

DANILO BRETAS DE OLIVEIRA

**DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO DE UMA
PLATAFORMA DE DIAGNÓSTICO PARA
MENINGOENCEFALITES VIRAIS POR PCR EM TEMPO
REAL**

Orientadora: Profa. Dra. Erna Geessien Kroon

Co-orientador: Dr. Gabriel Magno de Freitas Almeida

Co-orientador: Prof. Dr. Jônatas Santos Abrahão

Belo Horizonte Janeiro de 2015

DANILO BRETAS DE OLIVEIRA

**DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO DE UMA
PLATAFORMA DE DIAGNÓSTICO PARA
MENINGOENCEFALITES VIRAIS POR PCR EM TEMPO
REAL**

Tese de doutorado 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 doutor em Microbiologia.

Orientadora: Profa. Dra. Erna Geessien Kroon

Co-orientador: Dr. Gabriel Magno de Freitas Almeida

Co-orientador: Prof. Dr. Jônatas Santos Abrahão

Belo Horizonte Janeiro de 2015

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	7
LISTA DE TABELAS	10
LISTA DE ABREVIATURAS.....	11
I. INTRODUÇÃO	17
1.1. INFECÇÕES VIRAIS NO SISTEMA NERVOSO CENTRAL (SNC)	18
1.2. AGENTES VIRAIS CAUSADORES DE MENINGOENCEFALITES	22
1.2.1. VÍRUS DA FAMÍLIA <i>Picornaviridae</i>	22
1.2.1.1.VÍRUS DO GÊNERO <i>Enterovirus</i>	24
1.2.1.1.1. INFECÇÃO NO SNC POR VÍRUS DO GÊNERO <i>Enterovirus</i>	26
1.2.1.1.2. DIAGNÓSTICO	27
1.2.2. VÍRUS DA FAMÍLIA <i>Herpesviridae</i>	28
1.2.2.1. VÍRUS DO GÊNERO <i>Simplexvirus</i>	30
1.2.2.1.1 INFECÇÃO NO SNC POR HHV-1 E HHV-2	32
1.2.2.2. VÍRUS DO GÊNERO <i>Varicellovirus</i>	33
1.2.2.2.1 INFECÇÃO NO SNC POR VZV	34
1.2.2.3. VÍRUS DO GÊNERO <i>Cytomegalovirus</i>	35
1.2.2.3.1 INFECÇÃO NO SNC POR CMV	36
1.2.2.4. DIAGNÓSTICO	37
1.2.3. VÍRUS DA FAMÍLIA <i>Flaviviridae</i>	38
1.2.3.1. <i>Flavivirus</i>	40
1.2.3.1.1 INFECÇÕES NO SNC POR FLAVIVÍRUS.....	42
1.2.3.2. DIAGNÓSTICO	42
1.3. PCR EM TEMPO REAL	43
II. JUSTIFICATIVA	50
III. OBJETIVOS	54
3.1. OBJETIVO GERAL	55
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	55
IV. FLUXOGRAMA DE TRABALHO.....	57
V. MATERIAIS E MÉTODOS.....	58
5.1. VÍRUS	59
5.2. OBTENÇÃO DE PLASMÍDIOS CONTROLES	59
5.2.1. SELEÇÃO DOS INICIADORES E SONDAS	59

5.2.2. EXTRAÇÃO DE RNA VIRAL.....	61
5.2.3. PRODUÇÃO DE cDNA	62
5.2.4. EXTRAÇÃO DE DNA	62
5.2.5. TESTE DO INICIADORES “ <i>in vitro</i> ”	63
5.2.6. EXTRAÇÃO DE DNA DO GEL.....	64
5.2.7. LIGAÇÃO DOS PRODUTOS DE PCR AO VETOR PGEM-T.....	65
5.2.8. TRANSFORMAÇÃO BACTERIANA (SAMBROOK <i>ET AL</i> , 1989).....	65
5.2.9. TRIAGEM DAS COLÔNIAS	66
5.2.10. OBTENÇÃO DE DNA PLASMIDIAL EM PEQUENA ESCALA.....	66
5.2.10.1. QUANTIFICAÇÃO DO NÚMERO DE CÓPIAS PLASMIDIAIS.....	67
5.2.11. SEQUENCIAMENTO	67
5.2.12. ANÁLISE DAS SEQUÊNCIAS	68
5.3. PADRONIZAÇÃO E VALIDAÇÃO DA PLATAFORMA DE qPCR - SYBR GREEN®	68
5.3.1. TESTE DE EFICÊNCIA DOS INICIADORES.....	68
5.3.2. TESTE DE ESPECIFICIDADE	69
5.3.3. AVALIAÇÃO DE MÉTODOS DE PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS	69
5.3.3.1. PADRÕES DE LCR MIMÉTICO.....	70
5.3.3.2. EXTRAÇÃO DE RNA POR TRIZOL®	70
5.3.4. TESTE DE SENSIBILIDADE ANALÍTICA	71
5.3.5. CONCENTRAÇÃO DOS INICIADORES.....	71
5.3.6. REPETIBILIDADE	72
5.3.7. REPRODUTIBILIDADE	72
5.4. CONTROLE INTERNO	73
5.4.1. CONTROLE INTERNO EXÓGENO	73
5.4.2. CONTROLE INTERNO ENDÓGENO.....	74
5.5. TESTES TAQMAN®	74
5.5.1. TESTES TAQMAN® “two steps”	74
5.5.2. TESTES TAQMAN® “one step”	75
5.5.3. EXTRAÇÃO DE RNA POR MICROESFERAS MAGNÉTICAS - FLAVIVÍRUS	76
5.6. AVALIAÇÃO DA PLATAFORMA DE DIAGNÓSTICO.....	76
VI RESULTADOS.....	79

6.1 PADRONIZAÇÃO DA qPCR	80
6.1.1 TESTES DOS INICIADORES	80
6.1.2 OBTENÇÃO DE PLASMÍDEOS CONTROLES	84
6.1.3 TESTE DE EFICIÊNCIA DOS INICIADORES	85
6.1.4. PADRONIZAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE INICIADORES	88
6.2. SELEÇÃO DE MÉTODO PARA O PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS DE LCR	92
6.2.1 VÍRUS DE DNA – HHV-1	93
6.2.3 VIRUS DE RNA – <i>Poliovirus</i>	94
6.3 ALGORITMO PARA PROCESSAMENTO DA AMOSTRA LCR PARA PLATAFORMA DE qPCR.....	94
6.4. TESTE DE SENSIBILIDADE ANALÍTICA	95
6.5. TESTE DE ESPECIFICIDADE ANALÍTICA.....	97
6.6 REPETIBILIDADE	99
6.7 REPRODUTIBILIDADE	101
6.8. CONTROLES INTERNOS.....	103
6.8.1 ENDÓGENO	103
6.8.2. CONTROLE EXÓGENO	104
6.9. DESENVOLVIMENTO DE TESTES TAQMAN®.....	105
6.9.1 COMPARAÇÃO DOS TESTES SYBR® E TAQMAN®	107
6.10. DESENVOLVIMENTO DE TESTES PARA IDENTIFICAÇÃO DE FLAVIVÍRUS	109
6.10.1 TESTES PARA DETECÇÃO DE FLAVIVÍRUS POR qPCR – TAQMAN® “ONE STEP”	109
6.10.2 PURIFICAÇÃO DE RNA POR MICROESFERAS MAGNÉTICAS MARCADAS	114
6.11. APLICAÇÃO DA PLATAFORMA DE qPCR	117
6.11.1. PACIENTES COM SUSPEITA DE INFECÇÃO VIRAL NO SNC	118
6.11.1.1. INFORMAÇÕES CLÍNICAS DOS PACIENTES	118
6.11.1.2. DETECÇÃO MOLECULAR DE AGENTES VIRAIS.....	119
6.11.1.3. ANÁLISE DE FATORES CITO-QUÍMICOS E CARACTERÍSTICAS DA HOSPITALIZAÇÃO POR GRUPO VIRAL IDENTIFICADO	121
6.11.1.4. PACIENTES COM MENINGITE BACTERIANA	123
6.11.1.5. PACIENTES COM OUTRAS MORBIDADES.....	124

6.11.2. SEQUENCIAMENTO E ANÁLISE FILOGENÉTICA DE AMOSTRAS POSITIVAS NA PLATAFORMA	125
6.11.3. QUANTIFICAÇÃO ABSOLUTA.....	129
6.11.3.1 CORRELAÇÃO ENTRE NºCÓPIAS/mL E PFU/mL	133
6.11.4.APLICAÇÃO DA PLATAFORMA DE DIAGNÓSTICO EM CASOS CLÍNICOS GRAVES	134
6.11.4.1. CASO 1– INFECÇÃO NO SNC POR <i>Dengue vírus 3</i> GENÓTIPO I	134
6.11.4.2. CASO 2 – CASO FATAL DE INFECÇÃO NO SNC POR <i>Enterovirus A</i>	136
6.11.5. APLICAÇÃO DOS TESTES TAQMAN®	137
6.11.6. APLICAÇÃO DA PLATAFORMA EM OUTROS “ESPECIMENS” CLÍNICOS	138
6.11.6.1 DIAGNÓSTICO DE ENTV – SWAB ORAL E SANGUE	138
6.11.6.2 DIAGNÓSTICO DE HERPES ZOSTER – SWAB.....	139
VII. DISCUSSÃO.....	141
VIII. CONCLUSÕES.....	151
IX. PERSPECTIVAS	153
X. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	154
XI. ANEXOS.....	166

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Incidência de meningite por etiologia no estado de São Paulo	109
Figura 2: Rotas de entrada no SNC utilizadas por vírus..	20
Figura 3: Árvore de decisão de análise do LCR para diagnóstico de infecções no SNC.....	22
Figura 4: Morfologia dos picornavírus.	23
Figura 5: Morfologia dos herpes vírus	30
Figura 6: Lesões características de infecção por HHV-1 e HHV-2.....	31
Figura 7: Patogênese HHV-1 e HHV-2.....	32
Figura 8: Lesão característica da varicela.	33
Figura 9: Lesão característica de herpes zoster.....	34
Figura 10: Morfologia flavivírus	39
Figura 11: Países ou áreas com risco de transmissão de dengue.	411
Figura 12: TaqMan® vs SYBR®.	44
Figura 13: Posicionamento do limiar de reação para definição do Ct	47
Figura 14: Teste dos iniciadores HHV-1/2 para padronização da qPCR.....	80
Figura 15: Teste dos iniciadores HHV-3 para padronização da qPCR.....	81
Figura 16: Teste dos iniciadores ENTV para padronização da qPCR.....	82
Figura 17: Teste dos iniciadores FLAV para YFV para padronização da qPCR.	82
Figura 18: Teste dos iniciadores FLAV para DENV para padronização da qPCR.....	83
Figura 19: Eletroforese de produtos da qPCR obtidos a partir das reações para padronização da qPCR.	83
Figura 20: Alinhamento das sequências de nucleotídeos dos plasmídeos controle.	85
Figura 21: Teste de eficiência dos iniciadores HHV-1/2 na plataforma de qPCR.	86
Figura 22: Teste de eficiência dos iniciadores HHV-3 na plataforma de qPCR.	87
Figura 23: Teste de eficiência dos iniciadores ENTV.	87
Figura 24: Teste de eficiência dos iniciadores FLAV.....	88
Figura 25: Padronização da concentração dos iniciadores HHV-1/2 na plataforma qPCR.....	90
Figura 26: Padronização da concentração dos iniciadores ENTV na plataforma qPCR.....	91
Figura 27: Padronização da concentração dos iniciadores FLAV na plataforma qPCR.....	92
Figura 28: Processamento LCR contendo vírus de DNA para emprego na plataforma de qPCR.....	93
Figura 29: Processamento LCR contendo vírus de DNA para emprego na plataforma de qPCR.....	94

Figura 30: Algoritmo para processamento de LCR.	95
Figura 31: Teste de sensibilidade analítica HHV-1/2 na plataforma qPCR	96
Figura 32: Teste de sensibilidade analítica ENTV na plataforma qPCR.	96
Figura 33: Teste de sensibilidade analítica FLAV na plataforma qPCR.	97
Figura 34: Testes de especificidade analítica na plataforma qPCR.	98
Figura 35: Análise de repetibilidade com iniciadores para HHV-1/2 da plataforma qPCR.....	99
Figura 36: Análise de repetibilidade com iniciadores para ENTV da plataforma qPCR.....	100
Figura 37: Análise de repetibilidade com iniciadores para FLAV da plataforma qPCR.....	101
Figura 38: Análise de reprodutibilidade com iniciadores para HHV-1/2 da plataforma qPCR.....	102
Figura 39: Análise de reprodutibilidade com iniciadores para ENTV da plataforma qPCR.....	102
Figura 40: Análise de reprodutibilidade com iniciadores para FLAV da plataforma qPCR.....	105
Figura 41: Reação controle interno endógeno da plataforma de qPCR empregando o plasmídeo contendo o gene da beta actina	104
Figura 42: Reação controle interno exógeno da plataforma de qPCR empregando o plasmídeo contendo o gene “green fluorescent protein” (GFP).	105
Figura 43: Teste de sensibilidade analítica TaqMan® HHV-1/2 na plataforma qPCR	106
Figura 44: Teste de sensibilidade analítica TaqMan® ENTV na plataforma qPCR.....	107
Figura 45: Comparação TaqMan® vs SYBR® HHV-1/2.	108
Figura 46: Comparação TaqMan® vs SYBR® ENTV.....	109
Figura 47: Teste de sensibilidade analítica para os ensaios “singleplex” para detecção de JEV, SLEV, WNV, YFV e DENVs 1-4 por qPCR.	111
Figura 48: Teste de sensibilidade analítica para os ensaios “multiplex” para detecção de JEV, SLEV, WNV, YFV e DENVs 1-4 por qPCR.	114
Figura 49: Idade dos pacientes com suspeita de meningite viral.	119
Figura 50: Percentual de detecção por qPCR de LCR de pacientes com suspeita de meningite viral.....	119
Figura 51: Agentes virais detectados em LCR de pacientes com suspeita de infecção viral no SNC.....	120
Figura 52: Características cito-químicas das amostras de LCR de pacientes.	122
Figura 53: Tempo de internação dos pacientes com infecção no SNC por ENTVs, HHV e DENV.	123
Figura 54: Detecção viral em amostras onde bactérias foram previamente detectadas no LCR.....	124

Figura 55: Alinhamento de sequencias de amostras positivas para ENTV, HHV-1/2 e HHV-3.....	126
Figura 56: Árvore filogenética da região 5`UTR dos ENTV detectados na plataforma qPCR.....	128
Figura 57: Linearização da curva padrão HHV-1	130
Figura 58: Linearização da curva padrão poliovírus.....	131
Figura 59: Carga viral de amostras com detecção de ENTV e relação com tempo de internação.....	133
Figura 60: Comparação de padrões cópias/mL vs pfu/mL	134
Figura 61: Diagnóstico Caso 1 empregando a plataforma qPCR.....	135
Figura 62: Diagnóstico Caso 2 empregando a plataforma qPCR.....	137
Figura 63: Aplicação do teste TaqMan® para detecção de ENTV	138
Figura 64: Diagnóstico surto de ENTV B.....	139
Figura 65: Diagnóstico Herpes zoster emepregando a plataforma de qPCR.	140

