades estão presentes na medula espinhal, como por exemplo: atrofia, edemas e lesões que podem vir a causar hemorragias (Bonthius & James F. Bale, 2008).

A punção lombar também é necessária para distinguir entre meningite bacteriana ou viral. A análise do LCR é criteriosa e quantitativa, são avaliados perfil de celularidade, dose de proteínas glicóricas, glicose, e eventualmente é associado ao diagnóstico molecular e isolamento do agente etiológico (McGill & Griffiths, 2017). Nos casos de meningite ou encefalite viral, nas análises do LCR são observados tipicamente: pleocitose linfocítica (5 a 500 células/mL), moderada elevação de proteínas (50 a 200mg/dL) e níveis normais de glicose no LCR. Embora, o líquido sem alterações também não exclui o diagnóstico de infecção viral (Bonthius & James F. Bale, 2008).

A PCR (*Polymerase Chain Reaction*) é altamente recomendada por sua alta sensibilidade de detecção logo nos períodos iniciais da infecção, aumentando as chances de tratamento. Métodos moleculares revolucionaram o diagnóstico viral. Hoje a padronização da PCR de amostras de LCR substitui técnicas mais invasivas como por exemplo, biópsias de tecido cerebral (Peaper & Landry, 2014; Rowley, Whitley, Lakeman, & Wolinsky, 1990). A detecção por PCR é o método mais sensível e não permite só o diagnóstico, mas também, acompanhar a evolução da doença e do tratamento e atualmente é indicada como metodologia padrão-ouro no diagnóstico das neuroinfecções virais (McGill & Griffiths, 2017; Vancíková & Dvorák, 2001). A análise do LCR por PCR em casos de suspeita de encefalite herpética é de 75% de sensibilidade em neonatos, e 95% em crianças e adolescentes (Bonthius & James F. Bale, 2008).

## JUSTIFICATIVA

Para o diagnóstico de meningoencefalites virais quanto menos invasivo e mais rápida a detecção do agente etiológico melhor e mais eficaz será o tratamento do paciente. A detecção do agente etiológico viral responsável pelo quadro clínico permite um tratamento direto e específico para cada paciente, aumentando as expectativas de recuperação e redução de sequelas (McGill & Griffiths, 2017). Nos últimos dois anos (set/2019 – set/2017) foram registrados 445 óbitos dentre mais de 10 mil casos de meningites e encefalites virais no Brasil. Sendo que um pouco mais de 50% dos casos foram crianças de até 14 anos de idade (DATASUS, 2019).

O progresso no campo de diagnóstico viral é rápido, com as diferentes metodologias e descobertas de novos vírus e terapias, faz-se necessário a intercomunicação entre pesquisadores e médicos na busca da otimização do diagnóstico, com metodologias menos invasivas aos pacientes e obtenção de resultados mais sensíveis e a curto prazo (Peaper & Landry, 2014). Tem se tornado frequente a inclusão de testes para detecção de EBV para o diagnóstico e análise de LCR (McGill & Griffiths, 2017).

Se não tratadas corretamente, meningites e encefalites virais podem deixar sequelas como declínio cognitivo e intelectual, distúrbios de personalidade, surdez, convulsões, além de perdas motoras e sensoriais, síndromes amnésicas e pode desencadear epilepsia (Hokkanen & Laune, 2007; Oliveira, Madeira, & Celmer, 2015; Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo, 2006). São traumas psicológicos e orgânicos que afetam indeterminadamente a vida dos pacientes e de seus familiares.

A demanda por praticidade e eficiência no diagnóstico das neuroinfecções virais urge até no setor econômico. A admissão de um paciente no hospital gera gastos de serviços hospitalares, serviços dos profissionais de saúde, gestão e serviços gerais, gastos de internação e de AIH (autorização de internação hospitalar) dentre outros gastos comuns da rotina de um hospital. De acordo com os dados disponibilizados pelo DATASUS, entre o período de set/2019 – set/2017 o gasto total com as internações de pacientes com meningites e encefalites virais foi de R\$ 16,2 milhões e uma média de permanência de quase 9 dias no hospital.

De uma forma geral, dada a ubiquidade de EBV na população mundial e os dados descritos na literatura sobre a capacidade neurotrópica do vírus, é necessário incluir EBV nos testes de detecção e diagnóstico em casos de suspeita de neuroinfecções virais.

## **OBJETIVOS**

### **1. Objetivos Gerais**

Utilizar a técnica de qPCR para desenvolver uma plataforma de diagnóstico de meningoencefalites associadas ou causadas por EBV.

### **2. Objetivos Específicos**

- Selecionar, desenhar e avaliar a eficiência de iniciadores específicos para detecção de Epstein-Barr por qPCR;
- Aplicar a qPCR como metodologia de detecção de EBV em LCR de pacientes do Hospital Infantil João Paulo II (Belo Horizonte e região metropolitana) e do Hospital Nossa Senhora da Saúde (Vale do Jequitinhonha);
- Descrever o perfil clínico de infecção associado aos casos de pacientes EBV positivos;

## **METODOLOGIA**

### **1. Controle positivo**

As amostras clínicas positivas para EBV foram cedidas pelo setor de Pesquisa & Desenvolvimento (P&D) do Instituto Hermes Pardini, localizado na Av. das Nações, 2448 em Vespasiano, Minas Gerais. O estoque de controle positivo foi mantido à -80°C e o estoque de uso diluído em água de injeção foi mantido à -20°C.

### **2. Amostras clínicas**

As amostras clínicas de LCR foram coletadas de pacientes do Hospital Infantil João Paulo II/FEHMIG (HIJPII) da cidade de Belo Horizonte e do Hospital Nossa Senhora da Saúde (HNSS) da cidade de Diamantina, ambos localizados no estado de Minas Gerais, acompanhados dos dados prontuários de pacientes com manifestações clínicas neurológicas. O critério de coleta, preestabelecidos pelos hospitais, define que todos os pacientes que apresentam manifestações neurológicas ou febre sem foco deve ser coletado o LCR. Os médicos realizaram a coleta de uma quantidade suficiente em criotubos que foram devidamente identificados e armazenados em nitrogênio líquido no hospital até o dia que as amostras foram encaminhadas para o Laboratório de Vírus (UFMG) onde são posteriormente processadas. Os pacientes são recém-nascidos e crianças (faixa etária: 0 a 15 anos de idade). Comitê de ética: Fhemig 132/2009; CAAE: 09273012.9.0000.5149.

#### **2.1. Diluição do LCR**

Os estoques de amostras de LCR foram armazenados à -80°C. Foram produzidas alíquotas de LCR diluídas na proporção 1:10 (20µL de LCR + 180µL de água de injeção) e posteriormente, fervidas à 90°C por 10min e armazenadas no freezer a -20°C.

#### **2.2. Extração de RNA com tratamento de DNase**

A extração do RNA viral foi feita utilizando o kit de extração QIAamp Viral RNA (Qiagen, EUA) seguindo as instruções do fabricante. O RNA viral foi eluído com 60µL de tampão AVE e armazenado a -80°C. As amostras de RNA foram então submetidas ao tratamento com DNase (Promega, EUA) seguindo as instruções do protocolo produzido

pelo fabricante. O mRNA extraído serviu de molde para a síntese de cDNA e para detecção de mRNA viral por qPCR.

### 2.3. Síntese de cDNA

Para produção de DNA complementares (cDNA), cerca de 1 a 5 ug de RNA extraído foi incubado a 70°C, por 5 minutos, juntamente com iniciador randômico (*random primer*) (Invitrogen, país). Após incubação no gelo por 5 min, foram adicionados à reação inicial: 5 µL de tampão 5x (250mM Tris pH 8,; 375 mM KCl; 15mM MgCl), 1,25 µL de dinucleotídeos trifosfatados (dNTPs) (25mM) e 1 µL de transcriptase reversa M-MLV (200U) (Promega Corporation, Madison, Wisconsin, EUA) e 2,75 µL de água. As amostras foram incubadas à 37°C por 1 hora. As amostras de cDNA obtidas foram armazenadas à -20°C.

## 3. Seleção dos iniciadores

A triagem foi feita *in silico* através da revisão de literatura e ferramentas de bioinformática disponíveis em plataformas online: OligoAnalyzer 3.1, IDT – (*Integrated DNA Technologies*) e BLAST-n (*Basic Local Alignment Search Tool*), NCBI (*National Center for Biotechnology Information*).

Como critério de seleção foram avaliadas as seguintes propriedades: temperatura de *melting* ( $T_m$ ), conteúdo GC%, tamanho do iniciador, tamanho do DNA amplificado, capacidade de formação de dímeros e *hairpins* (grampos) e a especificidade de pareamento com os vírus de interesse.

Os iniciadores foram desenhados utilizando a plataforma disponível online pelo NCBI: *Primer BLAST (Primer designing tool)*. A síntese dos primers foi feita pela IDT – Síntese Biotecnologia.

### 3.1. Diluição dos iniciadores

Os iniciadores foram diluídos na concentração final de estoque de 200µM com TE 1X (Tris-HCl 1M, pH 8,0 /EDTA 0,5M pH 8,0), e a concentração final de uso de 10µM, diluídos em água para injeção.

### 3.2. Padronização da concentração dos iniciadores

Para a padronização da qPCR os iniciadores foram testados utilizando o mix comercial SYBR GREEN® PCR Master Mix (Applied Biosystems) na concentração indicada pelo fabricante.

Com o objetivo de padronizar as concentrações dos iniciadores buscando identificar padrões que mimetizem a eficiência de detecção nos LCRs, a padronização foi feita a partir da detecção de DNA e RNA (cDNA) viral (controles positivos). Como controle negativo foi utilizado água para injeção. Os testes foram feitos com Master Mix comercial SYBR Green® PCR Master Mix (Applied Biosystems). As concentrações utilizadas de iniciadores foram: 200nM, 500nM, 1µM.

### 3.3. Curva Padrão

Após a determinação concentração ideal dos iniciadores para a reação de qPCR, a sensibilidade dos mesmos foi testada a partir da construção de uma curva padronizada para cada alvo, utilizando como padrão os respectivos controles (descritos no **item 1** da Metodologia). Com a curva padrão foi avaliada a capacidade dos iniciadores em detectar diferentes concentrações de DNA (1ng, 100pg, 10pg, 1pg, 100fg e 1000fg).

### 3.4. Teste de Especificidade

A especificidade dos iniciadores foi avaliada por qPCR utilizando HHV-1/2.

## 4. Real-Time PCR (qPCR)

Os LCRs dos pacientes foram triados para EBV utilizando o sistema SYBR Green, seguindo o protocolo para cada reação: 5µL de Master Mix, 0,5µL de *primer forward*, 0,5µL de *primer reverse*, 2µL de água para injeção e 1µL de amostra (LCR). As condições utilizadas para o Master Mix comercial SYBR Green® PCR Master Mix (Applied Biosystems) foram as seguintes: desnaturação a 95°C por 10 min, seguido de 45 ciclos de 95°C por 15 seg. e 60°C por 1 min, por fim uma curva de dissociação com aquecimento de de 65 °C até 95 °C. Todas as qPCR foram feitas no termociclador StepOne® da Applied Biosystems e os dados de detecção e quantificação coletados e analisados pelo software StepOne® versão 2.3 da Applied Biosystems.

## 5. Extração de DNA do gel

Os produtos amplificados específicos de cada reação foram fracionados eletroforéticamente em gel de poliacrilamida 12% em TBE 1X (0,04M Tris-Base; 0,001M EDTA) e 1X de SYBR Safe™ (Invitrogen, EUA). O gel foi submetido à voltagem de 100V imerso em solução de TBE (Tris/Borato/EDTA). Foram aplicados 10µL do produto da reação da qPCR, misturados a 1 µL do tampão de corrida (azul de bromofenol 2,5%, TAE 10X (Tris/Acetato/EDTA) e glicerol 50%). Por meio de um transiluminador de luz UV foi possível visualizar as bandas. Um marcador de tamanho molecular para identificação do amplificado também foi aplicado, o 100 pb DNA ladder (Promega, EUA.).

As bandas de interesse amplificadas foram recortadas do gel com o auxílio de um bisturi e purificadas seguindo o protocolo pré-estabelecido no laboratório. Os fragmentos de gel foram alocados em microtubos de 0,6 mL perfurados com o auxílio de uma agulha 18G e posicionados dentro de outro microtubo de 1,5 mL; o material foi centrifugado a 18 000 g por 1 min de forma que o gel atravessasse a perfuração do microtubo menor para o microtubo maior. Foram adicionados 100µL de água para injeção no gel triturado no microtubo de 1,5 mL e o material foi mantido 24h na geladeira. No dia posterior o material foi novamente centrifugado e o sobrenadante contendo o material genético purificado foi coletado e encaminhado para sequenciamento.

## 6. Sequenciamento e alinhamento das sequências nucleotídicas

Os produtos da PCR obtidos foram sequenciados pelo método de SANGER, 1977 em sequenciador automático capilar “ABI 3730 DNA Analyzer” (Applied Biosystems), usando o kit “*BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing* (Applied Biosystems), e obedecendo as condições de reação e leitura indicadas pelo fabricante. A montagem e visualização das sequências finais foram obtidas a partir da análise dos cromatogramas, utilizando o software SeqTrace. As sequências obtidas foram comparadas com o banco de dados do GenBank, utilizando o programa BLASTn. O banco de dados para alinhamento foi montado com as sequências depositadas no GenBank. Para a criação do banco de dados foram avaliados os critérios de origem do isolamento (linfomas, carcinomas ou mononucleose infecciosa) e a geolocalização. O alinhamento das sequências de nucleotídeos e aminoácidos foi feito com o auxílio do programa MEGA 10

(Molecular Evolutionary Genetics Analysis) (TAMURA et al., 2007), utilizando-se o parâmetro Clustal W versão 1.6 (THOMPSON et al., 1994; KUMAR et al., 2004; <http://megasoftware.net>).