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Comparação qPCR vs PCR convencional.	49
Tabela 2: Iniciadores da plataforma	60
Tabela 3: Iniciadores e sondas para detecção de Flavivírus.....	61
Tabela 4: Descrição das sondas utilizadas nos testes com sistema TaqMan® e a fluorescência utilizada	106
Tabela 5: Eficiência dos ensaios para detecção de WNV, SLEV, YFV e JEV por qPCR.....	110
Tabela 6: Teste de sensibilidade analítica para os ensaios de detecção de DENVs por qPCR*.	112
Tabela 7: Teste de sensibilidade analítica para os ensaios de detecção de JEV, SLEV, WNV e YFV por qPCR *.	113
Tabela 8: “Oligoprobes” desenhadas para purificação de RNA viral.	115
Tabela 9: Extração de RNA viral com “oligoprobes”.....	116
Tabela 10: Extração de RNA viral por “oligoprobes” em diferentes volumes de amostra.	117
Tabela 11: Sintomas e sinais dos pacientes na admissão no HIJPII.	121
Tabela 12: Detecção viral em LCR de pacientes com diagnóstico descartado de infecção no SNC.	125
Tabela 13: Similaridade genética entre as amostras de ENTV detectadas e amostras depositadas no GenBank.	129
Tabela 14: Carga viral de amostras com detecção de ETNV.....	132

LISTA DE ABREVIATURAS

AIDS- Síndrome da imunodeficiência humana

ATCC – American Type Culture Collection

ATP – Adenosina trifosfato

cDNA – DNA complementar

CMC – Carboxi-Metil-Celulose

CO₂ – Dióxido de carbono

dCTP – dideoxicitosina trifosfato

DENV-1- *Dengue virus 1*

DENV-2- *Dengue virus 2*

DENV-3- *Dengue virus 3*

DENV-4 – *Dengue virus 4*

dGTP – dideoxiguanidina trifosfato

DNA – Ácido desoxirribonucléico

dNTP – dideoxynucleotídeo trifosfato

DTT - Dithiothreitol

dTTP – dideoximidina trifosfato

ECP – Efeito citopático

EDTA – ácido etilenodiaminotetracético

ENV- Enterovírus

ELISA – Enzime-linked immunosorbent assay

EUA – Estados Unidos da América

FEHMIG- Fundação Hospitalar do estado de Minas Gerais

h – horas

HCl – Ácido clorídrico

HHV-1- Human herpes virus 1

HHV-2- Human herpes virus 2

HHV-3 - Human herpes virus 3

HHV-5- - Human herpes virus 5

ICTV – International Committee on Taxonomy of Viruses

kb - quilobase

KCl – Cloreto de potássio

L – litro

LB – meio de Luria-Bertani

LCR- Líquido cefaloraquidiano

M – molar

MEGA – Molecular Evolutionary Genetics Analysis

µg - micrograma

mg – miligrama

MG – Minas Gerais

MgCl₂ – Cloreto de magnésio

min - minutos

μL - microlitro

mL – mililitro

mM - milimolar

m.o.i. – multiplicidade de infecção

mRNA – RNA mensageiro

NaCl – Cloreto de sódio

NaHCO_3 – Bicarbonato de sódio

Na_2HPO_4 – Hidrogenofosfato de sódio

ng - nanograma

nm - nanômetro

nt - nucleotídeos

OMS- Organização mundial de saúde

p - peso

pb – pares de bases

PBS – Tampão salina fosfato

PCR – Reação em Cadeia da Polimerase

pH – Potencial hidrogeniônico

RNA – Ácido ribonucleico

rpm – rotações por minuto

RT – Transcrição reversa

s - segundos

SES-SP- Secretaria de estado da saúde de São Paulo

SFB – Soro fetal bovino

SNC- Sistema nervoso central

ssRNA- Rna fita simples

TAE – Tris acetato de EDTA

TE – Tris EDTA

U - Unidades

UFMG – Universidade Federal de Minas Gerais

UFP – Unidade formadora de placa

UV – Ultravioleta

v – volume

V - volts

VPG -Proeina Viral Ligada ao Genoma

VZV- Human herpes virus 3

RESUMO

Infecções no sistema nervoso central (SNC) apresentam distribuição global, acometendo populações em todas as partes do globo. Infecções virais são as principais causas de infecção no SNC em todo o mundo. No Brasil, em média, são notificados 11.500 casos/ano de meningite/meningoencefalite com provável etiologia viral. Entretanto, para a maioria dos casos não há identificação do agente etiológico. Assim, o objetivo deste trabalho foi a utilização da PCR em tempo real (qPCR) para desenvolvimento e avaliação de uma plataforma de diagnóstico para meningoencefalites causadas por vírus. Para isso, foram utilizadas amostras de agentes virais causadores de meningite para obtenção de plasmídeos controle e para padronização da PCR. Foram desenhados iniciadores específicos para detecção de cada vírus separadamente ou grupos virais. Todas as reações desenvolvidas foram padronizadas e apresentaram eficiência satisfatória: ENTV 110%; FLAV 92%; HHV-1/2 114%; HHV-3 113%; SLEV 94%; YFV 96%; JEV 97%; WNV 98%. Todos os testes foram específicos na detecção do alvo e sensíveis, com sensibilidade analítica inferior ou igual a 10 cópias/mL. Os ensaios desenvolvidos apresentaram coeficiente de variação inferior a 5% em testes de reprodutibilidade e de repetibilidade. Além dos ensaios baseados em qPCR foram padronizadas etapas pré-analíticas para aumentar a eficiência de detecção viral. A plataforma de diagnóstico foi avaliada em amostras clínicas de líquido cefalorraquidiano (LCR), sendo capaz de detectar vírus em 62,9% das amostras de pacientes com suspeita de meningoencefalite viral. Foram detectados ENTVs (70%), HHV-3 (13%), DENVs (11%), HSV-1/2 e HHV-5 (2%). O DNA amplificado de amostras de LCR positivas foi sequenciado e os resultados da plataforma qPCR foram confirmados. Também foram detectados vírus em amostras de pacientes com diagnóstico de meningite bacteriana. A plataforma desenvolvida foi eficiente para o diagnóstico de infecções no SNC e apresenta potencial de aplicação no sistema de saúde.

ABSTRACT

Infections on central nervous system (CNS) have a global distribution, affecting people worldwide. Viral infections are the main cause of infection in the CNS. In Brazil, on average, 11,500 cases/year of meningitis/meningoencephalitis with probable viral etiology are reported. However, most cases there are no identification of the etiologic agent. The objective of this work was the use of real time PCR (qPCR) for development and evaluation of a platform of diagnostic for meningoencephalitis caused by viruses. Viruses were used to obtain plasmids for control and standardization of qPCR. Specific primers were designed to detect each virus or viral groups. All reactions were standardized and presented efficiency of: ENTV 110%; FLAV 92%; HHV-1/2 114%; HHV-3 113%; SLEV 94%; YFV 96%; 97% JEV; 98% WNV. All tests were specific in the target detection and analytical sensitivities were equal or less to 10 copies/ml. The developed tests showed coefficient of variation less than 5% in reproducibility and repeatability assays. In addition to qPCR assays pre-analytical steps were standardized to improve viral detection efficiency. Finally, the qPCR platform was applied on clinical samples of cerebrospinal liquid (CSF), and it was able to detect the virus in 62.9% of samples from patients with suspected viral meningoencephalitis. ENTVs were detected (70%), HHV-3 (13%), DENVs (11%), HSV-1/2 and HHV-5 (2%). The amplified DNAs in qPCR positive samples were sequenced and the results were confirmed. Viruses were also detected in samples of patients with bacterial meningitis. So the developed platform showed high efficiency for diagnosis of infections in CNS and has a potential use in health system.

I. INTRODUÇÃO

1.1. INFECÇÕES VIRAIS NO SISTEMA NERVOSO CENTRAL (SNC)

Infecções virais são as principais causas de infecção no sistema nervoso central (SNC) em todo o mundo Superando as infecções causadas por bactérias fungos e protozoários (OMS, 2014).

As infecções virais no SNC podem levar a uma inflamação do encéfalo (encefalite), que é acompanhada de alteração funcional, e também uma inflamação das meninges (meningite). Apesar dessa diferenciação teórica, as apresentações clínicas são frequentemente mistas, sendo assim muito utilizado o termo “meningoencefalite” (ZIAI & LEWIN, 2008). A gravidade do dano gerado no SNC pela infecção viral é determinada por uma combinação de fatores da resposta imune do hospedeiro e a neurovirulência do vírus infectante. Assim sendo condições de imunossupressão como, por exemplo, AIDS e tratamento com imunossupressores levam a doenças com pior prognóstico (TYLER, 2009).

As meningoencefalites virais caracterizam-se por um quadro clínico de alterações neurológicas, que pode evoluir desde formas benignas até muito graves. A gravidade dependerá do agente etiológico, diagnóstico precoce, da faixa etária e estado imune do paciente (BAMBERGER, 2010; SES-SP, 2006; ROTBART *et al.*, 1998). Um estudo desenvolvido em 2013 avaliou o impacto econômico de meningoencefalites virais no sistema de saúde, sugerindo que o custo médio de uma criança diagnosticada com meningoencefalite viral é de aproximadamente R\$ 15.000,00 (NIGROVIC *et al.*, 2013).

No Brasil, em média, são notificados 11.500 casos/ano de meningoencefalites com provável etiologia viral. Entretanto, para a maioria dos casos não há identificação do agente etiológico. A Figura 1 apresenta os coeficientes das meningites por etiologia no Estado de São Paulo, entre os anos de 1990 e 2005, com destaque para as meningites não determinadas, na qual estão inseridas as meningoencefalites de provável etiologia viral (SES-SP, 2006).

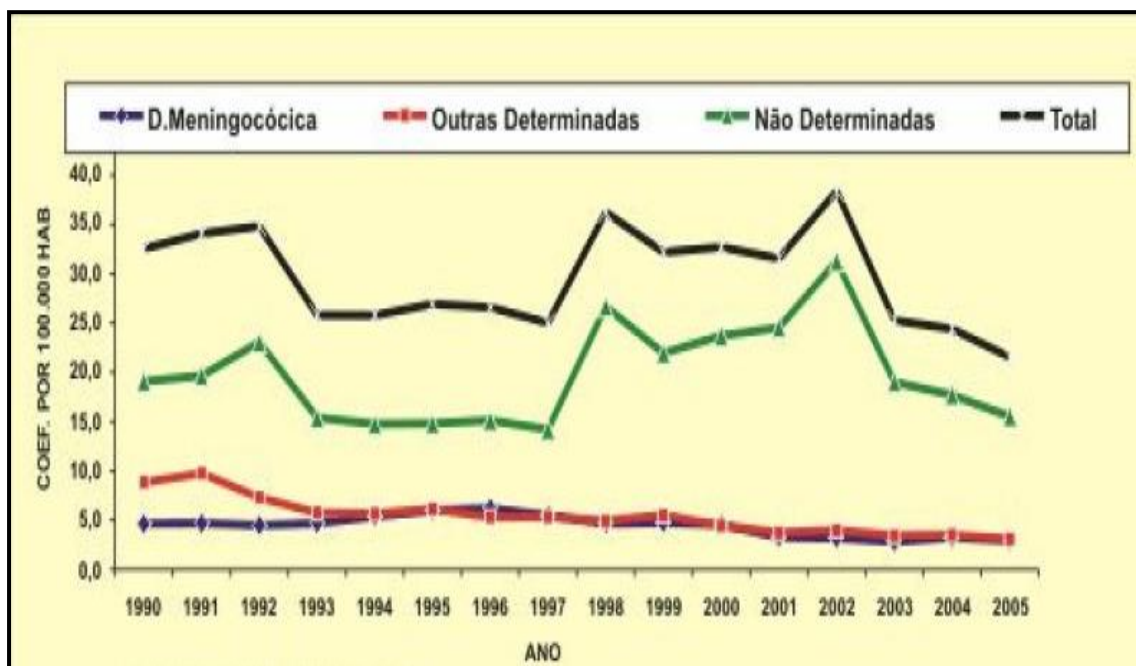


Figura 1: Incidência de meningite por etiologia no estado de São Paulo. Coeficientes de incidência de meningite (p/100.000 hab.) segundo etiologia no estado de São

Fonte: Secretaria de estado da Saúde de São Paulo

As meningoencefalites virais podem ser causadas por vários diferentes vírus. Os enterovírus são responsáveis pela maioria dos casos identificados de meningoencefalite viral nos Estados Unidos da América (EUA). Herpes vírus neurotrópicos e vírus do gênero *Flavivirus* são importantes agentes etiológicos da meningoencefalite (SOARES *et al.*, 2011; OLSEN *et al.*, 2015; ORY *et al.*, 2013; BASTOS *et al.*, 2014). O primeiro passo para estes vírus conseguirem atingir o SNC e estabelecer uma infecção é a entrada, para isso estes vírus neurotrópicos utilizam rotas diversas (FIGURA 2). Os herpes vírus invadem o SNC através de infecção inicial em neurónios sensoriais de gânglios do sistema nervoso periférico (SNP) (FIGURA 2A e 2C). As principais “rotas” de invasão utilizadas pelos flavivírus e enterovírus são a penetração direta na barreira hemato encefálica ou utilizando a estratégia de “cavalo de Tróia” onde infectam leucócitos que tem acesso ao SNC (FIGURA 2D) (KOYUNCU *et al.*, 2013).

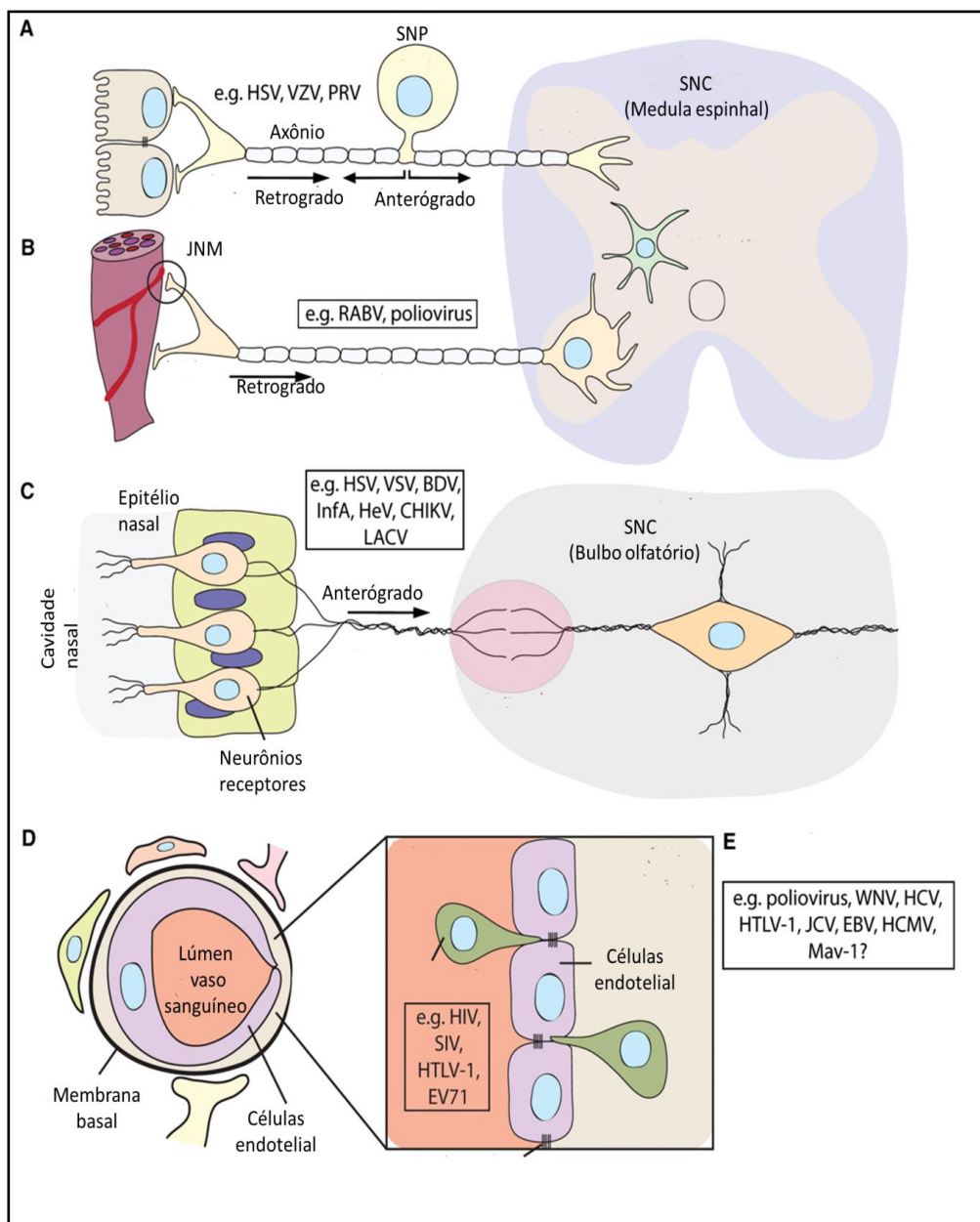


Figura 2: Rotas de entrada no SNC utilizadas por vírus. A) Herpes vírus (por exemplo, HSV-1, VZV, e PRV) neurônios sensoriais de gânglios do sistema nervoso periférico (SNP). B) Rabdovírus (RABV) e poliovírus infectam neurônios motores da medula espinhal espalhar via junções neuromusculares (JNM). C) Vários vírus podem infectar neurônios receptores no epitélio nasal. Para que atinjam o SNC é necessário um transporte axonal anterógrado ao longo do nervo olfativo. D) Infiltração através barreira hematoencefálica (BHE). A BHE é composta de células endoteliais microvasculares cerebrais em torno membrana basal dos vasos, astrócitos e neurônios. Leucócitos infectados podem atravessar essa barreira transportando vírus no parênquima cerebral. E) Em alternativa, as partículas de vírus na corrente sanguínea pode infectar BMVECs, comprometendo a certificação.

Siglas: pseudorabies virus (PRV); bovine herpes vírus (BHV); vesicular stomatitis virus (VSV), borna disease vírus (BDV); influenza A vírus (InfA); hendra vírus (HeV); Chikungunya vírus

(CHIKV); immunodeficiency vírus (SIV); human immunodeficiency vírus (HIV); human T cell leukemia vírus (HTLV), La Crosse vírus (LACV); mouse adenovirus 1 (MAV-1); enterovirus 71 (EV71); JC vírus (JCV); Epstein- Barr vírus (EBV); human citomegalovírus (HCMV); mouse adenovírus 1 (MAV-1).

Fonte: Koyuncu *et al.*, 2013 -Modificado

Meningoencefalites virais ocorrem como epidemias e como casos esporádicos. O aumento nos casos de meningoencefalites virais causadas por enterovírus é geralmente observado no verão e no outono. Meningoencefalites associadas à enterovírus são mais comuns em crianças pequenas. A incidência de meningoencefalites por flavivírus reflete os padrões sazonais dos vetores artrópodes responsáveis pela transmissão (SOARES *et al.*, 2011; ORY *et al.*, 2013; BASTOS *et al.*, 2014).

Apesar de já serem descritos informações sobre a etiologia das meningoencefalites virais na população de países desenvolvidos este ainda é um grande desafio para países em desenvolvimento como o Brasil (ORY *et al.*, 2013, NIGROVIC *et al.*, 2013). O conhecimento dos agentes etiológicos das meningoencefalites virais no Brasil é de extrema importância para nosso sistema de saúde, pois estes agentes podem apresentar uma prevalência diferente de outros países não tropicais (SOARES *et al.*, 2011; BASTOS *et al.*, 2014). Além disso, as meningoencefalites virais constituem um problema de saúde pública nacional e mundial, por sua capacidade de produzir surtos. Todos os casos suspeitos devem ser notificados e investigados de forma oportuna e adequada, o que ressalva a importância do diagnóstico do agente etiológico (SES-SP, 2006).

Atualmente no sistema de saúde brasileiro são poucos os testes laboratoriais de rotina para o diagnóstico dos principais vírus causadores de Meningoencefalites (SES-SP, 2006). Os achados laboratoriais comumente que são utilizados na rotina para guiar o diagnóstico de infecções virais no SNC são a quantificação de células, glicose e proteína no LCR. Sendo que em infecções virais é comum encontrar menos que 500 células leucocitárias por mL (normalmente <200), concentrações de glicose normais (45-80 mg/dL) ou

levemente aumentado e um aumento na concentração de proteínas (20- 45 mg/dL são valores nomais) (CHADWICK *et al.* 2006). Em conjunto com os dados citoquímicos do LCR o uso do diagnóstico molecular é extremamente importante para integrar os algoritmos de diagnóstico de infecções no SNC por vírus estabelecidos na literatura (FIGURA 3) (DOMINGUES & TEIXEIRA, 2009).

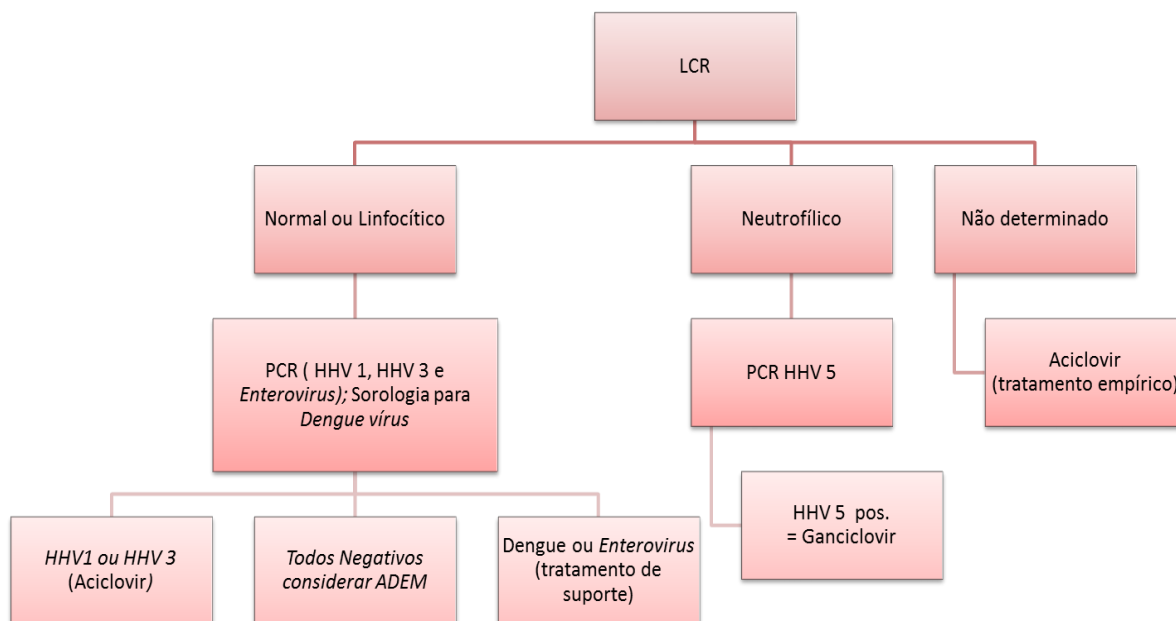


Figura 3: Árvore de decisão de análise do LCR para diagnóstico de infecções no SNC
 Fonte: DOMINGUES & TEIXEIRA, 2009 (MODIFICADO)

1.2. AGENTES VIRAIS CAUSADORES DE MENINGOENCEFALITES

1.2.1. VÍRUS DA FAMÍLIA *Picornaviridae*

A família *Picornaviridae* é composta por vinte e seis gêneros: *Aphthovirus*, *Aquamavirus*, *Avihepatovirus*, *Avisivirus*, *Cardiovirus*, *Cosavirus*, *Dicipivirus*, *Enterovirus*, *Erbovirus*, *Gallivirus*, *Hepatovirus*, *Hunnivirus*, *Kobuvirus*, *Megrivirus*, *Mischivirus*, *Mosavirus*, *Oscivirus*, *Parechovirus*, *Pasivirus*, *Passerivirus*, *Rosavirus*, *Salivirus*, *Sapelovirus*, *Senecavirus*, *Teschovirus* e *Tremovirus* (INTERNATIONAL COMMITTEE ON TAXONOMY OF VIRUSES [ICTV], 2013).

Vírus da família *Picornaviridae* não são envelopados que apresentam simetria icosaédrica, com dimensões entre 22 e 30nm. Estes são os vírus com menores dimensões que infectam animais. O termo picornavírus remete à natureza estrutural dos vírus desta família (pico=pequeno, RNA=ácido nucléico presente na partícula) (ALEXANDER *et al.*, 1994). O genoma destes vírus é constituído de RNA fita simples (ssRNA) de polaridade positiva com aproximadamente 7500 b incluindo uma cauda de poliadenilação. O RNA viral é infeccioso, por apresentar a capacidade de ser traduzido após a sua entrada no citoplasma da célula. O genoma produz uma poliproteína, que posteriormente é clivada por duas proteases virais em proteínas individuais, sendo quatro delas formadoras do capsídeo, presentes na maioria dos picornavírus (VP1, VP2, VP3 e VP4). Em alguns picornavírus foi descrita a existência de um “bolso hidrofóbico” (hydrophobic pocket) associado à proteína VP1, sendo este alvo de fármacos inibidores de adsorção e desnudamento, como o plecornaril, utilizado no tratamento de resfriados comuns causados por rinovírus. O genoma de RNA dos picornavírus é único porque apresenta uma proteína denominada VPg covalentemente ligada à extremidade 5` do RNA viral (Proteína Viral Ligada ao Genoma)(Figura 4)(LEE *et al.* 1977). O papel de VPg ainda é desconhecido, embora seja sabido que esta proteína é clivada por uma protease celular após a penetração, sendo este um passo hipoteticamente importante (mas não essencial) para o início da tradução.

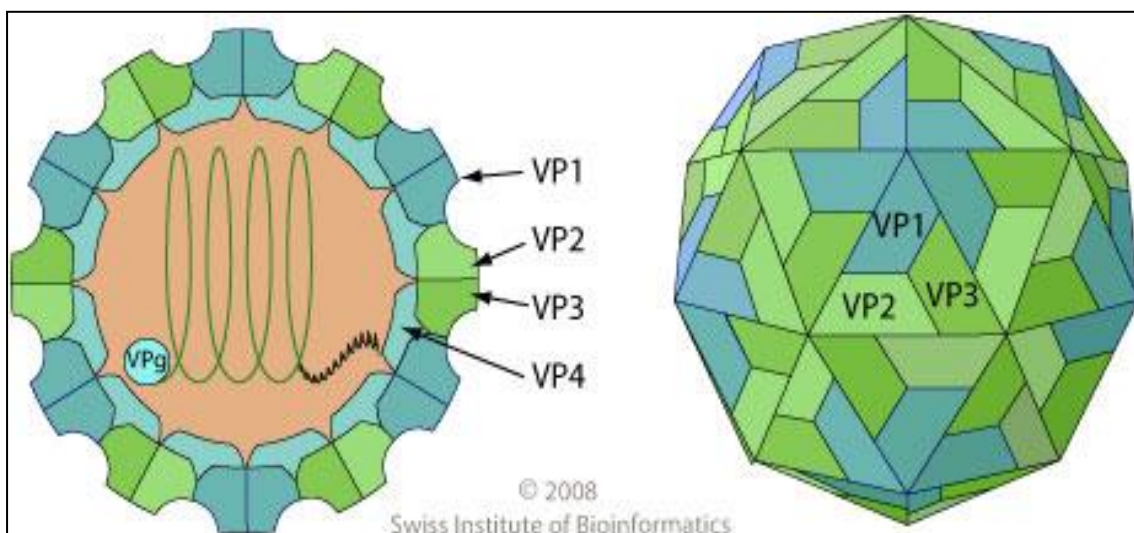


Figura 4: Morfologia dos picornavírus. Esquema representativo da simetria da partícula viral e organização das proteínas VPs (1-4) dos picornavírus.

Essa família de vírus contém importantes patógenos humanos e também de outros animais, incluindo um vírus de hepatite (*Hepatitis A virus*), o poliovírus, o vírus causador da febre aftosa e o rinovírus (ALEXANDER *et al.*, 1994).

A maioria das infecções causadas por picornavírus são assintomáticas, porém vírus de alguns gêneros dão origem a doenças graves do SNC, coração, músculos esqueléticos e no fígado (RHOADES *et al.* 2011).

1.2.1.1.VÍRUS DO GÊNERO *Enterovirus*

O gênero *Enterovirus* é composto por 12 espécies: *Enterovirus A*, *Enterovirus B*, *Enterovirus C*, *Enterovirus D*, *Enterovirus E*, *Enterovirus F*, *Enterovirus G*, *Enterovirus H*, *Enterovirus J*, *Rhinovirus A*, *Rhinovirus B* and *Rhinovirus C* (INTERNATIONAL COMMITTEE ON TAXONOMY OF VIRUSES [ICTV], 2013).

As infecções por enterovírus são uma importante causa de morbidade e mortalidade em todo o mundo. Neste gênero encontramos notáveis patógenos humanos tais como os poliovírus (PV), os coxsackievírus (CV), e os enterovírus-71 (EV-71) (PALLANSCH & ROOS, 2007). Embora a maioria das infecções causadas por enterovírus sejam assintomáticas, há estimativas de 5 a 10 milhões de infecções sintomáticas causadas por enterovírus a cada ano nos EUA (STRIKAS *et al.*, 1986). As infecções causadas por enterovírus podem levar a doenças graves, especialmente em crianças e em indivíduos imunocomprometidos. Além disso, este grupo de vírus é a causa mais comum de meningite asséptica, a mais frequente causa de infecção no SNC. Enterovírus podem causar doenças crônicas e agudas. Doenças crônicas incluem a dermatomiosite, polimiosite, cardiomiopatia dilatada e diabetes mellitus (RHOADES *et al.* 2011; HORSTMANN, 1967).

Os enterovírus são distintos de outros picornavírus pelas suas características e propriedades físico-químicas. Muitos aspectos da patogênese dos enterovírus,

da transmissão e da epidemiologia geral estão diretamente relacionados com estas propriedades e com o seu ciclo de multiplicação. A partícula viral permanece estável em pH baixo, permitindo sua passagem no trato gastrointestinal. Além disso, a partícula viral é relativamente resistente a muitos desinfetantes, incluindo alguns utilizados em laboratórios e em ambiente hospitalar, incluindo o etanol 70%, o isopropanol e compostos de amônio quaternário (PALLANSCH & ROOS, 2007). O vírus é sensível a solventes lipídicos (provavelmente por agirem no “bolso hidrofóbico de VP1”), incluindo éter e clorofórmio, e é estável na presença de muitos detergentes à temperatura ambiente. O formaldeído, os ácidos forte, o hipoclorito de sódio e o cloro livre são capazes de inativar enterovírus, sobretudo por oxidação e desnaturação proteica. Porém, a concentração de matéria orgânica e o tempo de tratamento dos desinfetantes afetam o grau de inativação por esses compostos. Essas características físico-químicas relacionadas à partícula viral dos enterovírus garantem para esse os vírus do gênero uma grande estabilidade na natureza e alto potencial de transmissibilidade (PALLANSCH & ROOS, 2007).

Enterovírus podem ser isolados tanto no trato gastrointestinal superior quanto inferior de pessoas infectadas. A transmissão desses vírus ocorre principalmente pela via fecal-oral. Portanto, essa transmissão se agrava em áreas com condições sanitárias precárias, enquanto a transmissão respiratória pode ser importante em áreas mais desenvolvidas. A importância relativa dos diferentes modos de transmissão, provavelmente, varia entre as espécies de enterovírus e as condições do ambiente. Acredita-se que quase todos os enterovírus, podem ser transmitidos por via fecal-oral, no entanto, não existem dados que demonstrem quais as espécies virais estão associadas com a transmissão por via respiratória (HORSTMANN, 1967; PALLANSCH & ROOS, 2007).