## 7. Cultivo celular

A linhagem de células A549 (ATCC®CCL-185™) empregada foi proveniente do banco de células do Laboratório de Vírus, do Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biológicas – Universidade Federal de Minas Gerais, Brasil.

As células foram mantidas em meio DMEM 7% SFB e antibióticos [estreptomicina (Sigma-Aldrich, EUA) 100mg/mL, fungizona (Cultilab, Brasil) 1mg/mL e penicilina (Aspen farmacêutica, Brasil)  $2,5 \times 10^5$  UI/mL].

## 8. Isolamento de EBV

Para o isolamento *in vitro* das amostras foi utilizado o LCR dos pacientes positivos para EBV em qPCR.

Placas de 24 poços foram inoculadas com a linhagem e mantidas com o meio DMEM 7% SFB e antibióticos (estreptomicina 100mg/mL, fungizona 1mg/mL e penicilina  $2,5 \times 10^5$  UI/mL). Após 24h, quando a confluência estava em 80-90% foi removido cuidadosamente com o auxílio de uma pipeta o meio antigo e então as células foram inoculadas com 200 µL de LCR diluído em meio DMEM (0% SFB). Foi feito o processo de adsorção por 1h sob agitação lenta em cruz de 10 em 10 minutos. Em seguida foi adicionado meio de cultivo com 3% de SFB e as placas foram mantidas em estufa B.O.D. à 37°C durante 6 dias com observação diária em microscópio óptico para visualização de efeito citotóxico e/ou citopático. A primeira passagem o vírus foi diluído na proporção 1:5, 1:10 e 1:100. Ao fim do experimento o sobrenadante e o pellet de células foram coletados separadamente, e desta forma foram realizadas as passagens consecutivas nas diluições de 1:10 e 1:100.

Foram realizadas 4 passagens consecutivas em placas de 24 poços para isolamento viral e foram considerados como isolamento válido apenas as amostras que apresentaram efeito citopático e confirmação de detecção de DNA genômico por qPCR.



## 9. Prontuários dos pacientes

Os prontuários com a história clínica de alguns pacientes foram cordialmente cedidos pelo Hospital Infantil João Paulo II. Foram analisados os dados de evolução do quadro dos pacientes, análise da sintomatologia, tratamento aos quais foram submetidos, e também os dados como idade, sexo, cidade de origem, foram coletados para posterior construção da análise epidemiológica.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 1. Seleção dos iniciadores

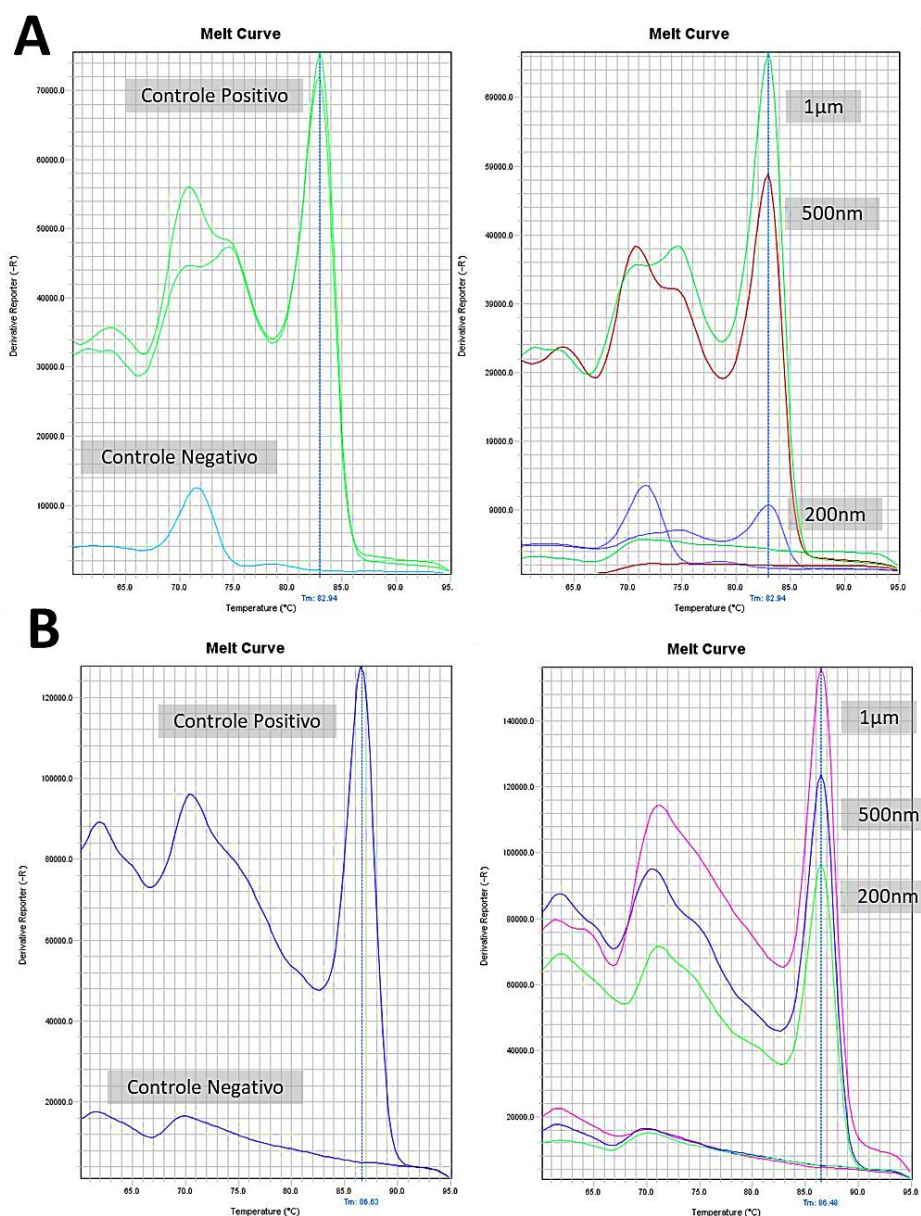
Para este estudo foram selecionado dois pares de iniciadores específicos para detectar se o vírus estava no estado latente ou no ciclo de multiplicação viral.

Os iniciadores EBNA-1 (F: GCCGGTGTGTTCGTATATGG; R: CAAAACCTCAGCAAATATATGAG) amplificam 213pb e são específicos para o gene EBNA-1 que é transcrito somente durante a latência de EBV e é transcrito em todos os programas de latência (Lay, 2010). Os iniciadores gp350 (F: AGAATCTGGGCTGGGACGTT; R: ACATGGAGCCCGGACAAGT) amplificam 203pb e são específicos para o gene que codifica a glicoproteína gp350, que por sua vez é transcrita somente durante o ciclo de multiplicação viral (quando há formação do capsídeo). Ambos os iniciadores foram testados empregando DNA e mRNA genômico (previamente tratado com DNase). Os iniciadores EBNA-1 foram baseados em (Lay, 2010) e gp350 foram projetados com o *Primer* BLAST.

O critério para determinação do diagnóstico por qPCR foi estabelecido da seguinte forma: amostras EBNA-1 DNA positivo e cDNA negativo e gp350 DNA positivo, cDNA positivo foram consideradas como resultado EBV positivo em ciclo de multiplicação viral; amostras EBNA-1 DNA positivo, cDNA positivo e gp350 DNA positivo, cDNA negativo foram consideradas EBV positivo em estado latente; e por fim, amostras EBNA-1 DNA negativo, cDNA negativo e gp350 DNA negativo e cDNA negativo foram consideradas resultado negativo para EBV.

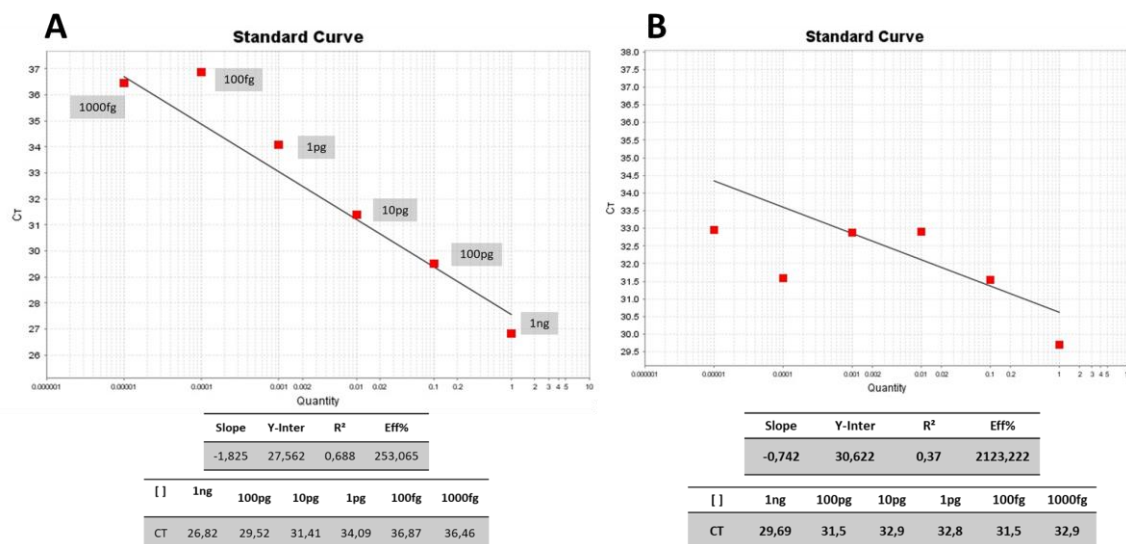
## 2. Padronização, curva padrão e teste de especificidade

A padronização da concentração ideal de uso dos iniciadores foi determinada e tanto para EBNA-1 quanto para gp350 a concentração ideal foi de de 500  $\mu$ M. Pode ser observado que para os iniciadores de EBNA-1 a amplificação ocorreu e apresentou um pico na temperatura de *melting* ( $T_m$ ) em 80-85°C (**Figura 6A**). A amplificação de DNA de amostra EBV-positivo para gp350 pode ser observada na representação da curva de amplificação apresentando um  $T_m$  em 85-90°C (**Figura 6B**).



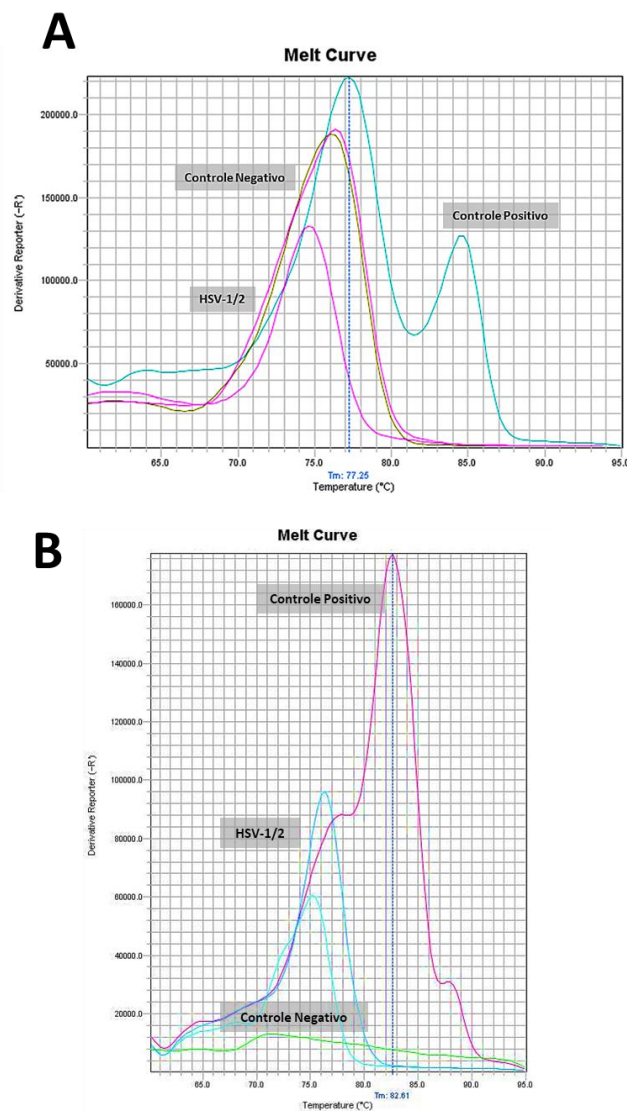
**Figura 6.** Padronização da concentração de uso dos iniciadores. Foram testados os iniciadores EBNA-1 (A) e gp350 (B) em diferentes concentrações de uso (200nm, 500nm e 1 $\mu$ m) para decidir qual, entre estas, seria utilizada durante a condução de todos os experimentos. Para ambos os iniciadores a concentração de uso definida foi 500nm.

A curva padrão de EBNA-1 indica que empregando os iniciadores selecionados a detecção de DNA amplificado ocorre com DNA na faixa de, no mínimo, entre 1 a 10pg (Figura 7).



**Figura 7.** Curva padrão de EBNA-1(A) e gp350 (B). Foi feita a curva padrão para avaliar a sensibilidade de detecção do iniciador. O controle positivo foi diluído nas concentrações de 1ng até 1000fg e o iniciador foi capaz de amplificar o controle na faixa entre 1ng até 10pg.

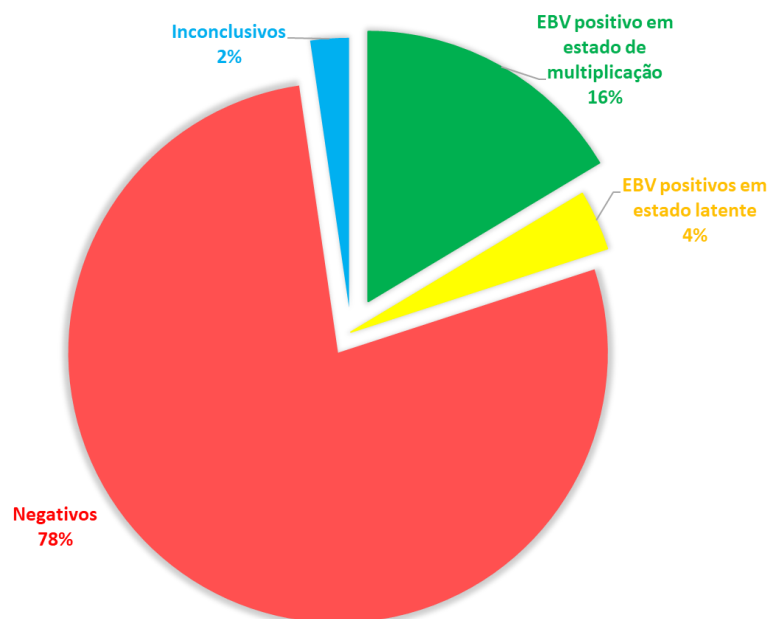
Foi feito o teste de especificidade que comprovou que os iniciadores EBNA-1 e gp350 amplificaram especificamente apenas DNA de EBV (Figura 9).



**Figura 8.** Teste de especificidade de EBNA-1 (A) e gp350 (B). Foi testada a especificidade dos iniciadores em amplificar outro herpesvírus (HSV-1/2). Ambos são específicos para EBV.

### 3. Triagem das amostras clínicas por qPCR para EBV

Foram triadas no total, 390 amostras de LCR. Destas, 343 amostras foram coletadas no Hospital Infantil João Paulo II de Belo Horizonte, do período entre 2012 a 2019, e 47 amostras do Hospital Nossa Senhora da Saúde de Diamantina, do ano de 2018. Foram detectadas 64 amostras EBV positivas em estado de multiplicação, 14 amostras EBV positivas em estado latente, 303 amostras negativos e apenas em 9 amostras o resultado foi inconclusivos (**Figura 10**). As amostras foram triadas em duplicatas e apenas quando o DNA foi amplificado em ambas as duplicatas o resultado foi considerado positivo. As amostras que deram positivo para EBV em apenas uma das duplicatas, mesmo após repetição dos testes, foram consideradas como resultado inconclusivo. Quando nenhuma duplicatava foi amplificada o resultado foi considerado negativo.



**Figura 9.** Relação de amostras EBV positivas e negativas a partir dos resultados obtidos por qPCR. Em 78% das amostras não foi detectado Epstein-Barr. Entre as amostras positivas, 14 amostras indicaram a presença de EBV, possivelmente em estado latente e 64 amostras positivas para EBV em possível estado de multiplicação. E apenas 2% das amostras apresentaram resultados inconclusivos na qPCR.

#### 4. Sequenciamento de DNA amplificado

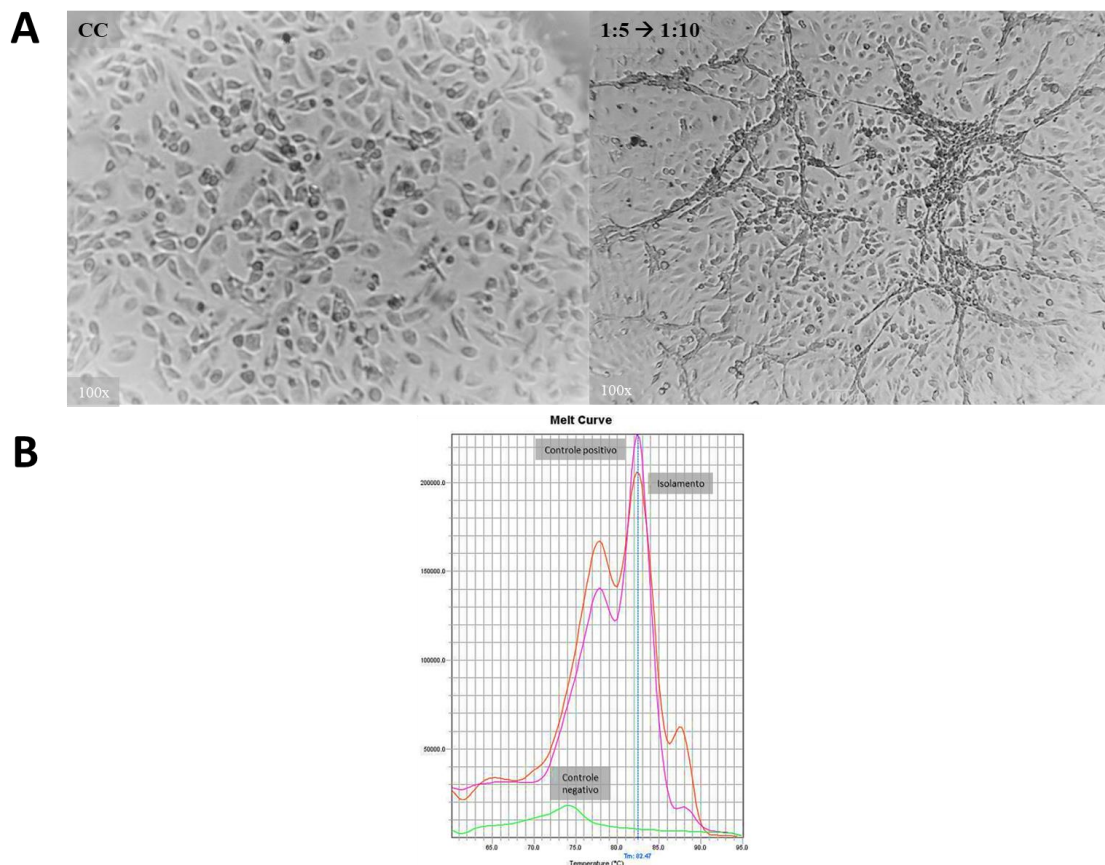
As amostras triadas indicadas como EBV positivo foram sequenciadas para fins de confirmação do resultado da qPCR. O resultado da sequência de nucleotídeos foi alinhado empregando informações do banco de dados (**Tabela 4**). Todas as amostras alinharam com as sequências do banco de dados confirmando a detecção de DNA de EBV no LCR dos pacientes avaliados. Foram sequenciados DNA tanto da amplificação com iniciadores de EBNA-1 como de gp350. Com valores de *query cover* de todas entre 95 a 100%, *e-value* entre 2E-46 até 8E-102, e *identidade* entre 95,12% até 100%.

Tabela 3. Sequências utilizadas como banco de dados para as análises do sequenciamento

<i>Gene</i>	<i>Definição</i>	<i>GenBank</i>	<i>Origem / Geolocalização</i>
<i>EBNA-1</i>	Human herpesvirus 4 complete wild type	<a href="#">AJ</a> <a href="#">507799.2</a>	Não informado
	Human herpesvirus 4 strain M81	<a href="#">KF</a> <a href="#">373730.1</a>	Carcinoma / China
	Human herpesvirus 4 strain Mutu	<a href="#">KC</a> <a href="#">207814.1</a>	Linfoma de Burkitt / Quênia
	Human herpesvirus 4 strain Akata	<a href="#">KC</a> <a href="#">207813.1</a>	Linfoma de Burkitt / Japão
	Human gammaherpesvirus 4 isolate NPCT109	<a href="#">MK</a> <a href="#">540464.1</a>	Biópsia de tumor / China
	Human herpesvirus 4, isolate PA nuclear antigen EBNA-1 gene, partial cds, C-terminal unique domain	<a href="#">U</a> <a href="#">21202.1</a>	Linfoblastos
	Human herpesvirus 4 DNA, strain HN15	<a href="#">AB</a> <a href="#">850654.1</a>	Carcinoma Nasofaringe / China
	Human gammaherpesvirus 4 isolate HS048	<a href="#">MK</a> <a href="#">540294.1</a>	Saliva / Chiva
	Human gammaherpesvirus 4 isolate DF_Tonsil_T47	<a href="#">MG</a> <a href="#">298828.1</a>	Tonsila
	Human gammaherpesvirus 4 isolate Toronto-IM-328343_EBNA1 EBNA1 gene	<a href="#">MK</a> <a href="#">185455.1</a>	Mononucleose Infecciosa / Canadá
	Human herpesvirus 4 isolate 39082 EBNA1 protein (BKRF1) gene	<a href="#">KT</a> <a href="#">875942.1</a>	Doença Desmielinizante de Perth / Austrália
	Human herpesvirus 4 strain M81	<a href="#">KF</a> <a href="#">373730.1</a>	Carcinoma / China
	Human gammaherpesvirus 4 isolate NPCT115	<a href="#">MK</a> <a href="#">540470.1</a>	Biópsia de tumor / China
	<i>gp350</i>	Human herpesvirus 4 strain Mutu	<a href="#">KC</a> <a href="#">207814.1</a>
Human gammaherpesvirus 4 isolate JC_VID41_BWA		<a href="#">MG</a> <a href="#">298928.1</a>	Não informado / Reino Unido
Human herpesvirus 4 strain Akata		<a href="#">KC</a> <a href="#">207813.1</a>	Linfoma de Burkitt / Japão
Human herpesvirus 4 strain HKNPC1		<a href="#">JQ</a> <a href="#">009376.2</a>	Carcinoma Nasofaringe / China
Human herpesvirus 4 isolate E1477.OW.CONV envelope glycoprotein gp350 (BLLF1) gene		<a href="#">KX</a> <a href="#">271793.1</a>	Mononucleose / EUA
Epstein Barr virus major outer envelope glycoprotein genes gp350 and gp220		<a href="#">M</a> <a href="#">10593.1</a>	Clones em B95-8
Human gammaherpesvirus 4 isolate YCCEL1-GC1		<a href="#">MG</a> <a href="#">021305.1</a>	Adenocarcinoma
Human herpesvirus 4 complete wild type		<a href="#">AJ</a> <a href="#">507799.2</a>	Não informado

## 5. Isolamento de EBV

Na 4ª passagem foi possível observar um indício de isolamento viral, confirmado posteriormente por qPCR. Na literatura não são descritos registros de efeito citopático de Epstein-Barr na linhagem A549. Nem sempre são registrados efeito citopático de EBV em cultura de células, mas tipicamente o efeito tradicional é a fusão celular observada e descrita nas linhagens Raji e NPC-KT (Sullivan, 2019; HIROSHI SATO, 1989; Gary James Bayliss, 1980).



**Figura 10.** Isolamento de Epstein-Barr e confirmação por qPCR. Isolamento (A) observa-se o controle de células linhagem A549 sem alterações (CC) e a 4ª passagem da diluição inicial (1:5) diluída em 1:10 observa-se fusão celular. Confirmação por qPCR (B) da presença de EBV.

## 6. Avaliação dos prontuários

Os prontuários dos pacientes foram analisados, sendo que dos 390 pacientes foram disponibilizados 262 prontuários. Os dados coletados estão resumidos nas tabelas a seguir.

**Tabela 4.** Sexo, idade, distribuição geográfica e óbitos dos pacientes EBV Negativos

PACIENTES EBV - NEGATIVOS (303 pacientes)					
SEXO	Nº de pacientes	IDADE	Nº de pacientes	DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA	Nº de pacientes
Masculino	138	< 1 mês	15	Belo Horizonte	143
Feminino	78	1 – 5 meses	46	Raio de 10km	17
Não informado	87	5 meses – 1 ano	35	Raio de 10 a 30km	28
<b>ÓBITO</b>		1 – 5 anos	70	Raio de 30 a 50km	34
Óbito	4	5 – 10 anos	26	Raio de 50 a 100km	14
Sobreviveram	280	> 10 anos	10	Raio maior que 100km	45
Não informado	19	Não informado	101	Não informado	22

Tabela 5. Sexo, idade, distribuição geográfica e óbitos dos pacientes com resultado inconclusivo

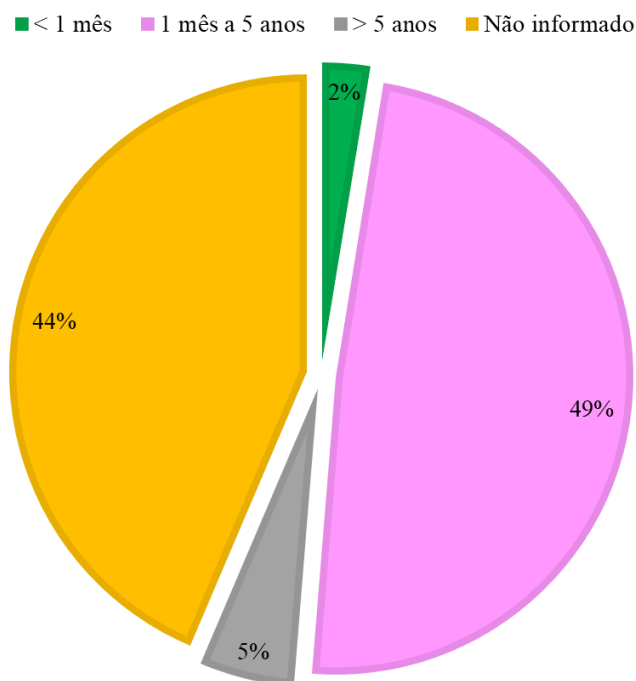
PACIENTES INCONCLUSIVOS (9 pacientes)					
SEXO	Nº de pacientes	IDADE	Nº de pacientes	DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA	Nº de pacientes
Masculino	3	< 1 mês	0	Belo Horizonte	1
Feminino	4	1 – 5 meses	1	Raio de 10km	1
Não informado	2	5 meses – 1 ano	3	Raio de 10 a 30km	0
<b>ÓBITO</b>		1 – 5 anos	2	Raio de 30 a 50km	2
Óbito	0	5 – 10 anos	1	Raio de 50 a 100km	0
Sobreviveram	9	> 10 anos	0	Raio maior que 100km	2
Não informado	0	Não informado	2	Não informado	3

Tabela 6. Sexo, idade, distribuição geográfica e óbitos dos pacientes EBV Positivos

PACIENTES EBV – POSITIVOS (78 pacientes)					
SEXO	Nº de pacientes	IDADE	Nº de pacientes	DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA	Nº de pacientes
Masculino	23	< 1 mês	2	Belo Horizonte	13
Feminino	21	1 – 5 meses	12	Raio de 10km	0
Não informado	34	5 meses – 1 ano	11	Raio de 10 a 30km	18
<b>ÓBITO</b>		1 – 5 anos	15	15	1
Óbito	3	5 – 10 anos	4	Raio de 50 a 100km	1
Sobreviveram	42	> 10 anos	0	Raio maior que 100km	12
Não informado	33	Não informado	34	Não informado	33

A maioria dos pacientes que apresentaram resultado positivo para a presença de do DNA genômico de EBV são crianças entre 1 mês a 5 anos de vida (48,7% dos pacientes).