Após a entrada do vírus pela boca ou nariz, o vírus infecta e se multiplica no epitélio nasofaríngeo. Em seguida, o vírus pode ser drenado para tecidos e órgãos linfoides regionais, sendo esta etapa crucial para o prognóstico da doença, que pode evoluir para uma infecção sistêmica ou pode ser contida pelo

sistema imunológico. Neste último caso, ocorre o controle da carga viral, podendo a infecção evoluir para um quadro assintomático. Caso contrário, a multiplicação no sistema linfático pode ser sucedida pela viremia primária, causando a disseminação viral pelo organismo (PALLANSCH & ROOS, 2007). A partir daí, uma gama de órgãos e tecidos podem ser infectados, estando este fato associado a um largo espectro de manifestações clínicas. No caso das infecções do sistema digestivo, os enterovírus podem resistir o ácido do estômago e bile, tendo acesso ao intestino grosso, onde infectam e se multiplicam no epitélio intestinal e linfonodos mesentéricos e placas de Peyer. A infecção das células epiteliais intestinais e órgãos linfoides associados podem resultar em viremia, o que leva à multiplicação do vírus no sistema retículo endotelial. Após a multiplicação nas células endoteliais o vírus pode ser transportado pela corrente sanguínea para órgãos alvo, tais como a medula espinhal, meninges, coração, fígado e pele. Do SNC, o vírus pode transitar pelas vias neurais para os músculos esqueléticos e do coração (PALLANSCH & ROOS, 2007).

Os enterovírus usualmente não causam doença entérica. As doenças produzidas pelos enterovírus são determinadas principalmente por diferenças no tropismo das diferentes espécies e a virulência dos vírus. Após a viremia primária o vírus se dissemina para o tecido alvo onde as células são permissivas a sua infecção. A multiplicação do vírus no seu tecido alvo geralmente causa dano tecidual, por destruição celular e em decorrência da inflamação associada (PALLANSCH & ROOS, 2007).

1.2.1.1.1. INFECÇÃO NO SNC POR VÍRUS DO GÊNERO *Enterovírus*

Com o advento da vacina contra a poliomielite e, conseqüente erradicação do poliovírus de vários países, juntamente com a introdução da vacina contra caxumba na rotina, os enterovírus não pólio vêm adquirindo importância crescente como agente etiológico de meningoencefalite viral (BERLIN *et al.*, 1993; ROTBART, 1995; NIX *et al.*, 2006; OLSEN *et al.*, 2015).

Enterovírus são a principal causa de meningoencefalite viral em crianças e adultos nos países desenvolvidos. Estudos em diversas populações têm mostrado enterovírus como o principal agente etiológico das meningoencefalites virais, muitas vezes superando 75% dos casos (ROTBART *et al.*, 1998; ARCHIMBAUD *et al.*, 2009).

Na maior parte das vezes infecções por vírus do gênero *Enterovirus* não evoluem para quadros neurológicos graves, porém com o fato do diagnóstico para esses vírus ser emergente tem-se identificado casos graves associados às infecções no SNC (McMinn *et al.* 2001; Jang *et al.* 2012; Chang *et al.* 2007).

Meningoencefalite é a síndrome clínica mais comum causada por enterovírus que resulta em atendimento médico. Existe um aumento sazonal na incidência de meningite por enterovírus, isto se explica pelo fato da rota fecal-oral de transmissão ser facilitada em períodos quentes, quando se usa menos roupas (ROTBART *et al.*, 1998; PALLANSCH & ROOS, 2007).

1.2.1.1.2. DIAGNÓSTICO

O processo de diagnóstico de uma infecção por enterovírus ou a correlação da infecção com uma síndrome clínica específica, pode ser um processo complicado e desafiador. Este problema resulta da biologia e epidemiologia das infecções por enterovírus, bem como das limitações nas atuais metodologias de diagnóstico usadas na rotina dos laboratórios. Diversas propriedades biológicas relacionadas à biologia do vírus podem complicar o diagnóstico de doenças causadas por enterovírus. O primeiro é que a multiplicação primária do vírus ocorre no trato respiratório ou gastrointestinal, e estas infecções frequentemente evoluem para quadros assintomáticos, com pouco ou nenhum sinal clínico. A segunda dificuldade é que quando a infecção por enterovírus gera sinais e sintomas, estes são relativamente genéricos, podendo ser confundidos com outras patologias (PALLANSCH & ROOS, 2007).

A coleta de amostras clínicas apropriadas para isolamento do vírus ou detecção do genoma viral é fundamental para a confirmação laboratorial de infecção por enterovírus. Algumas vezes amostras adequadas para o diagnóstico não são obtidas mesmo em casos graves. Em casos onde a infecção no SNC por enterovírus leva ao acometimento meníngeo (ex: meningoencefalites) a detecção de enterovírus no líquido cefalorraquidiano (LCR) é padrão ouro para diagnóstico da infecção (PALLANSCH & ROOS, 2007).

Para o diagnóstico de enterovírus como agente etiológico de infecção no SNC o isolamento muitas vezes não é bem sucedido, pois o vírus pode multiplicar pouco em cultura de células ou porque fatores inibidores (por exemplo, anticorpos neutralizantes) podem estar presentes no LCR (PALLANSCH & ROOS, 2007). Com o uso de RT-PCR a detecção do genoma dos enterovírus no LCR é positiva em um número significativo de amostras que anteriormente tinha dado resultado negativo no isolamento. A utilidade potencial da RT-PCR pôde ser vista em um relatório de uma epidemia de meningite asséptica na Suíça, relacionada com echovirus 30, quando o genoma viral foi identificado em 42 de 50 culturas de LCR (84%) que tinham sido negativas para o isolamento viral utilizando esta técnica (GORGIEVSKI-HRISOHO *et al.*, 1998).

Assim sendo o uso do PCR em tempo real (qPCR) para detecção e quantificação da carga viral no LCR é uma técnica de grande valia no diagnóstico rápido e específico de meningoencefalite causada por enterovírus. Através do diagnóstico precoce o paciente pode ser tratado e orientado sobre as características de transmissão do agente etiológico em específico, prevenindo assim dispersão do agente etiológico no ambiente e o estabelecimento de surtos.

1.2.2. VÍRUS DA FAMÍLIA *Herpesviridae*

A família *Herpesviridae* compreende vírus de DNA dupla fita e envelopados, que infectam vertebrados. De acordo com diferenças nas sequências nucleotídicas e no tipo de hospedeiro a família se divide em três subfamílias, *Alphaherpesvirinae*, *Betaherpesvirinae* e *Gammaherpesvirinae*. As subfamílias *Alphaherpesvirinae* e *Betaherpesvirinae* são o foco principal deste trabalho, por conter os gêneros *Varicellovirus*, *Simplexvirus* e *Cytomegalovirus*. No gênero *Varicellovirus* a espécie *Human herpesvirus 3* (HHV-3 ou VZV) é alvo deste trabalho, enquanto no gênero *Simplexvirus* iremos estudar as espécies *Human herpesvirus 1* (HHV-1) e *Human herpesvirus 2* (HHV-2); por fim o gênero *Cytomegalovirus* nosso alvo foi o *Human herpesvirus 5* (HHV-5 ou CMV) (ICTV, 2012). HHV-1, HHV-2 e VZV são patógenos humanos neurotrópicos. O CMV causa infecções no SNC principalmente em indivíduos imunossuprimidos (PELLETT & ROIZMAN, 2007).

Todos os vírus da família *Herpesviridae* compartilham entre si uma morfologia baseada em capsídeos com simetria icosaédrica e que contém o genoma de DNA; um envelope lipoprotéico, derivado de membranas celulares que envolvem uma camada de proteínas virais; e um tegumento, composto de matriz proteica, contendo elementos importantes durante as primeiras fases do ciclo de multiplicação viral, como fatores de transcrição imediatamente precoces e proteínas imunomodulatórias. A subfamília *Alphaherpesvirinae* compreende vírus com um espectro de hospedeiros variável, um ciclo de multiplicação curto e a capacidade de induzir infecção latente principalmente, mas não exclusivamente, em neurônios (PELLETT & ROIZMAN, 2007).

O genoma viral consiste em DNA dupla fita, apresentando uma região central conservada e regiões terminais invertidas repetidas nas extremidades. Os genomas dos membros desta família codificam pelo menos 90 proteínas, entre as quais 33 são conhecidamente proteínas estruturais e até 15 são proteínas não estruturais. As glicoproteínas virais estão localizadas no envelope, na superfície da partícula viral, e possuem um papel importante na patogênese e na imunidade (FIGURA 5) (PELLETT & ROIZMAN, 2007).

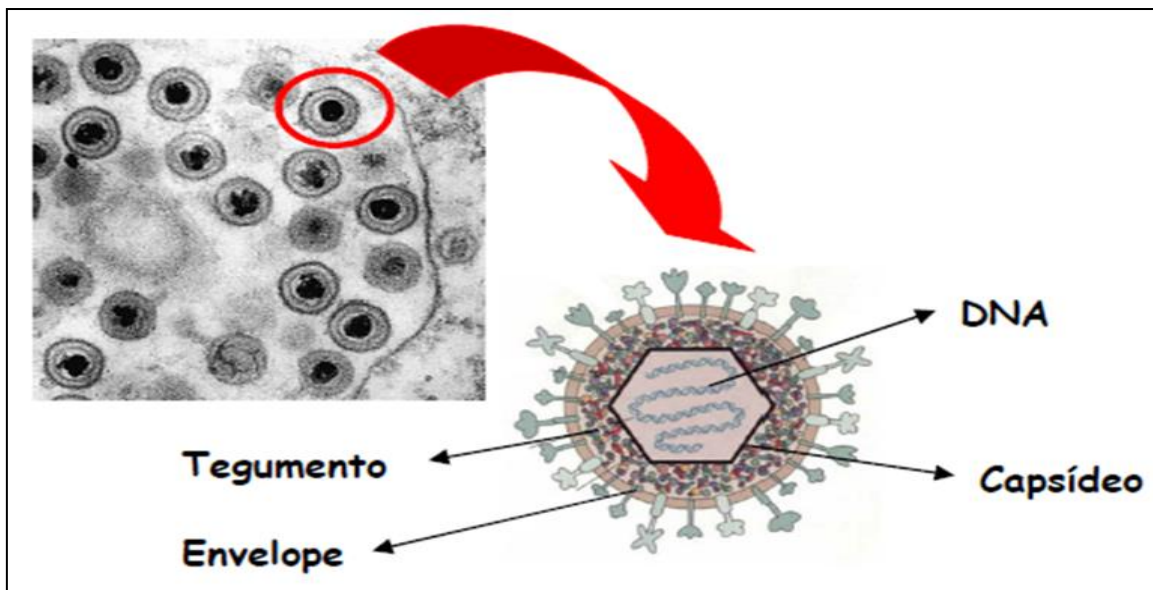


Figura 5: Morfologia dos herpes vírus. Representação esquemática da partícula de um herpes vírus micrografia eletrônica (HHV-1). Adaptado de WHITLEY, 2001 e www.tulane.edu por LIMA, 2010.

O ciclo de multiplicação dos herpes vírus apresenta importantes etapas no núcleo celular e é bem caracterizado pela regulação temporal do ciclo viral. Inicialmente, o genoma do vírus é liberado no núcleo e a expressão gênica é temporalmente regulada, por genes imediatamente precoces (IP), genes precoces (P) e genes tardios (T). Subsequentemente, as proteínas codificadas exercem funções na regulação do ciclo viral, na replicação do DNA viral e na morfogênese de novas partículas virais (PELLETT & ROIZMAN, 2007).

1.2.2.1. VÍRUS DO GÊNERO *Simplexvirus*

O gênero *Simplexvirus* é constituído de espécies que infectam vários mamíferos porem, apenas as espécies HHV-1 e HHV-2 podem infectar os seres humanos. De todos os herpes vírus, HHV-1 e HHV-2 são as duas espécies mais estreitamente relacionadas, com quase 70% de homologia genômica. Estes dois vírus podem ser distinguidos mais confiavelmente pela composição do DNA, no entanto, diferenças na expressão do antígeno e as propriedades biológicas também servem como métodos para a diferenciação. (ROIZMAN *et al*, 2007 a).

Transmissão do vírus dos herpes é dependente de contato direto (solução de continuidade). Assim, HHV-1 normalmente é transmitido pelo beijo, contato com a saliva ou outro contato direto com a lesão causada pelo vírus. O HHV-2 é geralmente uma consequência de contato sexual (ROIZMAN *et al*, 2007 b). Todavia, HHV-1 e HHV-2 já foram ambos isolados dos dois sítios supracitados.

Após a infecção primária e a multiplicação do vírus na porta de entrada (usualmente a mucosa oral ou mucosa das genitálias) (FIGURA 6), ocorre a infecção das terminações dos nervos sensoriais, e o vírus é transportado para os gânglios dorsais, através de fluxo axonal retrógrado. O gânglio trigêmeo torna-se colonizado e abriga o vírus latente (ARDUINO & PORTER, 2008).

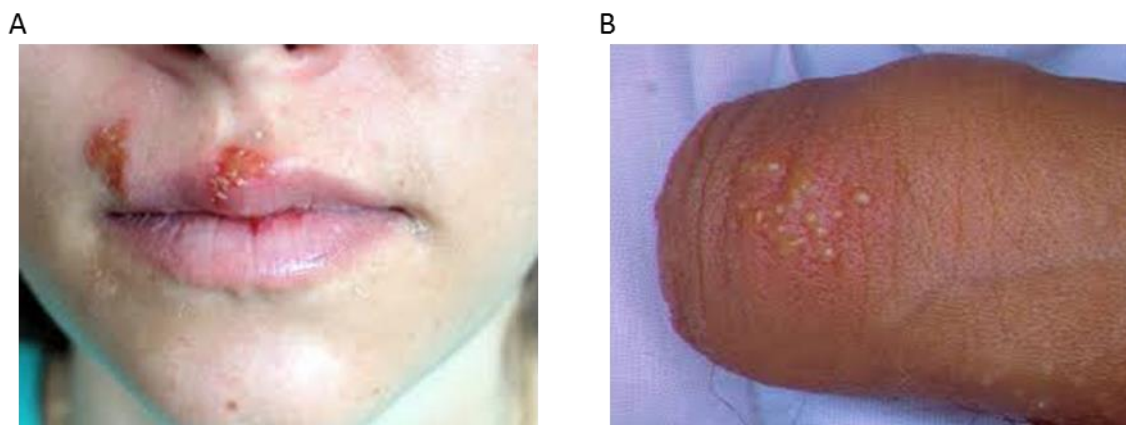


Figura 6: Lesões características de infecção por HHV-1 e HHV-2. (A) Lesão por HHV-1 na mucosa oral. (B) Lesão por HHV-2 na mucosa da genitália. Fonte: <http://www.herpeseonline.org/>

A infecção primária pode disseminar-se além dos gânglios, tornando-se sistêmica. Este evento, porém, é incomum, ocorrendo principalmente em infecções neonatais e em pacientes imunodeprimidos (SCHMUTZHARD, 2001). Recorrências ocorrem quando o vírus latente é reativado, sendo transportado por fluxo axonal anterógrado até a região onde houve a infecção inicial (CUNNINGHAM *et al*, 2006; HUFNER *et al*, 2006) (FIGURA 7). A reativação esta normalmente associada a fatores como estresse, variações hormonais, exposição à luz ultravioleta e medicação ou patologias imunossupressoras (ROIZMAN *et al*, 2007 a).