DISTRIBUIÇÃO DA FAIXA ETÁRIA DOS PACIENTES EBV-POSITIVO



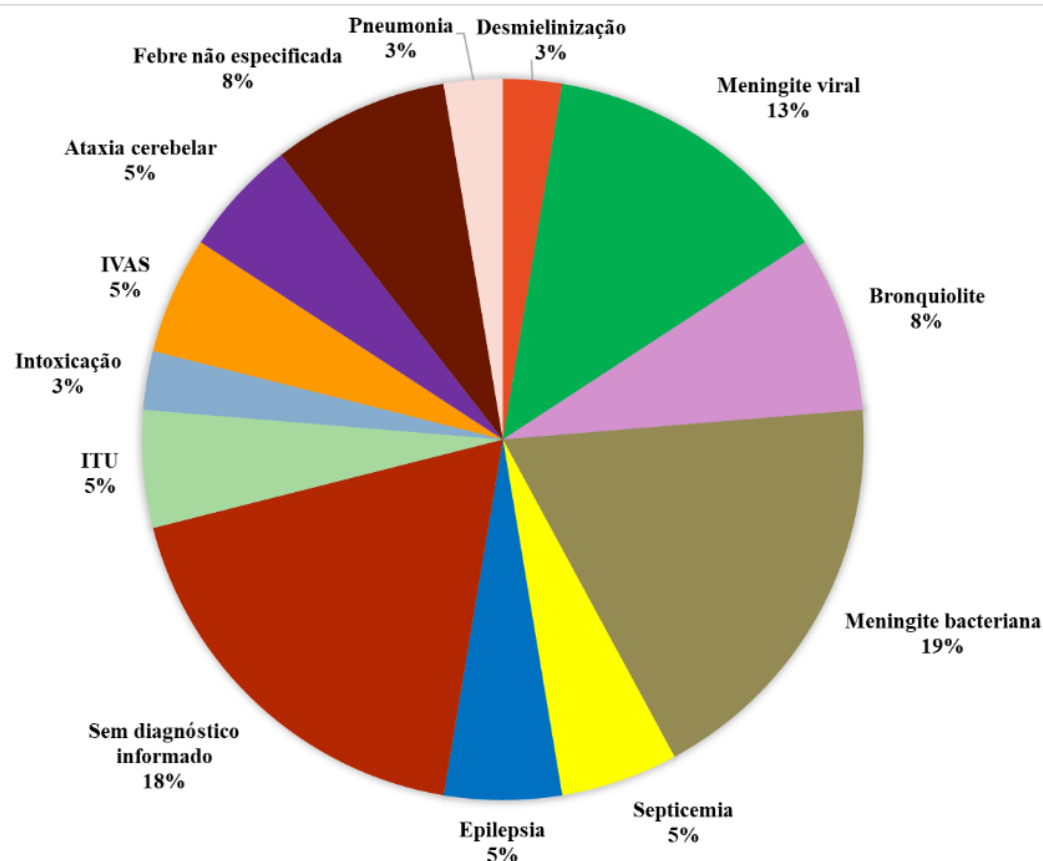
**Figura 11.** Distribuição da faixa etária dos pacientes EBV-positivos. Os pacientes em sua maioria estão na faixa etária entre 1 mês a 5 anos de idade.



A maior frequência de infecção pode ser observada em uma faixa etária extremamente jovem. Embora os casos relatados na literatura são raros, existe a possibilidade de infecção congênita. Mulheres grávidas infectadas com EBV são capazes de transmitir o vírus para o feto entre a 5ª e 6ª semana de gestão, ao nascimento a criança pode apresentar anomalias congênitas, trombocitopenia, monocitose dentre outros (Carvalho, 1999; Gerald N. Goldberg et al., 1981).

Outra possibilidade é a transmissão após o nascimento da criança que é a mais provável nos casos apresentados neste estudo. A rota de transmissão mais comum é pela saliva. Normalmente entre o nascimento até os 18 meses as crianças se encontram na ‘fase oral’ de acordo com o desenvolvimento psicossocial, nesta fase o reconhecimento de objetos e texturas é pela via oral e as crianças levam tudo à boca (Zornig, 2008). Nesta faixa etária também é possível que as crianças estejam em convívio social em creches e pré-escolas, sendo que é determinado pela LDB 9394/96 que a faixa etária de 0 a 6 anos sejam matriculadas em creches e pré-escolas, embora a realidade mineira é o oposto: segundo dados do IBGE de 2017, Minas Gerais tem 74% das crianças fora das creches e pré-escolas. No caso dos pacientes avaliados neste trabalho, baseado nos relatos dos responsáveis e familiares nos prontuários, nenhuma das crianças era frequentadora de creches ou pré-escolas. Outra rota de transmissão, embora não seja documentada com frequência na literatura, existem casos de transmissão através do aleitamento materno (Junker, 1991; Ibrahim I. Daud, 2015). A exposição das crianças e recém-nascidos é muito comum em situações onde elas são beijadas, compartilhamento de talheres ou quando o responsável sopra o alimento para a criança, compartilhamento de brinquedos e quando as crianças levam os objetos até a boca, são todas possíveis rotas de transmissão de EBV na primeira infância, sendo os pais provavelmente a principal fonte de transmissão oral do vírus (Hillman, 2017; Robert Newton et al., 2018; Cederberg, 2018).

Além disso, nota-se uma diversidade em diagnósticos apresentados nos prontuários avaliados neste estudo (**Figura 12**).



**Figura 12. Diagnósticos reportados nos prontuários dos pacientes EBV positivos (faixa etária: 1 mês a 5 anos).** Dados obtidos a partir da avaliação dos prontuários dos pacientes EBV-positivos. A maioria foi diagnosticado com meningite (bacteriana e viral), bronquiolite e febre não especificada.

Em crianças menores de 5 anos de idade o quadro clínico, quando sintomático, costuma ser apresentado em formas atípicas e ser diagnosticado como pneumonia, diarreia, otite média, bronquite, epilepsia, infecção do trato urinário (ITU), infecção de vias áreas respiratórias (IVAS), além disso podem estar associados aos sintomas comuns: linfadenomegalia, visceromegalias (fígado e baço) (Carvalho, 1999; Vasileios Bolis, 2016).

## 7. Relato de casos

Além da avaliação geral dos prontuários, foi feita uma análise minuciosa em relação ao desenvolvimento do quadro de cada paciente em que neste estudo foi detectado EBV no LCR. Dentre os casos avaliados alguns se destacam no perfil de progressão dos sintomas e conduta de tratamento, portanto 6 casos foram selecionados para compor os resultados e discussão deste trabalho.

### 7.1. Caso 854

R.E.S.M, sexo masculino, 10 meses de idade, proveniente da região de Três Marias, MG. O paciente foi admitido no HIJPII no dia 31/05/2018. Depois de quatro dias da admissão o mesmo apresentou episódios de crise convulsiva, vômito e febre e iniciado tratamento com antibiótico. No dia da admissão no hospital o paciente apresentava isquemia cerebral e edema leve, o quadro seguiu se agravando e com má resposta ao tratamento. O diagnóstico inicial foi suspeita de meningite ou meningoencefalite herpética. O paciente apresentava fontanela tensa, pupilas não reativas, extremidades cianóticas, hipotenso. No dia 3/06/2018 foi iniciado o protocolo de morte encefálica. No dia 5/06/2018 o paciente foi a óbito. O exame de urina não indicou alterações aparentes, o hemograma e leucograma correspondiam ao estado grave do paciente, plaquetopenia acentuada e de rápida evolução. A TC indicou apagamento dos giros corticais e desaparecimento da diferenciação entre substâncias branca e cinzenta. O LCR foi colhido pós-mórtem e indicava possivelmente uma infecção viral, indicando pleocitose e hemorragia, os valores de proteína e lactato estavam superiores aos valores de referência e o nível de glicose ( $< 20\text{mg/dL}$ ) estava muito abaixo da glicemia capilar ( $140\text{ mg/dL}$ ) (**Tabela 8**). Deve-se levar em conta também que a coleta foi feita pós-morte em estado máximo de agravo da doença, portanto os resultados muito acima dos valores de referência podem destoar do padrão comum de infecção viral líquórica que é caracterizado por níveis glicêmicos e proteicos pouco acentuados ou dentro da normalidade e níveis de lactato abaixo de  $2\text{ mmol/L}$  (Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo, 2006; Mudasir Nazir, 2018; Daniel Damiani, 2012). Nota-se que os testes de bacteriologia indicaram ausência de crescimento bacteriano, embora o diagnóstico final do prontuário foi de meningoencefalite, meningiomielite bacteriana NCOP<sup>2</sup> e edema cerebral.

---

<sup>2</sup> NCOP = não classificada em outra parte

Tabela 7. Dados referentes a avaliação do LCR do paciente 854

		Valores de Referência
<i>Ácido Láctico</i>	6,8 mmol/L	0,7 a 2,1 mmol/L
<i>Proteínas</i>	2814mg/dL	Recém-nascidos: até 150 mg/dL Prematuros: até 170 mg/dL
<i>Glicemia</i>	<20mg/dL	12 – 60mg/dL
<i>Leucócitos</i>	370mm <sup>3</sup> - Linfócitos 55mm <sup>3</sup> (15%) - Monócitos 22mm <sup>3</sup> (6%) - Macrófagos 11mm <sup>3</sup> (3%)	RN: até 15/mm <sup>3</sup> Outros: < 5/mm <sup>3</sup>
<i>Hemácias</i>	4830 mm <sup>3</sup>	0
<i>Gram</i>	Ausente	Ausente
<i>Anaeróbios</i>	Ausente	Ausente
<i>Cultura</i>	Sem crescimento	Sem crescimento

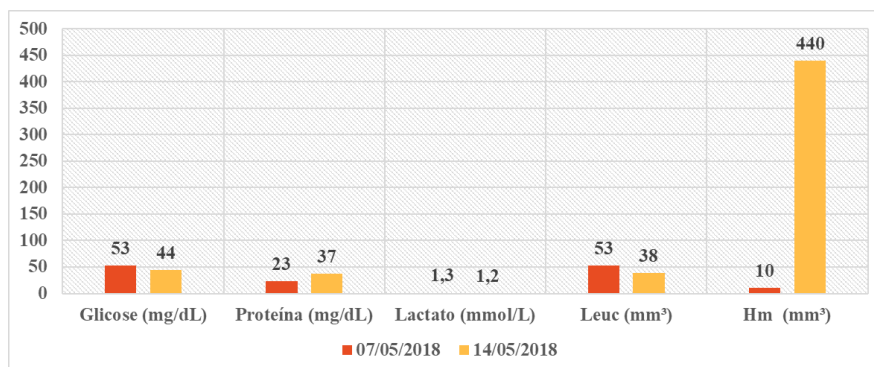
O paciente 854 chegou ao hospital já em grave estado debilitado e não foi possível determinar com exatidão o agente etiológico. A triagem por qPCR indicou a presença de EBV (confirmada por sequenciamento) e foi negativo para ENTV, HHV-1/2, HHV-3, ZIKV, SLEV, WNV, YFV, CHIKV, DENV (Crispim, 2020). Sabe-se que o vírus apresenta potencial controle do sistema imune, que por sua vez, quando prejudicado permite a reativação viral. O fator estressante também leva à desregulação do sistema imune e por sua vez, à reativação de EBV (Münz, 2017; Christopher P. Fagundes et al., 2014). A complicação do quadro não pode ser atribuída predominantemente ao EBV, associado como doença primária (Carvalho, 1999), mas é necessário considerar como hipótese diagnóstica.

## 7.2. Caso 877

J.E.M.O, sexo feminino, 3 anos de idade, proveniente da região de Belo Horizonte, MG. A paciente foi admitida no HIJPII no dia 6/05/2018. Há 1 semana da admissão a mesma apresentou sintomas de febre, vômito, dificuldade de marcha, fraqueza, dores nas articulações. Ela deu entrada no hospital com linfadenomegalia cervical bilateral, lesões crostosas na região perilabial (herpes não confirmada), paraparesia flácida em membros inferiores e paresia no membro superior esquerdo. Sem demais alterações. As suspeitas iniciais eram Guillain-Barré, mielite aguda infecciosa ou encefalopatia desmielinizante. Os sintomas mantiveram sem alterações até o dia 18/05/2018 quando foi iniciado tratamento de pulsoterapia com metilpredinisona. A paciente recebeu alta médica no dia 24/05/2018 após melhora dos sintomas. Os exames de sangue não indicavam alterações. Foram realizados também testes IgM e IgG EBV e CMV reagentes, HHV-1/2 indeterminados. Foram realizadas duas coletas de LCR que

não indicavam sinais de infecção bacteriana ou fúngica. Os valores de glicose e proteínas apresentaram comportamento inversamente proporcional entre o período de coleta, evidenciando um perfil clássico de infecção viral: pleocitose e hipoglicorraquia, lactato dentro dos valores normais, predominância linfomonocitária (Daniel Damiani, 2012; Mudahir Nazir, 2018; Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo, 2006). O valor acentuado de hemácias, de acordo com a evolução do prontuário, foi devido lesão provocada durante a punção lombar. A RM expôs atrofia na cauda equina o que ocasionou em sequelas motoras dos membros inferiores. O diagnóstico final constado em seu prontuário foi desmielinização disseminada aguda não especificada.

A triagem por qPCR indicou a presença de EBV (confirmada por sequenciamento) e foi negativo para ENTV, HHV-1/2, HHV-3, ZIKV, SLEV, WNV, YFV, CHIKV, DENV (Crispim, 2020).



**Figura 13. Resultado da análise líquórica da paciente 877.** Foram feitas duas coletas de LCR da paciente, uma em 7/05/2018 e outra 14/05/2018.

É um caso raro de doença desmielinizante causada por EBV em uma paciente imunocompetente, com sintomas clássicos de neuroinfecção por EBV. As infecções por EBV podem levar a diversas complicações, entre elas: doenças desmielinizantes, Guillain-Barré, ataxia e paralisias (J. Gordon Millichap, 2015; Schestatsky, Torres, Moreira, Krug, & Amaral, 2009; Vasileios Bolis, 2016). A linfadenomegalia também é comum na maioria dos casos (Carvalho, 1999). Inicialmente a paciente foi tratada com imunoglobulina – para proteção e melhora da resposta imune – e sintomáticos. Posteriormente foi realizado o tratamento de pulsoterapia com a metilprednisona, frequentemente utilizado no tratamento de doenças autoimunes. Alguns artigos descrevem o tratamento combinado de aciclovir (antiviral que reduz a replicação viral) com a metilprednisona e imunoglobulina demonstrando eficácia no tratamento (H, et al.,

1999; Højberg, 2005; Çelik, et al., 2015; Tohru Takahashi et al., 2006; Joseph S. Pagano, 2018).

### 7.3. Caso 878

J.P.R, sexo feminino, 1 ano e 5 meses de idade, proveniente da região de Belo Horizonte, MG. A paciente foi admitida no HIJPII no dia 13/04/2018 com episódios de crise convulsiva e febre. Há 1 dia da admissão a mesma apresentou episódios de vômito e febre. O diagnóstico inicial foi de encefalite viral não especificada. Foi iniciado o tratamento com sintomáticos, anti-convulsionantes, antibióticos e antivirais (aciclovir). Dentro de dois dias a paciente apresentou melhora do quadro, sem crises convulsivas, sem sinais meníngeos e o aciclovir foi suspenso. No dia 18/04/2018 a paciente recebeu alta médica com total melhora do quadro. A TC e o ECG não indicaram alterações. Os exames de sangue indicaram leucocitose (inicialmente com prevalência de neutrófilos, e na segunda coleta linfócitos) e PCR acima dos valores de referência. Foram feitas duas tentativas de punção lombar, a primeira sem sucesso e a segunda hemorrágica devido a hematomas na região de punção; a avaliação do LCR não mostrou alterações. Foram feitos também, TC e ECG que não indicaram alterações neurológicas. O diagnóstico final foi epilepsia não especificada.

**Tabela 8. Dados referentes a avaliação do LCR do paciente 878**

		<i>Valores de Referência</i>
<b>Ácido Láctico</b>	1,2 mmol/L	0,7 a 2,1 mmol/L
<b>Proteínas</b>	26 mg/dL	Recém-nascidos: até 150 mg/dL Prematuros: até 170 mg/dL
<b>Glicemia</b>	50 mg/dL	12 – 60mg/dL
<b>Leucócitos</b>	18% - Linfócitos 78% - Monócitos 10% - Neutrófilos 10% - Macrófagos 2%	RN: até 15/mm <sup>3</sup> Outros: < 5/mm <sup>3</sup>
<b>Hemácias</b>	16 000 mm <sup>3</sup>	0
<b>Gram</b>	Ausente	Ausente
<b>Anaeróbios</b>	-	Ausente
<b>Cultura</b>	-	Sem crescimento

A triagem por qPCR indicou a presença de EBV (confirmada por sequenciamento) e foi negativo para ENTV, HHV-1/2, HHV-3, ZIKV, SLEV, WNV, YFV, CHIKV, DENV (Crispim, 2020).

As meningites virais são caracterizadas por indicarem pequenas ou nenhuma alteração no LCR (Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo, 2006; Mudasir Nazir, 2018; Daniel Damiani, 2012). Uma das possíveis complicações causadas pela infecções por EBV é a epilepsia, além dos sintomas típicos de convulsão e febre (J. Gordon Millichap, 2015; Schestatsky, Torres, Moreira, Krug, & Amaral, 2009; Vasileios Bolis, 2016). A infecção por EBV típica é caracterizada como uma doença auto-limitada (Goldstein MA, 2002). É comum, em crianças menores de 5 anos de idade, a ocorrência de um quadro atípico de infecção associado à outras patologias, como por exemplo a epilepsia (Carvalho, 1999).

#### 7.4. Caso 1027 e 1071

Os casos a seguir os pacientes apresentaram a co-deteção de EBV com DENV.

- Caso 1027: C.V.S, sexo feminino, 3 meses e 8 dias de idade, proveniente da região do Barreiro em Belo Horizonte, MG. Paciente teve contato prévio com lactente doente na vizinhança. Foi admitida no dia 12/06/2018 no HIJPII em bom estado geral, apresentado irritabilidade e pescoço em posição antálgica para a direita. O quadro evoluiu com abaulamento e tensão da fontanela e com o aparecimento de máculas hipocrômicas na genitália externa. A paciente foi submetida à uma TC que revelou um empiema frontal e à uma RM do encéfalo que indicou a presença de lesões no parênquima cerebral e reforçou o diagnóstico do empiema. Os exames de sangue indicaram pelocitose e a avaliação do LCR constou hiperproteínoorraquia. O tratamento foi feito com sintomáticos e antibióticos ceftriaxona e posteriormente, cefotaxima. A paciente se manteve afebril a partir do dia 25/06/2018. Foi observado um leve atraso de desenvolvimento (sugere-se no prontuário que possivelmente pode ser acarretado a sequelas da meningite). A troca do antibiótico de ceftriaxona para cefotaxima coincidiu com a melhora do quadro da paciente que manteve sem queixas e recebeu alta no dia 16/07/2018. Em seu prontuário o diagnóstico final é de meningite bacteriana por *Neisseria meningitidis* grupo C (isolado em cultura de LCR).

- Caso 1071: S.A.B.S, sexo feminino, 10 meses de idade, proveniente de Perdigoão (região do Alto São Francisco), MG. A paciente foi admitida no HIJPII no dia 27/08/2018 com quadro prévio de febre, convulsão e comprometimento do lado esquerdo (nistagmo, desvio de rimae hipertonia de membro superior). A paciente não apresentava rigidez na nuca e fontanela estava plana e pulsátil, classificação Glasgow 12/13 foi internada no CTI. Foi tratada inicialmente com sintomáticos, ceftriaxona e aciclovir, posteriormente mantendo somente o antiviral e sintomáticos. Os exames de sangue indicaram proteína C reativa alta e leucocitose. A paciente recebeu alta do CTI após 1 dia e foi transferida para enfermaria onde foi submetida a monitorização rigorosa e evoluiu com melhora progressiva do quadro, após 21 dias de tratamento com aciclovir, no dia 17/09/2018 a paciente recebeu alta médica. A paciente foi submetida a testes de IgM e IgG que foram EBV, HSV-1/2 e CMV IgM reagentes e EBV IgG reagente. O diagnóstico final em seu prontuário é de meningoencefalite viral.

Não é sempre possível associar EBV como a causa de doença primária, há possibilidade de coinfeção e o desenvolvimento da doença de forma secundária, associada à outro agente infeccioso (Carvalho, 1999). Os dois casos descritos mostram um quadro de meningoencefalite típica com sinais meníngeos (rigidez na nuca, sinais de Brudzinki e Kernig), convulsões e febre. Com estes dois casos é possível comparar os efeitos da neuroinfecção bacteriana com a neuroinfecção viral. O primeiro caso é clássico de meningite bacteriana (Daniel Damiani, 2012) com líquido de aspecto turvo/amarelado e sinais claros de infecção líquórica (hiperproteinorraquia, aumento do lactato, prevalência de neutrófilos e látex positivo para *Neisseria meningitidis* grupo C). O segundo caso é uma meningite viral sem alterações líquóricas, com prevalência linfocitária no LCR e no sangue. Na **figura 12** foi realizada a comparação das características líquóricas de ambos os pacientes.



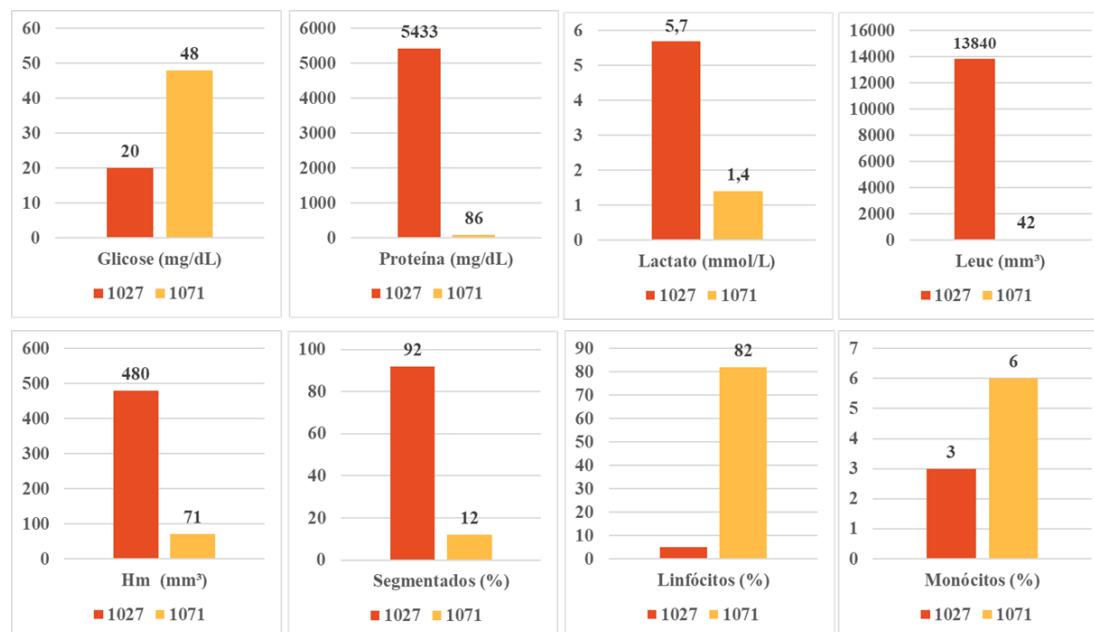
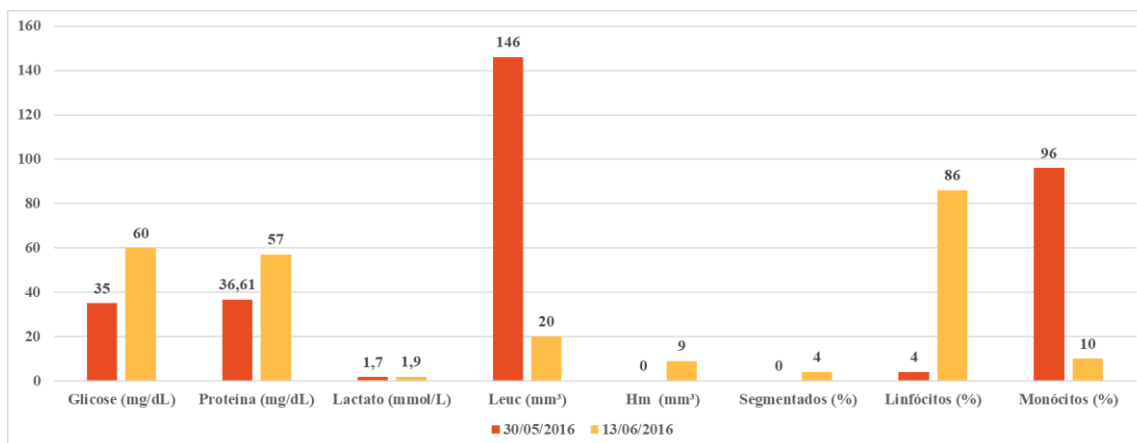


Figura 14. Comparação da análise bioquímica e de celularidade do LCR de pacientes com meningite bacteriana e viral, respectivamente.

### 7.5.Caso 654

M.H.O.S.S, sexo feminino, 1 ano e 2 meses de idade, proveniente de São Pedro do Avai (distrito de Manhuaçu), MG. Paciente com história prévia de convulsões, febre, tosse, cianose, déficit visual e auditivo. Foi encaminhada para o HIJPII no dia 13/06/2016 apresentando irritabilidade, mas sem sinais meníngeos, Glasgow 15. O quadro seguiu estável durante todo o período de internação com melhora progressiva. A TC e a RM indicaram lesões difusas no encéfalo e um processo sequelar decorrente das sucessivas crises convulsivas (quadro desde fevereiro/2016) e possível envolvimento vascular na etiologia das mesmas. Os exames de sangue demonstraram a evolução de uma trombocitose e leucocitose, com predominância linfocitária. Os exames de LCR não indicaram presença de microrganismos bacterianos. Os níveis de glicose, proteína e lactato estavam dentro dos valores de referência, é possível observar um aumento discreto dos níveis proteicos no líquido e normalização dos níveis leucocitários, além disso os testes de celularidade indicaram predominância linfomonocitária (**Figura 15**). Na rede de atendimento local foi submetida a tratamento com ceftriaxona e aciclovir. No HIJPII o antibiótico foi suspenso, dando continuidade apenas ao antiviral até o dia da alta, dia 05/07/2016. O diagnóstico final no prontuário conta como meningoencefalite viral.



**Figura 15. Resultado da análise líquórica da paciente 654.** Foram realizadas duas coletas de LCR da paciente, a primeira em 30/05/2016 e a outra 13/06/2016. Observa-se uma alteração significativa no leucograma da paciente.

O líquido da paciente foi testado no hospital por meio da técnica de PCR para HSV-1/2 e o resultado foi negativo. A triagem por qPCR indicou a presença de EBV (confirmada por sequenciamento) e foi negativo para ENTV, HHV-1/2, HHV-3, ZIKV, SLEV, WNV, YFV, CHIKV, DENV (Crispim, 2020). O aciclovir é utilizado como alternativa de tratamento menos tóxica ao paciente desde 1982, inibindo seletivamente a multiplicação viral. Entretanto, sabe-se que este antiviral não apresenta eficácia contra a infecção latente de EBV, o que garante a persistência do vírus no hospedeiro. O quadro desta paciente refere-se a mais um caso de meningoencefalite viral clássica (Joseph S. Pagano, 2018; Carvalho, 1999; Daniel Damiani, 2012).