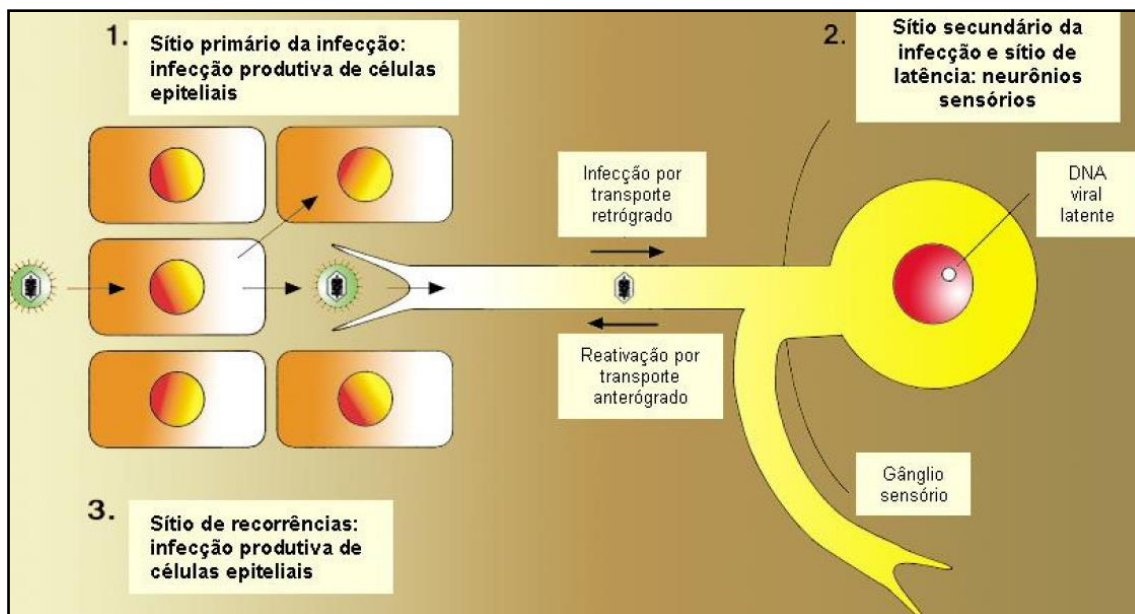


Figura 7: Patogênese HHV-1 e HHV-2. O sítio primário de infecção ocorre nas células epiteliais, com infecção produtiva (1). As partículas são levadas por transporte retrógrado através de axônios até os gânglios sensoriais, sítios secundários da infecção e local de latência (2). Eventualmente, pode ocorrer a reativação, e o vírus é conduzido por transporte anterógrado até as células epiteliais, onde novamente há infecção produtiva (3). Fonte: WHITLEY, 2001 (modificado).

Fonte: WHITLEY, 2001(modificado por LIMA,2010)

1.2.2.1.1 INFECÇÃO NO SNC POR HHV-1 E HHV-2

Os HHV-1 e HHV-2 estão envolvidos no estabelecimento de encefalite e meningoencefalite, isto ocorre pois os herpes vírus podem infectar quase todas as áreas anatômicas do SNC causando várias doenças, incluindo meningite, mielite e radiculite, entre outros (CRAIG & NAHMIAS, 1973). Meningoencefalite é uma ocorrência comum em indivíduos com infecções genitais primárias por herpes vírus. Meningite recorrente (meningite Mollarets) ocorre principalmente em pacientes que tenham tido herpes genital por HHV-2 (TYLER, 2004). Estudos sugerem uma relação entre as infecções no SNC por vírus do gênero *Simplexvirus* e doenças degenerativas crônicas e transtornos psiquiátricos, porém é necessário mais estudos para esclarecer esta questão (ROIZMAN *et al*, 2007 a).

HHV-1 e HHV-2 são responsáveis por 0,5-3% dos casos de meningoencefalites viral aguda (ROIZMAN *et al*, 2007 a). Por isto, é de extrema importância o diagnóstico precoce do agente etológico viral para reduzir o dano no SNC. Este fato torna-se ainda mais importante para o caso dos herpes vírus, pois existem antivirais específicos para o tratamento de infecções desses vírus.

1.2.2.2. VÍRUS DO GENERO *Varicellovirus*

O VZV é a única espécie do gênero *Varicellovirus* que causa doença em humanos. A infecção primária que causada por esse vírus é designada de varicela, comumente chamada de “catapora” (FIGURA 8). A varicela é caracterizada por febre e rash pruriginoso, essa infecção é mais prevalente na infância. Varicela é altamente contagiosa, produzindo epidemias anuais entre os indivíduos susceptíveis durante o inverno e primavera em climas temperados (COHEN *et al.*, 2007).



Figura 8: Lesão característica da varicela. Infecção primária pelo VZV designada de varicela, comumente chamada de catapora.

Fonte: <http://www.herpesonline.org/>

Entre os vírus da subfamília *Alphaherpesvirus*, VZV é único que apresenta tropismo por linfócitos T, o que permite disseminação do vírus para a pele. VZV também infecta e estabelece latência em neurônios dos gânglios da raiz dorsal. Sua reativação da latência produz herpes zoster (Figura 9) uma doença mais

frequentemente observada em adultos mais velhos e em pacientes imunocomprometidos de qualquer idade. A erupção vesicular de herpes zoster é restrita a regiões da pele. Ao contrário da varicela, herpes zoster infecções são associados com dor aguda que pode ser grave e prolongada. Esta dor pode persistir após o início da herpes zoster por mais de 30 dias é chamado neuralgia pós-herpética.



Figura 9: Lesão característica de herpes zoster. Reativação da infecção pelo VZV designada de herpes zoster.

Fonte: <http://www.herpeseonline.org/>

O VZV é extremamente contagioso, com taxas de infecção superiores a 90% entre o contato de pessoas suscetíveis no ambiente doméstico. O VZV é transmitido principalmente pela via respiratória, mas pode ser transmitido também pelo contato direto com as vesículas cutâneas. Assim episódios de herpes zoster fornecer uma fonte contínua de transmissão de VZV através das lesões cutâneas para indivíduos susceptíveis, que então irão desenvolver varicela. Esta fonte de VZV é suficiente para causar epidemias anuais de varicela, particularmente durante o final do inverno e primavera (LAVAIL *et al.*; COHEN *et al.*, 2007).

1.2.2.2.1 INFECÇÃO NO SNC POR VZV

Infecções no SNC causadas por VZV têm sinais e sintomas inespecíficos como febre, cefaleia e torcicolo. Comprometimento da função cognitiva, alterações no

estado de consciência ou convulsões indicam envolvimento do parênquima subjacente (encefalite). O envolvimento do VZV em infecções do SNC, sem erupção cutânea, foi verificada pela síntese intratecal de anticorpos anti-VZV em dois pacientes com meningoencefalite (MARTINEZ-MARTIN ET al. 1985), e mais tarde esse fato foi confirmado em estudo de casos de mais quatro pacientes (ECHEVARRIA et al. 1987). Mais recentemente foi descrito meningoencefalite causada por VZV, na ausência de erupções, desenvolvido em uma mulher imunocompetente (HABIB et al. 2009).

Ainda são poucos os estudos epidemiológicos sobre a prevalência de infecção por VZV em pacientes que apresente meningoencefalite, assim sendo o diagnóstico rápido e específico contribui para o conhecimento epidemiológico de determinadas populações. Além disso, o diagnóstico feito por métodos quantitativos, como real time PCR, fornecem a possibilidade de tratamento específico ao paciente.

1.2.2.3. VÍRUS DO GÊNERO *Cytomegalovirus*

O gênero *Cytomegalovirus* é composto por 8 espécies, dentre elas o CMV que é alvo deste trabalho. CMV é um vírus com distribuição mundial. Este vírus está associado com doenças oportunistas sendo altamente prevalente em áreas desenvolvidas do mundo. Testes sorológicos nos EUA mostraram que, aos 40 anos aproximadamente 80% dos indivíduos são positivos (MOCARSKI JR. et al, 2007).

As doenças agudas causadas por CMV ocorrem em apenas uma pequena porcentagem de indivíduos infectados, e na grande maioria das vezes está limitada a indivíduos apresentam alterações no sistema imune. Como exemplo, pode ser citada a transmissão transplacentária durante a gravidez, provocando danos ao feto e infecção primária ou a reativação dos indivíduos imunocomprometidos, que pode levar a doença sistêmica grave. Assim como

os outros herpes vírus o CMV é capaz de estabelecer latência viral (MOCARSKI JR. *et al*, 2007).

A infecção primária por CMV geralmente se inicia com a multiplicação viral no sítio primário de infecção, que geralmente é uma mucosa que teve contato direto com secreções infecciosas de outro indivíduo quem tem uma infecção primária ou recorrente. Uma infecção sistêmica depende de uma viremia associada a leucócitos do sangue periférico, sendo que estas células servem como veículos para a disseminação do vírus, em particular para as glândulas salivares. A citotoxicidade das células NK e produção de IFNs por células dendríticas, principalmente, são extremamente importantes infecção por CMV (MOCARSKI JR. *et al*, 2007).

1.2.2.3.1 INFECÇÃO NO SNC POR CMV

Infecção por CMV em hospedeiros imunocompetentes não tem sido associada com complicações que envolvem sistemas de órgãos específicos e mesmo doenças que ameacem a vida. Porém é emergente na literatura o numero de casos envolvendo doenças graves em pacientes imunocompetentes, esses casos incluem doença trombótica, anemia hemolítica, trombocitopenia, encefalite, neuropatias, miocardite e doenças da superfície ocular, nestes casos as infecções graves por CMV tem curso similar ao que acontece em imunossuprimidos (MOCARSKI JR. *et al*, 2007).

Uma revisão sobre infecções no SNC por CMV relatou 21 casos notificados entre 1965 e 1995, que ocorreram em hospedeiros imunocompetentes (ARRIBAS *et al*, 1996). Sinais de encefalite nestes pacientes incluíam confusão, convulsões, coma, afasia, disfasia e alterações de nervos cranianos. Embora o curso usual fosse uma doença febril aguda, com sintomas de encefalite seguido por resolução espontânea, a recuperação, às vezes levou meses, dois pacientes tinham perda de memória persistente ou problemas na fala e dois morreram durante a doença aguda (ARRIBAS *et al*, 1996). Outro

estudo relatou casos de encefalite e meningite por CMV tanto em hospedeiros normais quanto em imunossuprimidos (STUDAHL *et al.*, 1996; ORY *et al.*, 2013; CALVARIO *et al.*, 2002).

1.2.2.4. DIAGNÓSTICO

Historicamente, o diagnóstico de infecções do SNC é por biópsia do cérebro, no entanto com a evolução das técnicas de biologia molecular PCR tornou-se a técnica de escolha para diagnóstico de infecções do SNC, através de detecção do genoma viral no LCR. Esta técnica ainda não está na rotina da maioria dos laboratórios de análise clínica por necessitar de treinamento técnico e de instrumentos sofisticados. Avaliações sorológicas de LCR ou soro não são úteis no início do curso da doença, quando decisões terapêuticas são obrigatórias (COHEN *et al.*, 2007).

O diagnóstico de meningoencefalite causada por HHV-1, HHV-2, VZV e CMV pode ser feito através do isolamento viral a partir do LCR, em que diversos tipos celulares podem ser utilizados, permitindo a visualização do efeito citopático (ECP) (ROIZMAN *et al.*, 2007 a). O vírus obtido no isolamento pode ser identificado por técnicas sorológicas ou até mesmo moleculares. É importante salientar que o isolamento viral torna-se muitas vezes ineficiente pelo fato de o LCR conter anticorpos neutralizantes contra o vírus, o que impossibilita sua multiplicação e consecutivamente a visualização do ECP, outro fato que torna difícil o isolamento viral é que este método pode levar até semanas, como no caso do CMV. Por fim, a carga viral no LCR frequentemente está abaixo da sensibilidade das técnicas de isolamento (COHEN *et al.*, 2007).

Atualmente, vários métodos de detecção de DNA de herpes vírus em amostras clínicas foram e continuam sendo descritos, incluindo técnicas de hibridização, PCR e qPCR. A PCR vem sendo cada vez mais utilizada na rotina de diagnóstico de infecções por herpes vírus no SNC (CALVARIO *et al.*, 2002; GAETA *et al.*, 2009).

1.2.3. VÍRUS DA FAMÍLIA *Flaviviridae*

A família *Flaviviridae* compreende vírus com genoma de RNA, polaridade positiva, envelopados, com morfologia esférica e que infectam vertebrados e invertebrados. A família é dividida em quatro gêneros: *Flavivirus*, em que o protótipo é o *Yellow fever virus* (YFV, Vírus da febre amarela); *Pestivirus*, com o protótipo sendo o *Bovine viral diarrhea vírus 1* (BVDV-1), gênero *Hepacivirus*, com o *Hepatitis C virus* (HCV, Vírus da Hepatite C) e o novo gênero *Pegivirus* no qual o *Pegivirus A* é o protótipo (ICTV, 2013).

Os vírus da família *Flaviviridae* são relativamente pequenos, com diâmetro de aproximadamente 50 nm, apresentando forma geodésica e capsídeo de simetria icosaédrica. Possuem um nucleocapsídeo denso, com aproximadamente 30 nm de diâmetro e são envoltos por uma membrana lipoprotéica. O nucleocapsídeo é composto pela proteína do capsídeo (C) e envolvido por uma membrana lipídica, na qual as proteínas de membrana (M) e de envelope (E) estão ancoradas (FIGURA 10) (LINDEBACH *et al.*, 2007).

Os vírus maduros apresentam genoma constituído de RNA fita simples com polaridade positiva de aproximadamente 11 kb codificando para 3400 aa. O genoma dos flavivírus é composto por uma região 5' não codificadora (UTR) com aproximadamente 100 nt, que apresenta um *cap* tipo I ($m^7GppAmp$) seguido por uma sequência dinucleotídica conservada AG, por uma janela aberta de leitura (ORF) e por uma região terminal não codificadora 3' (UTR) com 450 nt, não possuindo a cauda 3' poli-A (LINDEBACH *et al.*, 2007).

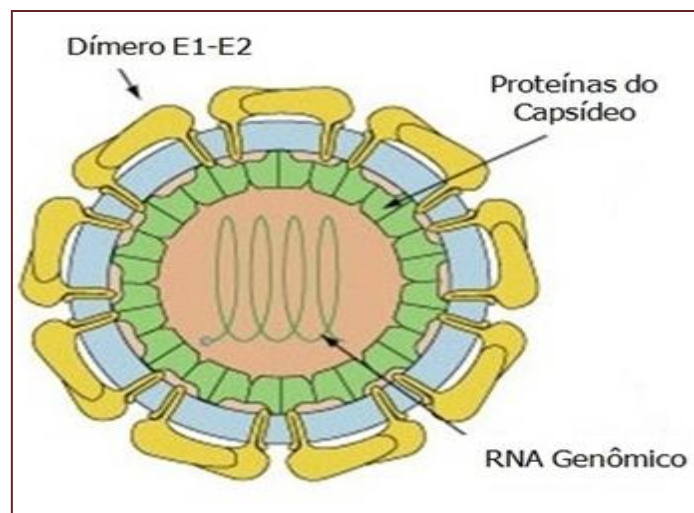


Figura 10: Morfologia flavivírus. Representação esquemática de um flavivírus. Fonte: adaptado de www.expasy.org

Acredita-se que o ciclo de multiplicação dos vírus da família *Flaviviridae* envolve receptores específicos para as proteínas do envelope viral tanto na adsorção e penetração quanto na liberação das partículas virais. O pH baixo da via endossômica causa modificações na estrutura da partícula, que não se funde imediatamente com o endossomo. A fusão ocorre no endossomo tardio, na presença de motivos bi-fosfato, com a exposição do capsídeo ao ambiente intracelular. A liberação do genoma viral no citoplasma ocorre através de um poro, formado desde as modificações estruturais na proteína E durante a acidificação do endossomo. O genoma viral assume o papel de RNA mensageiro (mRNA) para tradução de todas as proteínas virais, sendo utilizado como molde durante a replicação do RNA e representa o material genético das novas partículas virais. As proteínas virais são produzidas a partir de uma única poliproteína que é clivada por uma combinação de proteases virais (serina-protease) e do hospedeiro. A replicação do RNA ocorre em complexos citoplasmáticos associados com membranas perinucleares, a partir da síntese do antígeno intermediário com polaridade negativa. É provável que o brotamento da progênie viral ocorra dentro de compartimentos membranosos intracelulares, como o retículo endoplasmático. A partir desse ponto, a progênie segue pela via secretória e é liberada na superfície celular (LINDEBACH *et al.*, 2007).