## CONCLUSÃO

É necessário reforçar a importância da prevenção da transmissão, evitando o contato muito próximo às crianças, beijos e compartilhamento de talheres, brinquedos e alimentos, principalmente entre adultos e crianças. Os testes moleculares demonstram ser de maior eficácia e rapidez para a obtenção de um diagnóstico diferencial. Desta forma, os resultados apresentados neste estudo corroboram com os casos descritos na literatura e alertam para a frequência de infecção por EBV em neuroinfecções. É imprescindível considerar como hipótese diagnóstica a infecção por Epstein-Barr em casos com manifestações neurológicas em crianças, a detecção precoce do vírus pode impactar no prognóstico e tratamento da doença.

## REFERÊNCIAS

- Aburakawa, Y., Katayama, T., Saito, T., Sawada, J., Suzutani, T., Aizawa, H., & Hasebe, N. (2017). Limbic Encephalitis Associated with Human herpesvirus 7 (HHV-7) in an Immunocompetent Adult: The First Reported case in Japan. *Internal Medicine*, *56*, 1919-1923. doi:10.2169/internalmedicine.56.8185
- Akhtar, S., Vranic, S., Cyprian, F. S., & Moustafa, A.-E. A. (Abril de 2018). Epstein-Barr virus in Gliomas: Cause, Association, or Artifact? *Frontiers in Oncology*, *8*, 1-10. doi:10.3389/fonc.2018.00123
- Akkoc, G., Eda Kepenekli Kadayifci, A. K., Atici, S., Yakut, N., Demir, S. O., Soysal, A., & Bakir, M. (April de 2016). Epstein-Barr Virus Encephalitis in an Immunocompetent Child: A Case Report and Management of Epstein-Barr Virus Encephalitis. *Case Reports in Infectious Diseases*, *2016*, 4. doi:10.1155/2016/7549252
- Araújo, A. Q.-C. (2010). *Texto de apoio ao curso de especialização - atividade física adaptada e saúde*. Acesso em 16 de 6 de 2018
- Asano, Y., Yoshikawa, T., Kajita, Y., Ogura, R., Suga, S., Yakazi, T., . . . Kurata, T. (1992). Fatal encephalitis/encephalopathy in primary human herpesvirus-6 infection. *Archives of Diseases in Childhood: short reports*, *67*, 1484-1485. doi:10.1136/adc.67.12.1484
- Austin, P., Flemington, E., Yandava, C., Strominger, J., & Speck, S. (6 de 1988). Complex transcription of the Epstein-Barr virus BamHI fragment H rightward open reading frame 1 (BHRF1) in latently and lytically infected B lymphocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *85*(1), 3678-3682. Acesso em 30 de 5 de 2018
- Baringer, J. R. (2008). Herpes Simplex Infections of the Nervous System. *Neurologic Clinics*, *26*, 657-674. Acesso em 29 de 05 de 2018
- Becerra-Artiles, A., Santoro, T., & Sterm, L. J. (2018). Evaluation of a method to measure HHV-6B infection in vitro based on cell size. *Virology Journal*, *15*(4). Acesso em 11 de 7 de 2018

- Black, J. B., Burns, D. A., Goldsmith, C. S., Feorino, P. M., Kite-Powell, K., Schinazi, R. F., . . . Pellet, P. E. (1997). Biologic properties of human herpesvirus 7 strain SB. *Virus Research*, 52, 25-41. Acesso em 6 de 7 de 2018
- Black, J. B., Inoue, N., & Kathleen Kite-Powell, S. Z. (1993). Frequent isolation of human herpesvirus 7 from saliva. *Virus Research*, 29, 91-98. Acesso em 11 de 7 de 2018
- Bolle, L. d., Andrei, G., Snoeck, R., Zhang, Y., Lommer, A. V., Otto, M., . . . Naesens, L. (2004). Potent, selective and cell-mediated inhibition of human herpesvirus 6 at an early stage of viral replication by the non-nucleoside compound CMV423. *Biochemical Pharmacology*, 67, 325-336. Acesso em 17 de 6 de 2018
- Bonthius, D. J., & James F. Bale, J. (2008). Viral Infections of the Nervous System. Em D. Irani, *Cerebrospinal Fluid in Clinical Practice* (1 ed., pp. 895-906). Saunders . Acesso em 9 de 11 de 2019
- Brazzelli, V., Giorgini, C., Barruscotti, S., Croci, G. A., & Borroni, G. (2017). Human Herpesvirus-7 Papular Rash in a Healthy Adult Patient. *Acta Dermato-Venereologica*, 97, 537-538. doi:10.2340/00015555-2567
- Caccuri, F., Ronca, R., Laimbacher, A. S., Berenzi, A., Steimberg, N., Campilongo, F., . . . Caruso, A. (2017). U94 of human herpesvirus 6 down-modulates Src, promotes a partial mesenchymal-to-epithelial transition and inhibits tumor cell growth, invasion and metastasis. *Oncotarget*, 8(27), 44533-44549. Acesso em 30 de 5 de 2018
- Campadelli-Fiume, G., Mirandola, P., & Menotti, L. (1999). Human Herpesvirus 6: An Emerging Pathogen. *Emerging Infectious Diseases*, 5(3), 353-366. Acesso em 17 de 6 de 2018
- Cao, H., & Shockey, J. M. (2012). Comparison of TaqMan and SYBR Green qPCR Methods for Quantitative Gene Expression in Tung Tree Tissues. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60, 12296-12303. doi:dx.doi.org/10.1021/jf304690e
- Carvalho, L. H. (1999). Mononucleose infecciosa . *Jornal de Pediatria*, 74(1). Acesso em Agosto de 2019

- CDC. (15 de June de 2016). *Viral Meningitis*. (N. C. Diseases, Produtor) Acesso em 26 de 05 de 2018, disponível em Centers for Disease Control and Prevention: <https://www.cdc.gov/meningitis/viral.html>
- Cederberg, L. E.-G. (2018). Epstein-Barr Virus DNA in Parental Oral Secretions: A Potential Source of Infection for Their Young Children. *Clinical Infectious Diseases*. doi:10.1093/cid/ciy464
- Çelik, T., Çelik, Ü., Tolunay, O., Kömür, M., Başpınar, H., Yılmaz, C., . . . Yıldızdaş, D. (2015). Epstein-Barr virus encephalitis with substantia nigra involvement. *J Pediatr Neurosci*, 10(4), 401-403. Acesso em Agosto de 2019
- Chadwick, D. R. (2005). Viral meningitis. *British Medical Bulletin*, 75 e 76, 1-14. doi:10.1093/bmb/ldh057
- Chan, P., Peiris, J., Yuen, K., Liang, R., Lau, Y., Chen, F., . . . Ng, M. (1997). Human Herpesvirus-6 and Human Herpesvirus-7 Infections in Bone Marrow Transplant Recipients. *Journal of Medical Virology*, 53, 295-305. Acesso em 11 de 7 de 2018
- Christopher P. Fagundes et al. (2014). Attachment anxiety is related to Epstein–Barr virus latency. *Brain Behav. Immun.*, 41, 232-238. doi:10.1016/j.bbi.2014.04.002.
- Corral, Í., Maza, S. S., Rodríguez, M., Kawiorski, M.-M., López-Martínez, M.-J., & Galán, J.-C. (2018). Molecular detection of human herpesvirus 7 DNA in cerebrospinal fluid from adult patients with neurological disorders. *Journal of NeuroVirology*, 24, 333-338. Acesso em 11 de 7 de 2018
- Crispim, A. P. (2020). *Detecção e isolamento de flavivirus em liquido cefalorraquidiano de pacientes em minas gerais no período de 2018 a 2019*. Dissertação de Mestrado (dados não publicados).
- Daniel Damiani, M. C. (2012). Meningite asséptica. *Rev Bras Clin Med*, 10(1), 46-50. Acesso em 27 de 12 de 2019
- Das, S., Skomorovska-Prokvolit, Y., Wang, F. Z., & Pellett, P. E. (02 de 2006). Infection-Dependent Nuclear Localization of US17, a Member of the US12 Family of Human Cytomegalovirus-Encoded Seven-Transmembrane Proteins. *Journal of Virology*, 80(3), 1191-1203. doi:10.1128/JVI.80.3.1191–1203.2006

- DATASUS. (2019). Fonte: Informações de Saúde (TABNET): <http://datasus.saude.gov.br/informacoes-de-saude/tabnet>
- Demmler, G. J. (7 de 1999). Congenital Cytomegalovirus Infection and Disease . *Seminars in Pediatric Infectious Diseases*, 10(3), 195-200. Acesso em 29 de 5 de 2018
- Dupont, L., & Reeves, M. (2016). Cytomegalovirus latency and reactivation: Recent insights into an age old problem. *Reviews in Medical Virology*, 26(2), 75-89. doi:10.1002/rmv.1862
- Espy, M. J., Uhl, J. R., Sloan, L. M., Buckwalter, S. P., Jones, M. F., Vetter, E. A., . . . Smith, T. F. (2006). Real-Time PCR in Clinical Microbiology: Applications for Routine Laboratory Testing. *Clinical Microbiology Reviews*, 19(1), 165-256. doi:10.1128/CMR.19.1.165-256.2006
- Fernández, F., Gutiérrez, J., Sorlózano, A., Romero, J., Soto, M., & Ruiz-Cabello, F. (2006). Comparison of the SYBR Green and the hybridization probe format for real-time PCR detection of HHV-6. *Microbiological Research*, 161, 158-163. doi:10.1016/j.micres.2005.07.007
- Gallagher, A., Collins, S., Trujillo, J., McCredie, K., Ahearn, M., Tsai, S., . . . Gallo, A. (1979). Characterization of the continuous differentiating myeloid cell line (HL-60) from a patient with acute promyelocytic leukemia. *Blood Journal*, 54(3), 713-733. Acesso em 6 de 7 de 2018
- GARES, V. e. (2017). The role of the early social environment on Epstein Barr virus infection: a prospective observational design using the Millennium Cohort Study. *Epidemiol. Infect.*, 145, 3405-3412. doi:10.1017/S0950268817002515
- Gary James Bayliss, H. W. (1980). Epstein-Barr virus-induced cell fusion. *Nature*, 287, 164-165. doi:10.1038/287164a0
- Gerald N. Goldberg et al. (1981). In Utero Epstein-Barr Virus (Infectious Mononucleosis) Infection. *JAMA*, 246(14), 1579-1581. doi:10.1001/jama.1981.03320140067034
- Goldstein MA, H. C. (2002). Infectious states. Em D. O. Ettinger AB, *Managing epilepsy and co-existing disorders* (pp. 83-133). Butterworth-Heinemann. Acesso em 27 de 12 de 2019

- Gompels, U., Nicholas, J., Lawrence, G., Jones, M., Thomson, B., Martin, M., . . . Macaulay, H. (1995). The DNA Sequence of Human Herpesvirus-6: Structure, Coding Content, and Genome Evolution. *Virology*, *209*, 29-51. Acesso em 31 de 5 de 2018
- Gubler, D. J. (December de 2001). Human Arbovirus Infections Worldwide. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *951*(1), pp. 13-24. doi:<https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2001.tb02681.x>
- H, M., Y, K., Y, T., Y, H., A, S., H, K., . . . M, N. (December de 1999). Epstein-Barr virus-associated hemophagocytic syndrome during mid-term pregnancy successfully treated with combined methylprednisolone and intravenous immunoglobulin. *The Japanese Journal of Clinical Hematology*, *40*(12), 1258-1264. Acesso em Agosto de 2019
- Hassani, A., Corboy, J. R., Al-Salam, S., & Khan, G. (2018). Epstein-Barr virus is present in the brain of most cases of multiple sclerosis and may engage more than just B cells. *PLOS One*, *13*(2), 1-19. doi:10.1371/journal.pone.0192109
- Hatanpaa, K. J., & Kim, J. H. (2014). Neuropathology of viral infections. Em A. Tselis, J. Booss, A. Tselis, & J. Booss (Eds.), *Handbook of Clinical Neurology* (3 ed., Vol. 123, pp. 193-214). Elsevier. Acesso em 15 de 6 de 2018
- Hill, J. A., & Venna, N. (2014). Human herpesvirus 6 and the nervous system. Em A. Tselis, J. Booss, A. Tselis, & J. Booss (Eds.), *Handbook of Clinical Neurology* (3 ed., Vol. 123, pp. 327-355). Elsevier. Acesso em 16 de 6 de 2018
- Hillman, A. J. (2017). Hillman, A. J. (2016). Epstein-Barr Virus Infection and Infectious Mononucleosis. *Family Medicine*, 501–505. doi:10.1007/978-3-319-04414-9\_40. Em P. P. al., *Family Medicine* (pp. 501-505). Springer International Publishing Switzerland. doi:10.1007/978-3-319-04414-9\_40
- HIROSHI SATO, T. T. (1989). Cytopathic Effects Induced by Epstein-Barr Virus Replication in Epithelial Nasopharyngeal Carcinoma Hybrid Cells. *Journal of Virology*, *63*(8), 3555-3559. doi:10.1128/JVI.63.8.3555-3559.1989
- HØjberg, L. e. (April de 2005). A case of Epstein-Barr virus infection complicated with Guillain-Barre ´ syndrome involving several cranial nerves. *Scand J Infect Dis*, 522-524. doi:10.1080/00365540510038514

- Hokkanen, L., & Laune, J. (2007). Neuropsychological sequelae of acute-onset sporadic viral encephalitis. *NEUROPSYCHOLOGICAL REHABILITATION*, *17*(4/5), 450-477. doi:10.1080/09602010601137039
- Humme, S., Reisbach, G., Feederle, R., Delecluse, H.-J., Bousset, K., Hammerschmidt, W., & Schepers, A. (2003). The EBV nuclear antigen 1 (EBNA1) enhances B cell immortalization several thousandfold. *PNAS (Proceedings of the National Academy of Sciences)*, *100*(19), 10989-10994. doi:10.1073/pnas.1832776100
- Hutt-Fletcher, L. M. (2007). Epstein-Barr Virus Entry. *JOURNAL OF VIROLOGY*, *81*(15), 7825-7832. doi:10.1128/JVI.00445-07
- Ibrahim I. Daud, C. B.-S. (2015). Breast Milk as a Potential Source of Epstein-Barr Virus Transmission Among Infants Living in a Malaria-Endemic Region of Kenya. *The Journal of Infectious Diseases*, *212*, 1735-1742. doi:10.1093/infdis/jiv290
- ICTV. (2020). *Virus Taxonomy: 2020 Release*. Acesso em 29 de 5 de 2018, disponível em International Committee on Taxonomy of Viruses: <https://talk.ictvonline.org/taxonomy/>
- Ishiguro, N., Yamada, S., Takahashi, T., Takahashi, Y., Togashi, T., Okuno, T., & Yamanishi, K. (1990). Meningo-Encephalitis Associated with HHV-6 Related Exanthem Subitum. *Acta Paediatr Scand*, *79*, 987-989. Acesso em 17 de 6 de 2018
- J. Gordon Millichap, M. (November de 2015). Epstein-Barr Virus Neurologic Complications. *PEDIATRIC NEUROLOGY BRIEFS*, *29*(11). doi:10.15844/pedneurbriefs-29-11-7
- Jha, H. C., Mehta, D., Lu, J., El-Naccache, D., Shukla, S. K., Kovacsics, C., . . . Robertson, E. S. (2016). Gammaherpesvirus Infection of Human Neuronal Cells. (G. Nemerow, Ed.) *mBio*, *6*(6), 1-14. doi:10.1128/mBio.01844-1
- Johannsen, E., Luftig, M., Chase, M. R., Weicksel, S., Cahir-McFarland, E., Illanes, D., . . . Kieff, E. (2004). Proteins of purified Epstein-Barr virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, *101*(46), 16286-16291. doi:10.1073/pnas.0407320101
- Joseph S. Pagano, C. B. (2018). Antiviral Drugs for EBV. *Cancers (Basel)*, *10*(6), 197. doi:10.3390/cancers10060197



- Junker, A. K. (1991). Epstein-Barr Virus Shedding in Breast Milk . *The American Journal of Sciences*, 302(4), 220-223. doi:10.1097/00000441-199110000-00005
- Kaykas, A., Worringer, K., & Sugden, B. (2001). CD40 and LMP-1 both signal from lipid rafts but LMP-1 assembles as distinct, more efficient signaling complex. *The EMBO Journal*, 20(11), 2641-2654. Acesso em 16 de 6 de 2018
- Khetsuriani, N., & Quiroz, E. S. (2003). Viral Meningitis-Associated Hospitalizations in the United States, 1988–1999. *Neuroepidemiology*, 22, 345-352. doi:10.1159/000072924
- Kieff, E., Dambaugh, T., Heller, M., King, W., Cheung, A., Santen, V. v., . . . Heineman, T. (10 de 1982). The Biology and Chemistry of Epstein-Barr Virus. *The Journal of Infectious Diseases*, 146(4), 506-517. doi:0022-1899/82/4604-0009\$01.0
- Kimberlin, D. W., & Whitley, R. J. (1998). Human herpesvirus-6: neurologic implications of a newly-described viral pathogen . *Journal of NeuroVirology* , 4, 474-785. Acesso em 29 de 5 de 2018
- Klemola, E., Ollila, O., Pettersson, T., Jansson, E., Haapanen, L., Lapinleimu, K., & Forssell, P. (1965). Studies of Viral Encephalitis. *Acta Medica Scandinavica*, 177(6). doi:10.1111/j.0954-6820.1965.tb01881.x
- Knipe, D. M., & Cliffe, A. (2008). Chromatin control of herpes simplex virus lytic and latent infection. *Mature Reviews: Microbiology*, 6, 211-221. doi:10.1038/nrmicro1794
- Kovács, I. J., & Pusztai, R. (2017). Human Cytomegalovirus Isolates Differ in Multiplication and Induction of IL-8 in Epithelial Cells. *Annals of Virology and Research*, 3(1). Acesso em 6 de 7 de 2018
- Koyuncu, O. O., & Hogue, I. B. (4 de 2013). Virus Infections in the Nervous System. *Cell Host Microbe*., 13(4), 379-393. doi:10.1016/j.chom.2013.03.010
- Kristine Niss Arfelt, S. F. (2015). EBV, the Human Host, and the 7TM Receptors: Defense or Offense? Em D. Teplow (Ed.), *Progress in Molecular Biology and Translational Science* (Vol. 129, pp. 395-427). Academic Press . doi:10.1016/bs.pmbts.2014.10.011

- Lahat, E., Pillar, G., Ravid, S., Barzilai, A., Etzioni, A., & Shahar, E. (1998). Rapid Recovery From Transverse Myelopathy in Children Treated With Methylprednisolone. *PEDIATRIC NEUROLOGY*, *19*(4), 279-282. Acesso em Agosto de 2019
- Lay, R. M. (2010). Measurement of Epstein-Barr virus DNA load using a novel quantification standard containing two EBV DNA targets and SYBR Green I dye. *Virology Journal*, *7*(252). doi:10.1186/1743-422X-7-252
- Lee, D., & Sugden, B. (1 de 5 de 2008). The latent membrane protein 1 oncogene modifies B-cell physiology by regulating autophagy. *Oncogene*, *27*, 2833-2842. Acesso em 30 de 5 de 2018
- LEE, M.-A., DIAMOND, M. E., & YATES, J. L. (1999). Genetic Evidence that EBNA-1 Is Needed for Efficient, Stable Latent Infection by Epstein-Barr Virus. *JOURNAL OF VIROLOGY*, *73*(4), 2974-2982. doi:0022-538X/99/\$04.0010
- Li, C., Goodrich, M., & Yang, X. (1997). Interferon-gama (IFN- $\gamma$ ) regulates production of IL-10 and IL-12 in human herpesvirus-6 (HHV-6)-infected monocyte/macrophage lineage. *Clin. Exp. Immunol.*, *109*, 421-425. Acesso em 6 de 7 de 2018
- Livak, K. J., Flood, S. J., Marmaro, J., Giusti, W., & Deetz, K. (1995). Oligonucleotides with Fluorescent Dyes at Ends Provide a Quenched Probe System Useful for Detecting PCR Product and Nucleic Acid Hybridization. *Genome Research*, *4*, 357-362. Acesso em 29 de 05 de 2018
- Louveau, A., Smirnov, I., Keyes, T. J., Eccles, J. D., Rouhani, S. J., Peske, J. D., . . . Kipnis, J. (2015). Structural and functional features of central nervous system lymphatic vessels. *Nature*, *523*, 337-341. doi:10.1038/nature14432
- Lu, F., Wikramasinghe, P., Norseen, J., Tsai, K., Wang, P., Showe, L., . . . Lieberman, P. M. (2010). Genome-wide analysis of host-chromosome binding sites for Epstein-Barr Virus Nuclear Antigen 1 (EBNA1). *Virology Journal*, *7*(262). Acesso em 7 de 11 de 2019
- LUPTON, S., & LEVINE, A. J. (1985). Mapping Genetic Elements of Epstein-Barr Virus That Facilitate Extrachromosomal Persistence of Epstein-Barr Virus-Derived

- Plasmids in Human Cells. *Molecular and Cellular Biology*, 5(10), 2533-2542. doi:0270-7306/85/102533-10\$02.00/0
- Lurain, N. S., Fox, A. M., Lichy, H. M., Bhorade, S. M., Ware, C. F., Huang, D. D., . . . Chou, S. (12 de 1 de 2006). Analysis of the human cytomegalovirus genomic region from. *Virology Journal*, 3(4). doi:10.1186/1743-422X-3-4
- Lussignol, M., & Esclatine, A. (2017). Herpesvirus and Autophagy: “All Right, Everybody Be Cool, This Is a Robbery!”. *Viruses*, 9(372). doi:10.3390/v9120372
- Lusso, P., Secchiero, P., Crowley, R. W., Garzino-Demo, A., Berneman, Z. N., C, R., & Gallo. (April de 1994). CD4 is a critical component of the receptor for human herpesvirus 7: Interference with human immunodeficiency virus. *Proc. Natl. Acad. Sci*, 91, 3872-3876. Acesso em 11 de 7 de 2018
- Maschke, M., Kastrup, O., & Diener, H.-C. (5 de 2002). CNS Manifestations of Cytomegalovirus Infections: Diagnosis and Treatment. *CNS Drugs*, 16(5), 303-315. Acesso em 29 de 5 de 2018
- Mathew, A. G., & Parvez, Y. (04 de 2013). Fulminant Epstein-Barr Virus Encephalitis. *Indian Pediatrics*, 50, 418-419. Acesso em 12 de 6 de 2018
- Mathur, M., Muchantef, K., & Sze, G. (2014). Neuroimaging of viral infections of the central nervous system. Em A. Tseli, & J. Boss, *Handbook of Clinical Nerulogy* (3rd ed., Vol. 123, pp. 149-173). Elsevier. Acesso em 29 de 5 de 2018
- McGill, F., & Griffiths, M. J. (April de 2017). Viral meningitis: current issues in diagnosis. *Current Opinion Infectious Diseases*, 30, 248-256. doi:10.1097/QCO.0000000000000355
- Menet, A., Speth, C., Larcher, C., Prodingler, W. M., Schwendinger, M. G., Chan, P., . . . Dierich., M. P. (Setembro de 1999). Epstein-Barr Virus Infection of Human Astrocyte Cell Lines. *Journal of VIrology*, 73(9), 7722-7733. Acesso em 16 de Março de 2019
- Meriem Khyatti, A. A. (1998). Binding of the endogenously expressed Epstein-Barr virus (EBV) envelope glycoprotein gp350 with the viral receptor masks the major EBV-neutralizing epitope and affects gp350-specific ADCC. *J. Leukoc.*, 64, 192-197. Acesso em 29 de 12 de 2019

- MIDDLETON, T., & SUGDEN, B. (1992). EBNA1 Can Link the Enhancer Element to the Initiator Element of the Epstein-Barr Virus Plasmid Origin of DNA Replication. *Journal of Virology*, 66(1), 489-495. doi:0022-538X/92/010489-07\$02.00/0
- Ministério da Saúde. (s.d.). *DATASUS*. Acesso em 26 de 05 de 2018, disponível em Portal da Saúde: <http://www2.datasus.gov.br/DATASUS/index.php?area=02>
- Mortimer, P. (2009). Classic paper: How monolayer cell culture transformed diagnostic virology: a review of a classic paper and the developments that stemmed from it. *Reviews in Medical Virology*, 19, 241-249. doi:10.1002/rmv.610
- Mudasir Nazir, W. A. (2018). Cerebrospinal fluid lactate: a differential biomarker for bacterial and viral meningitis in children. *Jornal de Pediatria*, 94, 88-92. doi:10.1016/j.jped.2017.03.007
- Münz, C. (2017). Epstein-Barr Virus-Specific Immune Control by Innate Lymphocytes. *Frontiers in immunology*, 8. doi:10.3389/fimmu.2017.01658
- Niesters, H. G., Esser, J. v., Fries, E., Wolthers, K. C., Cornelissen, J., & Osterhaus, A. D. (02 de 2000). Development of a Real-Time Quantitative Assay for Detection of Epstein-Barr Virus. *Journal of Clinical Microbiology*, 38, 712-715. Acesso em 12 de 06 de 2018
- Noguchi, T., Yoshiura, T., Hiwatashi, A., Togao, O., Yamashita, K., Nagao, E., . . . Kudo, S. (3 de 2010). CT and MRI Findings of Human Herpesvirus 6–Associated Encephalopathy: Comparison With Findings of Herpes Simplex Virus Encephalitis. *American Journal of Roentgenology*, 194, 754-760. doi:10.2214/AJR.09.2548
- Nowag, H., Guhl, B., Thriene, K., Romao, S., Ziegler, U., Dengjel, J., & Münz, C. (2014). Macroautophagy Proteins Assist Epstein Barr Virus Production and Get Incorporated Into the Virus Particles . *EBioMedicine*, 1, 116-125. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.ebiom.2014.11.007
- Oliveira, G. C., Madeira, M. d., & Celmer, M. D. (2015). Alterações de comportamento na encefalite herpética: um caso polimórfico e de difícil manejo. *J. Bras. Psiquiatr.*, 64(4), 307-310. Acesso em 27 de 7 de 2018