1.2.3.1. VÍRUS DO GÊNERO *Flavivirus*

O gênero *Flavivirus* é o maior dentro da família *Flaviviridae*. Ele é composto por 53 espécies de vírus, sendo a maioria patógenos humanos transmitidos por artrópodes. Destes, 27 são transmitidos por mosquitos, 12 por carrapatos e 14 não possuem vetor conhecido. Os flavivírus compartilham características comuns quanto à morfologia, aos determinantes antigênicos e à organização genômica (PUGACHEV *et al.*, 2003; GUBLER *et al.* 2007).

As infecções por flavivírus podem causar diferentes sinais e sintomas, incluindo febre, encefalite, meningoencefalite e febre hemorrágica (BARTENSCHLAGER & MILLER, 2008; ARAÚJO *et al.*, 2012). Esses vírus estão amplamente distribuídos na natureza, onde são mantidos em ciclos de transmissão envolvendo um hospedeiro vertebrado e um artrópode no papel de vetor biológico. Nesse gênero são encontrados importantes agentes etiológicos que podem causar infecções graves no SNC, como: YFV, *Japanese encephalitis virus* (JEV), *West Nile virus* (WNV), *Tick-borne encephalitis virus* (TBEV), *St. louis encefalites virus* (SLEV) e o *Dengue virus* (DENV) (LINDENBACH *et al.*, 2007).

A dengue é atualmente considerada uma das mais importantes arboviroses que afeta o homem em termos de morbidade e mortalidade. A distribuição global se concentra principalmente nas áreas tropicais e subtropicais da América, África, Ásia, bem como Oceania e Austrália; a área do globo com evidências de infecções por dengue vem só aumentando (FIGURA 11) (BHATT *et al.*, 2013; GUZMAN & KOURI, 2003; MACKENZIE *et al.*, 2004; GUBLER *et al.*, 2007). No Brasil todos os anos ocorrem epidemias de dengue e o número de pacientes acometidos por infecções no SNC (encefalites e meningoencefalites) em áreas epidêmicas pelo DENV é desconhecido (SOARES *et al.*, 2011). Assim sendo o diagnóstico dessa doença torna-se importante para o tratamento específico de suporte a infecção por dengue e também para se conhecer melhor o impacto das meningites causadas por dengue em áreas epidêmicas.

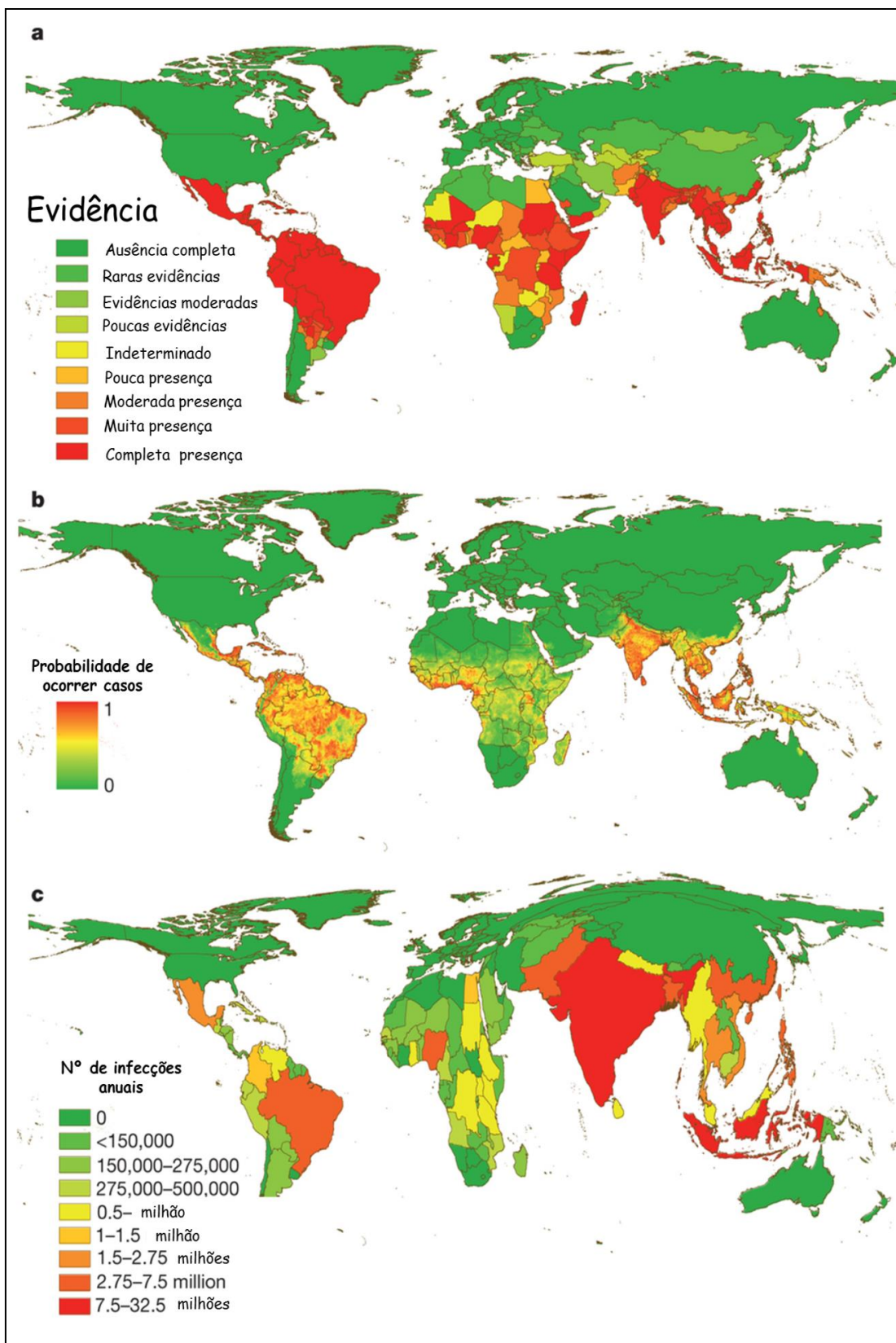


Figura 11: Países ou áreas com risco de transmissão de dengue. A) Mapa mundo identificando as áreas com evidência da ocorrência de dengue. B) A probabilidade de ocorrer novas infecções por dengue. C) Número anual de infecções. Fonte: BHATT *et al.*, 2013 - modificado.

1.2.3.1.1 INFECÇÕES NO SNC POR FLAVIVÍRUS

Alguns vírus deste gênero apresentam a capacidade de invasão do SNC e estabelecimento de uma infecção que pode gerar acometimentos graves (LINDENBACH *et al.*, 2007). Em contraste com as síndromes sistêmicas, o desenvolvimento de doença neurológica (encefalite e meningoencefalite) baseia-se na capacidade do vírus de entrar no SNC e infectar células neurais, um fenômeno conhecido como neurovirulência. Interessantemente, essa capacidade parece estar amplamente dispersas entre vários membros do gênero *Flavivirus*. Infecções no SNC ocorrem com frequência após infecções por WNV, SLEV, JEV e DENV (LINDENBACH *et al.* 2007; KOYUNCU *et al.*, 2013).

De todos os casos de dengue notificados nas Américas 85% ocorrem no Brasil. As infecções por dengue resultam em envolvimento neurológico em 4-5% dos casos. Além do dengue vírus outros flavivírus neurotrópicos são emergentes no Brasil e podem no futuro causar epidemias e causar um grande cargo para saúde pública em relação às doenças no SNC, assim se os laboratórios não estiverem prontos para o diagnóstico rápido (SOARES *et al.* 2011; ARAÚJO *et al.*, 2012; Pauvolid *et al.*, 2013; MELANDRI *et al.*, 2012).

1.2.3.2. DIAGNÓSTICO

O diagnóstico laboratorial da infecção pelos flavivírus depende do isolamento viral, da detecção de antígenos virais ou de RNA em soro ou tecidos, ou mais frequentemente da detecção de anticorpos específicos no soro dos pacientes. Atualmente, três métodos básicos são usados na maioria dos laboratórios de diagnóstico como o isolamento viral, a detecção de sequências genômicas por PCR e a detecção de anticorpos específicos (GUBLER 1998; SHU & HUANG, 2004).

Infecções no SNC por vírus do gênero *Flavivirus* como DENV, WNV, SLEV e outros neurovirulentos estes podem ser encontrados no LCR durante a fase aguda da doença, principalmente nos casos com acometimento meníngeo (ex: meningoencefalite) (LINDENBACH *et al.*, 2007; MONDINI *et al.* 2007; ARAUJO). Como já discutido em outros tópicos deste trabalho o isolamento viral no LCR torna-se muito difícil pela presença de anticorpos específicos contra o vírus no LCR. Assim sendo o uso de técnicas moleculares para detecção do genoma viral torna rápida e específica a identificação do agente etiológico causador de meningite.

1.3. PCR EM TEMPO REAL

Métodos baseados em biologia molecular estão sendo cada vez mais aplicados no diagnóstico de doenças infecciosas. Para serem usados em larga escala, os métodos devem ser de fácil execução, acessíveis, seguros, sensíveis, reprodutíveis e passíveis de automação, para facilitar a análise de um grande número de amostras. A PCR explora o mecanismo natural de replicação do DNA e resulta em uma produção *in vitro* de grandes quantidades de uma sequência de DNA desejada, a partir de uma mistura complexa de sequências heterogêneas. A PCR pode amplificar uma região selecionada de uma sequência produzindo bilhões de cópias detecção (LUTFALLA & UZE, 2006).

.

Como a qPCR está sendo utilizada há relativamente pouco tempo no Brasil e em países em desenvolvimento, existem poucos kits comerciais disponíveis para um grande número de parâmetros clínicos. Conseqüentemente, faz-se necessário o desenvolvimento de métodos caseiros, com otimização e validação adequadas antes que sejam introduzidos nos diagnósticos de rotina detecção (LUTFALLA & UZE, 2006).

.

A padronização de um teste por qPCR requer a análise de vários elementos. O primeiro fator é a escolha do tipo de fluorescência. Existem vários tipos de fluorescência compatíveis com a PCR quantitativa, sendo que alguns geram

sinais apenas na presença de sequências de DNA específicas (sondas) (Sistema TaqMan®) (FIGURA 12A) e outros se ligam indiscriminadamente em DNA dupla fita de maneira geral (corantes) (Ex: Sistema Syber Green -SYBR®) (FIGURA 12B). Os corantes específicos para DNA detectam toda a amplificação a partir da amostra, enquanto que as sondas detectam apenas o produto a ser identificado. Em um sistema de PCR, faz-se necessário saber sobre a existência de amplificações inespecíficas, pois elas interferem na amplificação, quantificação e identificação da sequência desejada. Portanto, as sondas devem ser utilizadas apenas em sistemas onde há certeza de que apenas um único produto seja amplificado, ou seja, a utilização de corantes representa uma condição *sine qua non* durante a padronização da técnica (LUTFALLA & UZE, 2006).

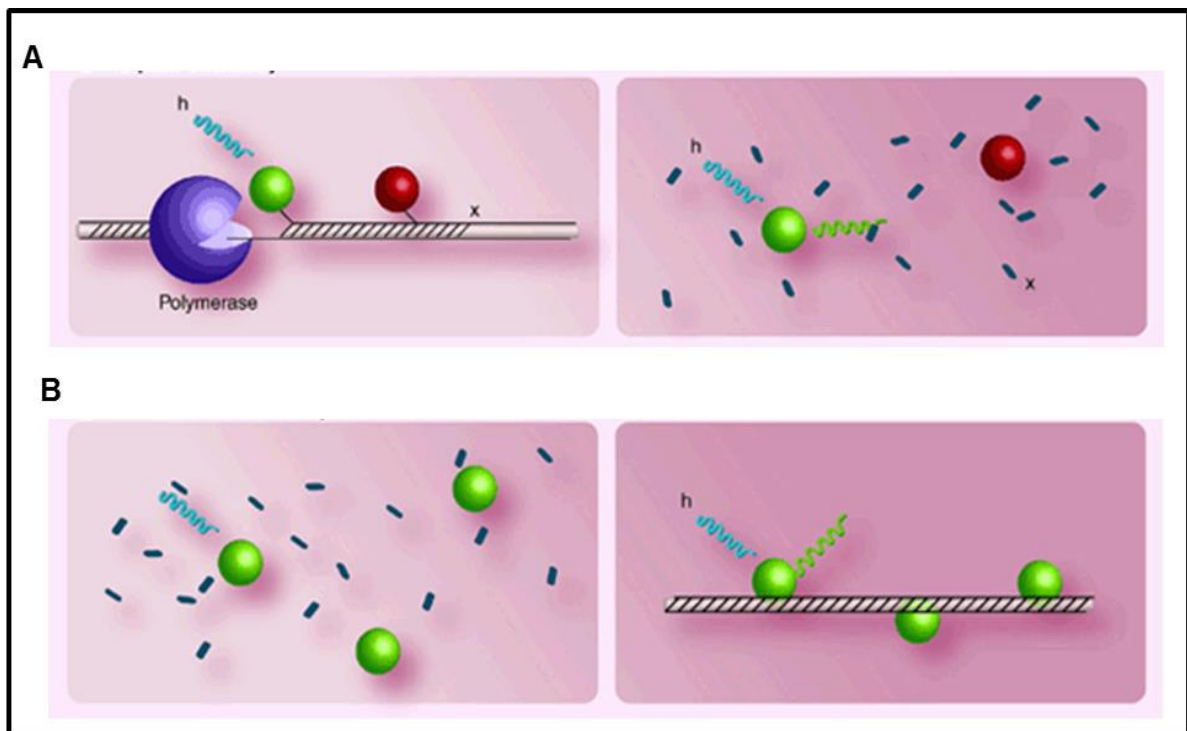


Figura 12: TaqMan® vs SYBR®. a) Representação do sistema de detecção de qPCR SYBR®. b) Representação do sistema de detecção de qPCR TaqMan®. Fonte: Medscape imagens-modificado

Regiões ricas em G+C na sequência alvo devem ser evitadas, devido à dificuldade de amplificação das mesmas. Regiões com polipurinas ou

polipirimidinas dentro da região de amplificação do DNA também devem ser evitadas. Os valores de “temperatura de melt” TM dos iniciadores seguem as referências das temperaturas de pareamento e extensão, usualmente em torno de 60°C. O T_m dos iniciadores senso e anti-senso devem ser similares, para evitar uma falsa hibridização, o que pode reduzir de forma importante a sensibilidade da técnica (MITSUHASHI, 1996).

A seleção dos iniciadores é um dos passos críticos para o sucesso na PCR. Para o desenho dos iniciadores, vários critérios são estabelecidos na literatura e vários programas estão disponíveis como ferramentas importantes. As sequências obtidas devem ser avaliadas quanto ao cumprimento dos critérios estabelecidos para os iniciadores (RAYMAEKERS *et al.*, 2009).