- Ongrádi, J., Ablashi, D. V., Yoshikawa, T., Sterez, B., & Ogata, M. (2017). Roseolovirus-associated encephalitis in immunocompetent and immunocompromised individuals. *Journal of Neurovirology*, *23*, 1-19. doi:10.1007/s13365-016-0473-0
- Ooi, M. H., Wong, S. C., Podin, Y., Akin, W., Sel, S. d., Mohan, A., . . . Solomon, T. (2007). Human Enterovirus 71 Disease in Sarawak, Malaysia: A Prospective Clinical, Virological, and Molecular Epidemiological Study. *Clinical Infectious Diseases*, *44*, 646-656. doi:10.1086/511073
- Owen, D. J., Crump, C. M., & Graham, S. C. (9 de 2015). Tegument Assembly and Secondary Envelopment of Alphaherpesviruses. *Viruses*, *7*, 5084-5114. doi:10.3390/v709286
- Pantry, S. N., & Medveczky, P. G. (2017). Latency, Integration, and Reactivation of Human Herpesvirus-6. (P. M. Lieberman, Ed.) *Viruses*, *9*(194). doi:10.3390/v9070194
- Peaper, D. R., & Landry, M. L. (2014). Laboratory diagnosis of viral infection. Em A. Tselis, & J. Boss, *Handbook of Clinical Neurology* (3rd ed., Vol. 123, pp. 123-147). Elsevier. Acesso em 28 de 05 de 2018
- Pellet, P. E., & Roizman, B. (2013). Herpeviridae. Em D. M. Knipe, & P. M. Howley (Eds.), *Fields Virology* (6<sup>a</sup> ed., Vol. 2, pp. 1802-1822). Wolters-Kluwer. Acesso em 28 de 05 de 2018
- Perlman, J. M., & Argyle, C. (1992). Lethal Cytomegalovirus Infection in Preterm Infants: Clinical, Radiological, and Neuropathological Findings. *Annals of Neurology*, *31*, 64-68. Acesso em 29 de 5 de 2018
- Pohl-Koppe, A., Blay, M., Jäger, G., & Weiss, M. (2001). Human herpes virus type 7 DNA in the cerebrospinal fluid of children with central nervous system diseases. *Eur J Pediatr*, *160*, 351-358. Acesso em 11 de 7 de 2018
- Pönkä, A., & Pettersson, T. (1982). The incidence and aetiology of central nervous system infections in Helsinki in 1980. *Acta Neurol. Scandinav.*, *66*, 529-555. doi:10.1111/j.1600-0404.1982.tb03139.x
- Portegies, P., & Corssmit, N. (2000). Epstein-Barr virus and the nervous system. *Current Opinion in Neurology*, *13*, 301-304. Acesso em 29 de 5 de 2018

- Portolani, M., Cermelli, C., Moroni, A., Bertolani, M. F., Luca, D. D., Cassai, E., & Sabbatini, A. M. (1993). Human Herpesvirus-6 Infections in Infants Admitted to Hospital. *Journal of Medical Virology*, *39*, 146-151. Acesso em 31 de 5 de 2018
- Prince, H. E., Calma, J., Pham, T., & Seaton, B. L. (04 de 2009). Frequency of Missed Cases of Probable Acute West Nile Virus (WNV) Infection When Testing for WNV RNA Alone or WNV Immunoglobulin M Alone. *Clinical and Vaccine Immunology*, *16*(4), 587-588. doi:10.1128/CVI.00462-08
- Prusty, B. K., Gulve, N., Rasa, S., Murovska, M., Hernandez, P. C., & Ablashi, D. V. (2017). Possible chromosomal and germline integration of human herpesvirus 7. *Journal of General Virology*, *98*, 266-274. doi:10.1099/jgv.0.000692
- Pujals, A., Favre, L., Pioche-Durieu, C., Robert, A., Meurice, G., Gentil, M. L., . . . Wiels, J. (12 de 2015). Constitutive autophagy contributes to resistance to TP53-mediated apoptosis in Epstein-Barr viruspositive latency III B-cell lymphoproliferations. *Autophagy*, *11*(12), 2275-2287. doi:http://dx.doi.org/10.1080/15548627.2015.1115939
- Ranger, S., Patillaud, S., Denis, F., Himmich, A., Sangare, A., M'Boup, S., . . . Agut, H. (1991). Seroepidemiology of Human Herpesvirus-6 in Pregnant Women From Differentparts of the World . *Journal of Medical Virology*, *34*, 194-198. Acesso em 31 de 5 de 2018
- Reinke, P., Prösch, S., Kern, F., & H.-D.Volk. (1999). Mechanisms of human cytomegalovirus (HCMV) (re)activation and its impact on organ transplant patients. *Transplant Infectious Disease*, *1*, 157-164. Acesso em 29 de 5 de 2018
- Riva, N., Franconi, I., Meschiari, M., Franceschini, E., Puzzolante, C., Cuomo, G., . . . Mussini, C. (2017). Acute human herpes virus 7 (HHV-7) encephalitis in an immunocompetent adult patient: a case report and review of literature. *Infection*, *45*, 385-388. doi:10.1007/s15010-017-1014-3
- Robert Newton et al. (2018). Determinants of Gammaherpesvirus Shedding in Saliva Among Ugandan Children and Their Mothers. *The Journal of Infectious Diseases*, *218*, 892-900. doi:10.1093/infdis/jiy262
- Rowley, A. H., Whitley, R. J., Lakeman, F. D., & Wolinsky, S. M. (2 de 1990). Rapid detection of herpes-simplex-virus DNA in cerebrospinal fluid of patients with

- herpes-simplex encephalitis. *The Lancet*, 335, 440-441. Acesso em 29 de 05 de 2018
- S., H., F., A., J., A., & M., B. T. (2015). Epstein-Barr Virus Encephalitis: A Case Report. *Iranian Journal of Child Neurology*, 9(1), 107-110. Acesso em 16 de 6 de 2018
- Sabat, S., Agarwal, A., Zacharia, T., Labib, S., & Yousef, J. (December de 2015). Epstein-Barr virus encephalitis presenting as cerebellar hemorrhage. *Neuroradiol J.*, 28(6), 555-558. doi:10.1177/1971400915609349
- SAINT-MARTIN, M., DUPLANTIS, F., LAVERDIERE, M., LACHAPELLE, J., ROUSSEAU, S., ROY, L., & BOILEAU, J. (1982). La Meningite de Mollaret . *LE JOURNAL CANADIEN DES SCIENCES NEUROLOGIQUES* , 9(1), 41-43. doi:10.1017/S0317167100043614
- Sandmeier, F. C., Weitzman, C. L., Maloney, K. N., Tracy, C. R., Nieto, N., Teglas, M. B., . . . Tuma, M. W. (2017). COMPARISON OF CURRENT METHODS FOR THE DETECTION OF CHRONIC MYCOPLASMAL URTD IN WILD POPULATIONS OF THE MOJAVE DESERT TORTOISE (GOPHERUS AGASSIZII). *Journal of Wildlife Diseases*, 53(1), 91-101. Acesso em 15 de 7 de 2018
- Sauter, A., Ernemann, U., Beck, R., Klingel, K., Mahrholdt, H., Bitzer, M., & Horger, M. (11 de 2009). Spectrum of Imaging Findings in Immunocompromised Patients With HHV-6 Infection. *American Journal of Roentgenology*, 193, 373-380. doi:10.2214/AJR.09.2687
- Schestatsky, P., Torres, V. F., Moreira, L. B., Krug, B. C., & Amaral, K. M. (Dezembro de 2009). Síndrome de Guillain-Barré. (P. D. Picon, M. I. Gadelha, & A. Beltrame, Eds.) *Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas, Portaria SAS/MS 497*. Acesso em Agosto de 2019
- Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo. (2006). Meningites virais. *Rev Saúde Pública*, 40(4), 748750. Acesso em 27 de 7 de 2018
- Sejvar, J. (2014). Neuroepidemiology and the epidemiology of viral infections of the nervous system. Em A. Tselis, & J. Boss (Eds.), *Handbook of Clinical Virology* (3rd ed., Vol. 123, pp. 64-87). Elsevier B.V. Acesso em 27 de 05 de 2018

- Shalabi, M., & Whitley, R. J. (2006). Recurrent Benign Lymphocytic Meningitis. *Clinical Infectious Diseases*, 43, 1194-1197. doi:1058-4838/2006/4309-0012\$15.00
- Sharon L. Silins, M. A. (2001). Asymptomatic primary Epstein-Barr virus infection occurs in the absence of blood T-cell repertoire perturbations despite high levels of systemic viral load. *Blood Journal*, 98, 3739-3744. doi:10.1182/blood.V98.13.3739
- Sinclair, J., Baillie, J., Bryant, L., Taylor-Weideman, J., & Sissons, J. (1992). Repression of human cytomegalovirus major immediate early gene expression in a monocytic cell line. *Journal of General Virology*, 73, 433-435. Acesso em 6 de 7 de 2018
- Staheli, J. P., Dyen, M. R., Deutsch, G. H., Basom, R. S., Fitzgibbon, M. P., Lewis, P., & Barcy, S. (8 de 2016). Complete Unique Genome Sequence, Expression Profile, and Salivary Gland Tissue Tropism of the Herpesvirus 7 Homolog in Pigtailed Macaques. *Journal of Virology*, 90(15), 6657-6674. Acesso em 11 de 7 de 2018
- Steiner, I., Budka, H., Chaudhuri, A., Koskiniemi, M., Sainio, K., Salonen, O., & Kennedy, P. G. (2010). Viral meningoencephalitis: a review of diagnostic methods and guidelines for management. *European Journal of Neurology*, 17, 999-1009. doi:doi:10.1111/j.1468-1331.2010.02970.x
- Steiner, I., Kennedy, P. G., & Pachner, A. R. (November de 2007). The neurotropic herpes viruses: herpes simplex and varicella-zoster. *Lancet Neurology*, 6, 1015-1028. Acesso em 27 de 05 de 2018
- Stoeckle, M. Y. (2000). THE SPECTRUM OF HUMAN HERPESVIRUS 6 INFECTION: From Roseola Infantum to Adult Disease. *Annual Review of Medicine*, 51, 423-430. Acesso em 31 de 5 de 2018
- Streicher, H., Hung, C., Ablashi, D., Hellman, K., Saxinger, C., Fullen, J., & Salahuddin, S. (1998). In vitro inhibition of human herpesvirus- by phosphonoformate. *Journal of Virological Methods*, 21, 301-304. Acesso em 29 de 5 de 2018
- Sullivan, J. L. (12 de 2019). *Virology of Epstein-Barr virus*. Acesso em 29 de 1 de 2020, disponível em uptodate: <https://www.uptodate.com/contents/virology-of-epstein-barr-virus>



- Swaminathan, S., & Kenney, S. (2009). The Epstein–Barr Virus Lytic Life Cycle. Em J. Pipas, & B. Damania, *DNA Tumor Viruses* (pp. 285-315). Publisher Name . doi:10.1007/978-0-387-68945-6\_13,
- Tanaka, K., Kondo, T., Torigoe, S., Okada, S., Mukai, T., & Yamanishi, K. (July de 1994). Human herpesvirs 7: Another casual agent for roseola (exanthem subitum). *The Journal of Pediatrics*, 125(1). Acesso em 11 de 7 de 2018
- Tandon, R., & Mocarski, E. S. (8 de 2012). Viral and host control of cytomegalovirus maturation. *Trends in Microbiology*, 20(8), 392-401. doi:10.1016/j.tim.2012.04.008.
- Tohru Takahashi et al. (2006). Methylprednisolone Pulse Therapy for Severe Immune Thrombocytopenia Associated With Infectious Mononucleosis. *American Journal of Hematology*, 82(5), 416-417. doi:10.1002/ajh.20825
- Tselis, A. C. (2014). Cytomegalovirus infections of the adult human nervous system. Em A. Tselis, J. Booss, A. Tselis, & J. Booss (Eds.), *Handbook of Clinical Neurology* (3 ed., Vol. 123, pp. 301-318). Elsevier. Acesso em 15 de 6 de 2018
- Tselis, A. C. (2014). Epstein-Barr virus infections of the nervous system. Em A. Tselis, J. Booss, A. Tselis, & J. Booss (Eds.), *Handbook of Clinical Neurology* (3 ed., Vol. 123, pp. 285-305). Elsevier. Acesso em 15 de 6 de 2018
- Tsuchiya, S., Yamabe, M., Yamaguchi, Y., Kobayashi, Y., Konno, T., & Tada, K. (1980). Establishment and Characterization of a human acute monocytic leukemia cell line (THP-1). *Int. J. Cancer*, 26, 171-176. Acesso em 6 de 7 de 2018
- Vancíková, Z., & Dvořák, P. (2001). Cytomegalovirus Infection in Immunocompetent and Immunocompromised Individuals – A Review. *Current Drug Targets - Immune, Endocrine & Metabolic Disorders*, 1, 179-187. Acesso em 29 de 5 de 2018
- Vasileios Bolis, C. K. (2016). Atypical manifestations of Epstein-Barr virus in children: a diagnostic challenge. *J. Pediatr*, 92(2), 113-121. doi:10.1016/j.jpmed.2015.06.007
- Villo, L., & O'Brien, N. (2018). An Usual Presentation of EBV Meningoencephalitis. *Critical Care Medicine*, 46(1). Acesso em 6 de 6 de 2018

- Ward, K., Kalima, P., MacLeod, K., & Riordan, T. (2002). Neuroinvasion During Delayed Primary HHV-7 Infection in an Immunocompetent Adult With Encephalitis and Flaccid Paralysis. *Journal of Medical Virology*, *67*, 538-541. doi:10.1002/jmv.10135
- Weinberg, A., Bloch, K. C., Li, S., & Tang, Y.-W. (2005). Dual Infections of the Central Nervous System with Epstein-Barr Virus. *The Journal of Infectious Diseases*, *191*, 234-237. doi:0022-1899/2005/19102-0012\$15.00
- Williams, S. L., Hartline, C. B., Kushner, N. L., Harden, E. A., Bidanest, D. J., Drach, J. C., . . . Kern, E. R. (July de 2003). In Vitro Activities of Benzimidazole D- and L-Ribonucleosides against Herpesvirus. *Antimicrobial Agents and Chemoterapy*, *47*(7), 2186-2192. Acesso em 6 de 7 de 2018
- Yamanishi, K., Okuno, T., Shiralki, K., Takahashi, M., Kondo, T., Asano, Y., & Kurata, T. (14 de May de 1998). IDENTIFICATION OF HUMAN HERPESVIRUS-6 AS A CAUSAL AGENT FOR EXANTHEM SUBITUM. *The Lancet*, *1*, 1065-1067. Acesso em 29 de 5 de 2018
- Yoshida, M., Yamada, M., Tsukazaki, T., Chatterjee, S., Lakeman, F. D., Nii, S., & Whitley, R. J. (1998). Comparison of antiviral compounds against human herpesvirus 6 and 7. *Antiviral Research*, *40*, 73-84. Acesso em 29 de 5 de 2018
- Zornig, S. M.-J. (2008). As teorias sexuais infantis na atualidade: algumas reflexões. *Psicologia em Estudo*, *13*(1), 73-77. Acesso em 28 de 12 de 2019