Pequenos fragmentos são desejáveis pela facilidade de amplificação, devido a uma maior eficiência da reação e pelo mínimo potencial de formação de estruturas secundárias dentro do “*amplicon*”. Presume-se que as elevadas temperaturas de extensão são importantes para dissociar estruturas secundárias que possam se formar no molde e bloquear o processo. Portanto, os DNAs amplificados em qPCR devem ser pequenos e com limitada capacidade de se dobrarem (KUBISTA *et al.*, 2006).

A presença consecutiva de guaninas pode dobrar o molde em uma estrutura tetramérica, que são muito estáveis e não podem ser transcritas pela polimerase. As regiões com complementaridade entre si também podem promover a dobra do molde formando alças e outras estruturas que interferem com o processo de extensão. Os iniciadores também devem apresentar baixo potencial para formar estruturas secundárias, incluindo a hibridização entre si e cruzada com outros iniciadores na PCR (dímeros) (KUBISTA *et al.*, 2006).

Não há um consenso quanto ao tamanho dos iniciadores, mas geralmente, são utilizados iniciadores variando de 18 a 24 nucleotídeos. Iniciadores menores (<17 bases) podem perder em especificidade e os maiores (>30 bases) não são mais específicos, e os cálculos de T_m tornam-se menos confiáveis (MITSUHASHI, 1996).

A escolha do espécime clínico para determinada doença deve ser baseada na literatura. O tipo de população e amostras deve estar completamente descritos. Resultados obtidos com uma metodologia para uma população podem não ser comparáveis com outra população. Análises com diferentes tipos de amostra dentro de uma mesma população também podem gerar resultados diferentes (ESPY *et al.*, 2006).

É absolutamente necessária uma validação da metodologia de amostragem, por causa dos possíveis efeitos de matriz. O desempenho de um diagnóstico por PCR pode ser limitado pela presença de substâncias inibitórias em amostras individuais. Portanto, processamento eficiente das amostras antes da reação se faz necessário para obtenção de um máximo desempenho. O processamento correto das amostras deve remover os inibidores da PCR, concentrar o ácido nucléico alvo e tornar uma amostra biologicamente heterogênea em uma amostra homogênea, compatível com os requisitos da PCR (ESPY *et al.*, 2006).

A amplificação de um controle interno (CI) deve ser incluída em todos os testes para excluir resultados falso negativos, devido à interferência de inibidores, e garantir o desempenho do procedimento de extração de ácido nucléico. A amplificação de um gene constitutivo pode ser utilizada em espécimes ricos em células. Em amostras com baixa quantidade de células, um CI sintético pode ser acrescentado em um tratamento prévio. O CI deve ser acrescentado em concentração adequada, para prevenir a competição de reagentes com a sequência alvo. A qPCR para a amplificação do CI deve ser otimizada de maneira que a amplificação do gene alvo do teste seja preferencial em relação ao CI (ESPY *et al.*, 2006).

A qPCR permite a quantificação de DNA e RNA nas amostras, o que pode ser feito pelo método da curva padrão ou pelo método comparativo. O primeiro é baseado na estreita relação entre o número de cópias inicial e o aumento da fluorescência durante a fase exponencial. A quantificação pode ser absoluta ou relativa. A quantificação absoluta requer a construção de uma curva padrão, com os valores de Ct *versus* o logaritmo do número de cópias inicial dos padrões de concentração conhecida. O material padrão deve ser estável,

confiável e precisamente quantificado. O número de cópias pode ser calculado após a regressão linear da curva padrão. A quantificação absoluta permite a determinação exata do número de cópias por célula, pelo total da concentração de DNA ou RNA ou por matriz de amostra. A quantificação relativa determina as mudanças no estado de transcrição de um gene, por exemplo. Uma curva padrão relativa consiste em uma série de diluições criada a partir de um calibrador com unidades arbitrárias (BUSTIN, 2000).

Um passo importante no desenvolvimento do teste é a otimização das condições da reação, que pode reduzir a formação de dímeros de iniciadores, aumentar a eficiência e a especificidade do processo de amplificação. Uma otimização das concentrações de iniciadores garante os mais altos índices de sensibilidade e eficiência do teste. A concentração ótima de iniciadores é a que resulta no menor Ct, sendo que este valor pode variar de acordo com a posição do limiar da reação (*threshold*). Sendo assim, em todas as reações o limiar foi posicionado da mesma maneira, considerando as curvas de amplificação em escala linear, como mostra a FIGURA 13 (RAYMAEKERS *et al.*, 2009).

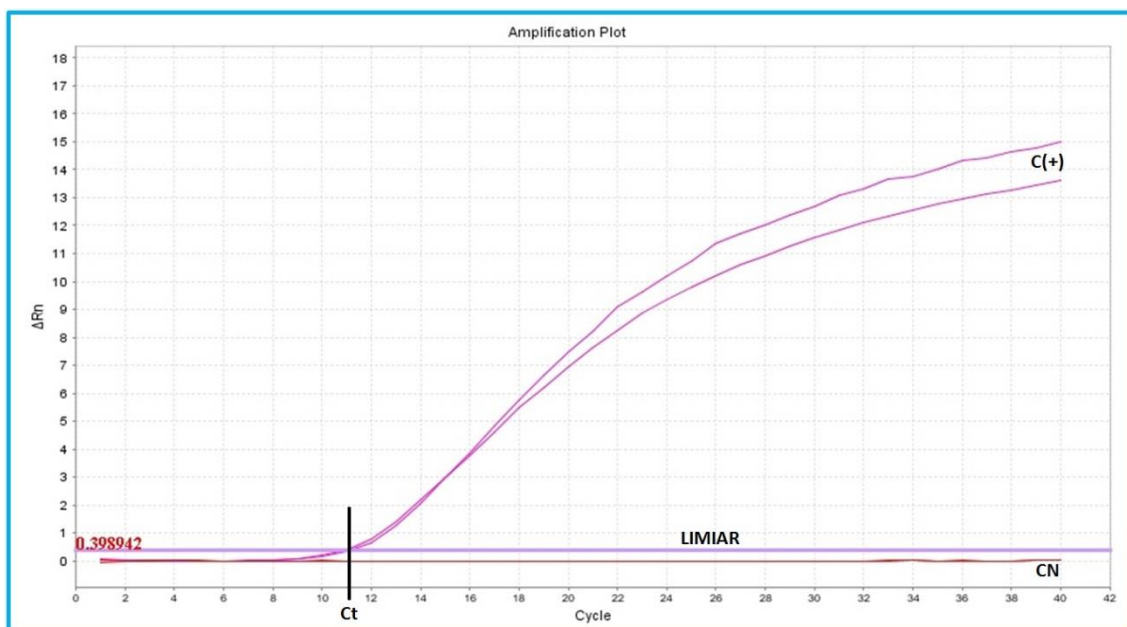


Figura 13: Posicionamento do limiar de reação para definição do Ct. Curvas de amplificação em escala linear para o controle positivo e negativo e posicionamento do limiar. O

Ct encontrado é indicado na figura. ΔR_n é o valor relativo de fluorescência emitido pela amostras utilizada.

Características importantes da reação incluem a avaliação da inclinação da curva obtida da regressão linear. Idealmente, o valor da inclinação é de -3,3219, o que resulta em uma eficiência (E) da qPCR igual a 1. Em uma PCR com eficiência de 1,0, o número de moléculas alvo dobram em um ciclo. Inclinações entre -3,1 e -3,6 com eficiência entre 85-115% são normalmente aceitáveis, mas não há evidências que sustentam esses limites. A eficiência da PCR pode ser afetada por vários fatores, dentre eles os inibidores da PCR, os fatores que potencializam a reação, degradação de DNA, concentração de DNA, tamanho do *amplicon*, estruturas secundárias e qualidade dos iniciadores (YUAN *et al.*, 2006).

Padronizado todas as condições de um teste baseado em qPCR este necessita ser validado. A validação de uma metodologia que emprega a qPCR é semelhante àquela requerida para qualquer procedimento analítico. Os principais parâmetros a serem avaliados são: especificidade, linearidade, reprodutibilidade, repetibilidade, exatidão, precisão e sensibilidade (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 2010; OIE, 2010).

Após a adequação de testes baseados em qPCR para as condições citadas acima, estes testes tornam-se amplamente vantajosos quando comparados com outras técnicas moleculares. Quando comparamos a qPCR com o PCR convencional observamos que em uma série de características que tornam o qPCR mais eficiente (SES-SP, 2007). Uma comparação detalhada destas características pode ser observada na TABELA 1.

Tabela 1: Comparação qPCR com PCR.

Características	PCR convencional	PCR em tempo real
Equipamentos necessários	Três (termociclador; sistema de eletroforese: cuba+fonte de alimentação; sistema de foto documentação)	Um único equipamento (amplificação e detecção simultânea)
Especificidade	Menor especificidade em relação à PCR em tempo real	Maior especificidade em relação ao PCR convencional quando é utilizado sondas
Sensibilidade ¹	Limite de detecção entre 2 a 20 pg/reacção	Limite de detecção em torno de 200 fg/reacção (10 a 100 x maior)
Sistema	Não-automatizado	Automatizado
Resultados	Não são expressos em números	São expressos em números
Interpretação dos resultados	Baseado na observação de banda em gel de agarose / poliacrilamida	Baseado em valores de Ct (determinados por um software) e por uma curva de dissociação no sistema SYBR®
Quantificação do DNA	Não permite	Permite
Tempo de execução	6 a 8 horas	2 a 3 horas

II. JUSTIFICATIVA

Infecções no SNC causam principalmente encefalites, meningites e meningoencefalites, tendo estas doenças ampla distribuição, acometendo populações em todas as partes do globo. Os principais agentes etiológicos destas doenças são vírus, bactérias e fungos, sendo que estes últimos tornaram-se mais relevante após o surgimento da AIDS. A prevalência e distribuição dos vírus que causam infecção no SNC são variadas nas diferentes partes do globo.

Desde a identificação dos vírus como agentes etiológicos das meningoencefalites, vem sendo observado que, apesar das baixas taxas de mortalidade, estas podem produzir uma elevada morbidade. Assim como um potencial de causar sequelas a longo prazo, especialmente em crianças, contrariando assim, a noção do denominado “curso benigno”, usado por muito tempo (BEDOYA & LEITE, 1998).

O cenário mais comum gerado por uma meningoencefalite viral é uma doença aguda com uma inflamação difusa, processo que pode afetar seriamente o SNC. A gravidade do dano gerado no SNC pela infecção viral é determinada por uma combinação de fatores da resposta imune do hospedeiro e as neurovirulência do vírus infectante . Assim sendo estados de imunossupressão como, por exemplo, AIDS e tratamento com imunossupressores levam a doenças com pior prognóstico.

Infecções no SNC, encefalites e meningoencefalites, podem ser causadas por vírus diferentes vírus. Os enterovírus são responsáveis pela maioria dos casos identificados de meningoencefalite viral nos EUA. Herpes vírus, varicela vírus e arboviroses também são importantes agentes etiológicos de meningoencefalites. Meningoencefalites virais ocorrem em todo o mundo, como epidemias ou como casos esporádicos. O custo médio de tratamento de um caso infantil de meningoencefalite viral é cerca de R\$ 15.000,00.

Meningoencefalites virais podem evoluir desde doença branda até para formas muito graves. A gravidade dependerá do agente etiológico, diagnóstico precoce, faixa etária e estado imune do paciente. O diagnóstico precoce do

agente etiológico das meningoencefalites virais é de fundamental importância para que o paciente tenha um tratamento adequado no sistema de saúde, pois dependendo do agente viral causador o tratamento medicamentoso, a necessidade de internação e os cuidados na transmissão da doença são diferentes. Assim sendo, perante a dificuldade de detecção dos vírus no LCR por métodos que não sejam os moleculares, torna estes métodos a alternativa de escolha.

Com relação aos métodos moleculares, a aplicação da PCR quantitativa em testes diagnósticos, se comparada à PCR ou PCR *nested*, possui diversas vantagens. O teste pode ser feito com maior rapidez, já que não há necessidade de manusear os produtos após a PCR e por não haver uma etapa *nested*. Os riscos de contaminação, e consequentes resultados falso-positivos, são minimizados, pois não há necessidade de abertura do sistema e os produtos amplificados são detectados por medidas de fluorescência. Outra opção importante é que a qPCR permite estimar a quantidade inicial de material genético na amostra, de maneira rápida, prática e segura se comparada aos outros métodos disponíveis. Em comparação com os métodos de isolamento viral, a qPCR apresenta maior biossegurança para o analista, pois seu princípio não se baseia no aumento da carga viral. Também deve ser levada em consideração a possibilidade de automatização do processo, uma questão importante quando se trata de métodos diagnósticos modernos. Além de todas as vantagens apresentadas, vale lembrar ainda que os custos relacionados ao diagnóstico são mais baixos, o que torna a qPCR a metodologia mais adequada para a plataforma de diagnóstico proposta.

Assim quando consideramos a atual situação das meningites virais e falta diagnóstico do agente etiológico que prevalece em países em desenvolvimento, a detecção viral no LCR por qPCR para diagnóstico de meningite viral é um método rápido, reprodutível e específico para determinação da etiologia dessa doença. Desta forma o desenvolvimento tecnológico de aplicações baseadas em qPCR para o diagnóstico de meningite viral é um importante avanço no diagnóstico desta doença.

III. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

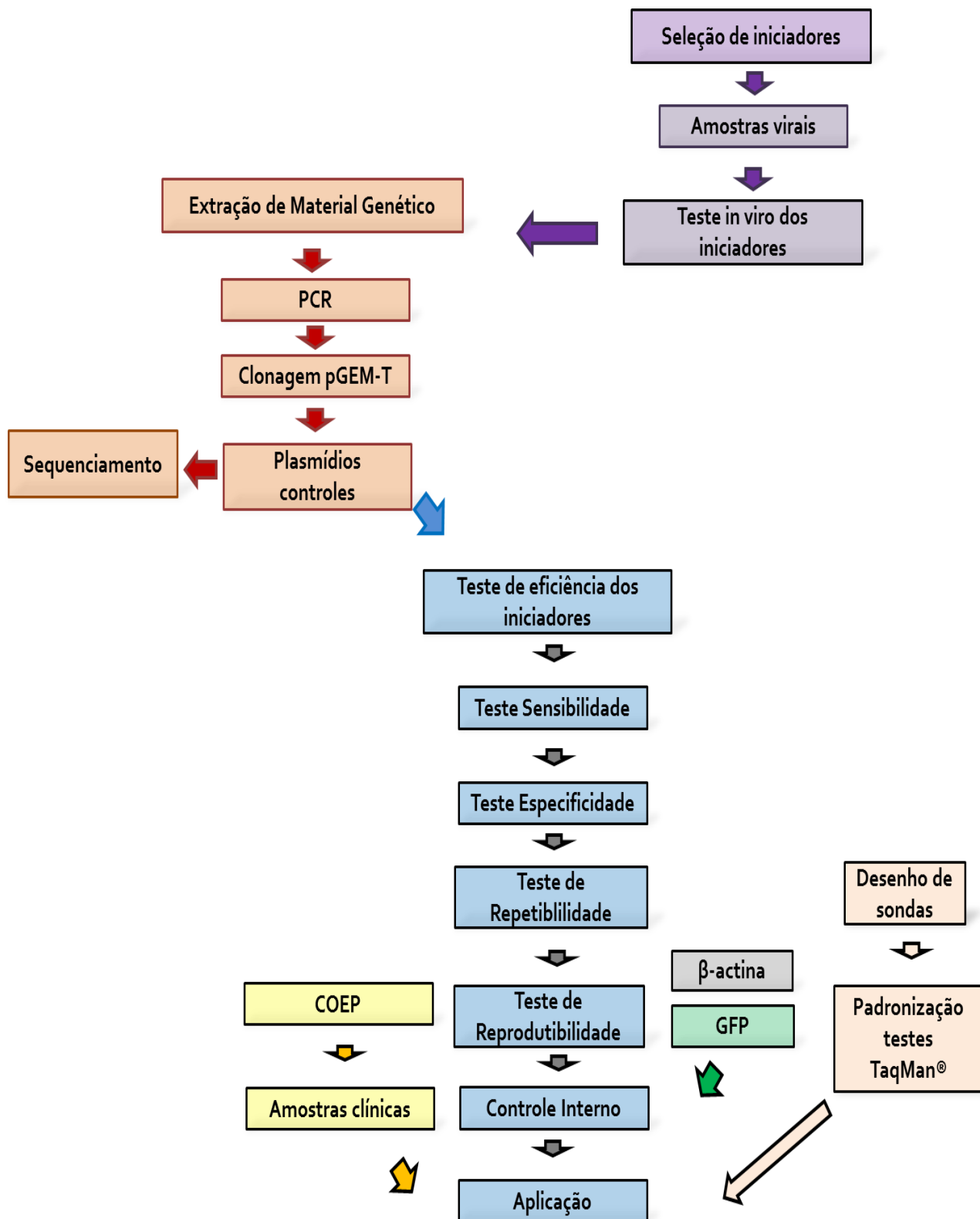
Utilizar qPCR para desenvolvimento e avaliação de uma plataforma de diagnóstico para de meningoencefalites causadas por vírus.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Selecionar e avaliar a eficiência de iniciadores para detecção por qPCR dos principais agentes virais causadores de meningoencefalites: enterovírus, flavivírus e herpes vírus neurotrópicos;
- ✓ Produzir controles virais e de plasmídeos, internos endógenos e exógenos para os testes de qPCR.
- ✓ Padronizar os ensaios de qPCR para detectar os vírus alvo da plataforma e avaliar os critérios de: sensibilidade, especificidade, reprodutibilidade e repetibilidade;
- ✓ Investigar o desempenho dos sistemas de detecção SYBR e TaqMan em relação aos ensaios de qPCR desenvolvidos para diagnóstico de meningoencefalites virais.
- ✓ Estabelecer critérios de pré-analíticos para processamento do LCR para alcançar a maior eficiência na detecção dos agentes virais de interesse;
- ✓ Utilizar a plataforma de qPCR desenvolvida para estabelecer a epidemiologia dos agentes virais causadores de meningoencefalites no hospital infantil de referência do estado de Minas Gerais;
- ✓ Avaliar a incidência de agentes virais em casos clínicos onde foram diagnosticadas as infecções bacterianas no SNC.

- ✓ Correlacionar os marcadores bioquímicos e citológicos clássicos do LCR utilizados no diagnóstico de infecções no SNC com os agentes virais detectados.

IV. FLUXOGRAMA DE TRABALHO



V. MATERIAIS E MÉTODOS.

5.1. VÍRUS

A amostra de enterovírus utilizada neste trabalho foi amostra vacinal Sabin que contem poliovírus I, II e III (SB Biological®- Bélgica).

A amostra de HHV-1 utilizada neste trabalho foi a amostra HHV-1 EK (NOGUEIRA, 1998). Esta amostra é um isolado clínico de HHV-1, proveniente de herpes labial em adulto saudável, que foi isolada em células de rim de macaco verde africano (células VERO - ATCC). Esta amostra foi isolada e caracterizada no Laboratório de Vírus da UFMG. A amostra de HHV-3 (VZV) utilizada foi a amostras HC05, proveniente de paciente com zoster ocular (Hospital das Clínicas da UFMG) e caracterizada no Laboratório de Vírus da UFMG em 1998 (NOGUEIRA, 1998). A amostra de HHV-5 (CMV) AD-169 adquirida da ATCC (VR-538)

As amostras de flavivírus utilizadas neste trabalho durante o desenvolvimento no laboratório de vírus foram as amostras YFV 17 vacinal, as amostras *Dengue virus* 1 e 2 que foram isolados no município de Ribeirão Preto (SP) e multiplicadas em cérebro de camundongo e em células em cultivo, sendo gentilmente cedidos pelo Dr. Luiz Tadeu Moraes Figueiredo. A amostra *Dengue virus* 3 foi gentilmente cedido pelo Dr. Pedro Vasconcelos do Instituto Evandro Chagas (Belém-PA). A amostra *Dengue virus* 4 foi isolada em 1981, na cidade de Boa Vista, sendo gentilmente cedida pelo Dr. Maurício Nogueira.

5.2. OBTENÇÃO DE PLASMÍDIOS CONTROLES

5.2.1. SELEÇÃO DOS INICIADORES E SONDAS

Os iniciadores e as sondas foram desenhados, ou modificados da literatura, ou obtidos literatura. Os iniciadores que foram desenhados para este trabalho foram designados para amplificação regiões conservadas dos vírus ou grupos virais que são alvo desta plataforma, para isso o software Primer Express®

v3.0 foi utilizado. A finalidade do desenho de novos iniciadores é a busca por iniciadores mais eficazes e também com características físico-químicas similares, pois assim eles podem tornar todas as reações da plataforma eficientes, específicas reprodutíveis (TABELAS 2 E 3).

Tabela 2: Iniciadores da plataforma

Iniciador	Sequência	Tamanho fragmento (pb)	Gene alvo	Referência
ENTV F	5' ACAIGGTGIGAAGAGTCTATTGAGCT 3'	114	5' UTR	Dierssen et al., 2008 (Modificado)
ENTV R	5' CCAAAGTAGTCGGTCCGC3'			
HHV-1/2 F	5'-ATCACGGTAGCCCGCCGTGTGACA-3'	76	DNA POL	Oliveira, D, B (dados não publicados)
HHV-1/2 R	5'-CATACCGAACGCACCACAC-3'			
HHV-3 F	5'-CATCTGCAATTATGCGTCCAA-3'	78	DNA POL	Oliveira, D, B (dados não publicados)
HHV-3 R	5'-GTTTCCATTGCTGAAT-3'			
HHV-5 F	5'-ATGTCCGTACAACATCAACT-3'	70	US 17	Oliveira, D, B (dados não publicados)
HHV-5 R	5'-ATGTCCGTACAACATCAACT-3'			
FLAV F	5'-ACGTGGACCGACAAGAAGAGTTTCG-3'	116	5' UTR	Chao et al., 2006
FLAV R	5'-ACGGTCGACCCGTCTTTTCCG-3'			
GFP F	5'-CTGCTGCCCGACAACCA-3'	82	GFP	Oliveira, D, B (dados não publicados)
GFP R	5'-TGTGATCGCGCTTCTCGTT-3'			
BACT F	5'-CCAACCGCGAGAAGATGA-3'	75	B- Actina humana	Oliveira, D, B (dados não publicados)
BACT R	5'-CCAGAGGCGTACAGGGATAG-3'			

Os principais parâmetros analisados pelo algoritmo do software Primer Express® v3. 0 foram: fragmento com tamanho entre 70-250pb, tamanho dos iniciadores entre 18-24 nt, ausência de estruturas secundárias internas, ausência de grandes repetições de bases, diferença de Tm menor do que 5°C entre os dois iniciadores, conteúdo de GC em torno de 50%, preferência por sequências ricas em GC na porção 3' terminal no iniciador e evitar a complementaridade de bases entre as sequências dos iniciadores (formação de dímeros).

Tabela 3: Iniciadores e sondas para detecção de Flavivírus.

Primer	Sequência	Gene Alvo	Referência
DENV-1 F	CAAAAGGAAGTCGYGCAATA	NS5	Santiago et al., 2013 (Modificado)
DENV- 1 R	CTGAGTGAATTCTCTCTGCTRAAC	NS5	
DENV-1 P	CATGTGGTTGGGAGCACGC	NS5	
DENV-2 F	CAGGCTATGGCACYGTCACGAT	E	
DENV- 2 R	CCATYGCAGCARCACCATCTC	E	
DENV-2 P	CTCYCCRAGAACGGCCTCGACTTCAA	E	
DENV-3 F	GGACTRGACACACGCACCCA	prM	
DENV- 3 R	CATGTCTCTACCTTCTCGACTTGYCT	prM	
DENV-3 P	ACCTGGATGTCGGCTGAAGGAGCTTG	prM	
DENV-4 F	TTGTCCTAATGATGCTRGTCTG	prM	
DENV- 4 R	TCCACCYGAGACTCCTTCCA	prM	
DENV-4 P	TYCCTACYCTACGCATCGATTCCG	prM	
WNV F	CAGACCACGCTACGGCG	3`UTR	
WNV R	CTAGGGCCGCGTGGG	3`UTR	
WNV P	TCTGCGGAGAGTGCAGTCTGCGAT	3`UTR	
SLEV F	CAGGGAATTACCAATGTCTAAAAA	5` UTR	Oliveira, D, B (Dados não publicados)
SLEV R	AGCATATTGACAACCCGGTTTC	5` UTR	
SLEV P	CCAGGAAAACCCG	5` UTR	
YFV F	TCGTAAAGCTCAGGGAAAAACC	5`UTR	
YFV R	GGAGCGAACTCCTCGTCGTA	5` UTR	
YFV P	TGGGCGTCAATATG	5` UTR	
JEV F	CCTGGGAATAGACTGGGAGATCT	3`UTR	
JEV R	CGGCGCTCTGTGCCTAGTAG	3`UTR	
JEV P	TGCTCTATCTCAACATCA	3`UTR	

5.2.2. EXTRAÇÃO DE RNA VIRAL

O material genético a ser obtido nessa etapa foi utilizado na construção de vetores plasmidiais com insertos específicos para todos os vírus com genoma de RNA do presente trabalho. Para a extração de RNA Poliovírus (do gênero *Enterovírus*), YFV (do gênero *Flavivirus*), DENV 1, DENV 2, DENV 3, DENV 4, WNV, SLEV e JEV foi utilizado o Kit QIAmp® Viral RNA (QIAGEN®, U.S.A.).

Cerca de 140 μL da suspensão de células infectadas foram lisadas pela solução tampão AVL e, após a lise, as amostras foram aplicadas a uma coluna com afinidade para o RNA e submetidas a uma centrifugação de 8.000 x g, por 1 min. Em seguida, as amostras foram lavadas duas vezes: a primeira com a solução tampão AW1 e a segunda com a solução tampão AW2. Após o processo de lavagem, o RNA foi eluído da coluna, pela solução AVE e estocado a -70°C .

5.2.3. PRODUÇÃO DE cDNA

O RNA extraído serviu de molde para a produção de uma cadeia complementar de DNA (cDNA) utilizando a enzima M-MLV RT com o iniciador e iniciadores randômicos (Invitrogen[®]) para todos os vírus de RNA.

Para a produção de DNA complementares (cDNA), cerca de 1 a 5 μg de RNA extraído foi incubado a 70°C por 5 min, juntamente com os iniciadores randômicos (2,5 $\mu\text{mol}/\mu\text{L}$). Após incubação em banho de gelo, os seguintes componentes foram adicionados à reação: 4 μL de tampão de RT-PCR 5X (Tris a 250mM pH 8.9, MgCl_2 a 15mM, KCl a 375mM, DTT a 50mM), 2 μL de dNTP (10mM) e 0,5 μL (20U) de RNAsin (Ribonuclease Inhibitor-Promega- EUA), seguido por incubação a 42°C por 5 min. No terceiro ciclo foi adicionado 1 μL (200U) de enzima M-MLV RT (200U/ μL) (Promega Corporation-EUA). Essa mistura foi incubada por 60 min a 37°C , sendo então resfriada em banho de gelo. O produto da transcrição reversa foi conservado à temperatura de -70°C até sua utilização.

5.2.4. EXTRAÇÃO DE DNA

Com o objetivo de obter material genético para a construção de vetores plasmidiais com insertos específicos para as amostras de HHV-1, HHV-3 e HHV-5, foi feita a extração de DNA das amostras virais. Para isso, foi utilizado o método de extração com fenol, clorofórmio e álcool isoamílico (SAMBROOK, 1989), com modificações. Foi acrescentados 500 μL de material (meio de cultura e partículas virais) e igual quantidade da preparação fenol: clorofórmio: álcool isoamílico (25:24: 1). Após agitação constante, as mesmas foram

incubadas a 37°C por 5 min. As misturas foram então centrifugadas a 4.400 x g por 5 min em microcentrífuga à temperatura ambiente. Com auxílio de uma micropipeta, as duas fases formadas foram separadas, transferindo-se a fase aquosa para microtubos novos, onde foram novamente submetidas ao tratamento com fenol:clorofórmio:álcool isoamílico e, ao sobrenadante final, foi adicionado igual volume de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1). A mistura foi agitada rapidamente e centrifugada a 12.000 x g por 5 min. Após a centrifugação, a fase aquosa foi transferida para um novo tubo e foram adicionados 2,5 volumes de etanol 100% (4°C) e acetato de sódio 3M pH 5,2 até uma concentração final de 0,25M, sendo o tubo invertido suavemente e incubado à -20°C *overnight*. O sedimento foi obtido após 30 min de centrifugação a 16.000 x g a 4°C e homogeneizado em 500µL de etanol 70% gelado. Após suave homogeneização, a mistura foi centrifugada a 17.000 x g por 5 min, sob refrigeração de 4°C. O sobrenadante foi descartado e foram adicionados 30µL de água pura e a mistura homogeneizada e estocada sob refrigeração.

5.2.5. TESTE DO INICIADORES “*in vitro*”

Os iniciadores para a detecção dos diferentes vírus foram testados na qPCR utilizando mix comercial na concentração 1X (SYBR Green[®] PCR Master Mix, Applied Biosystems), 200nM de cada iniciador e água ultra pura para que juntamente com a amostra fosse obtido um volume final de 10 µl.

O cDNA (YFV e Poliovírus) e DNA (HHV-1 e HHV-3) obtidos nos processos anteriores foram utilizados como molde amostra para o teste inicial dos iniciadores. Foi utilizado 1µl do cDNA de YFV, 1µl de cDNA de poliovírus, 10ng de DNA de HHV-1, 10ng de DNA HHV-3 e 10ng de DNA HHV-5 nas reações como os respectivos iniciadores. Todas as reações descritas neste estudo foram feitas em duplicata e sempre utilizando um controle negativo no qual a amostra era substituída por água.

Os iniciadores de FLAV também foram testados com 1µl do cDNA de DENV1, DENV 2, DENV 3 e DENV 4.

As condições utilizadas para o Master Mix comercial (SYBR Green® PCR Master Mix, Applied Biosystems) no presente trabalho 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 65°C até 95°C.

Todas as qPCR do presente trabalho foram feitas utilizando o termociclador *StepOne*® da Applied Biosystems e os dados de detecção e quantificação foram coletados e analisados pelo *software StepOne*® versão 2.1 da Applied Biosystems.

Durante a padronização os fragmentos de DNA amplificados foram fracionados eletroforéticamente em gel de agarose a 1,0% em TAE 1X (0,04M Tris-Acetato; 0,001M EDTA) e 1X de SYBR Safe™ (Invitrogen, E.U.A). O gel foi submetido à voltagem de 100V imerso em solução de TAE. Foram aplicados 10 µL do produto da reação, misturados a 1,0 µL do tampão de corrida (azul de Bromofenol 2,5%, TAE 10X e glicerol 50%). As bandas foram visualizadas em um transiluminador de luz ultravioleta. Também foi incluído no gel um padrão de tamanho molecular 100 pb DNA ladder (Promega, E.U.A.) para identificação do tamanho do produto.

Os produtos amplificados específicos de cada reação e que apresentarem bandas na altura esperada foram recuperados do gel e purificados [Gel Extraction Kit (QIAGEN E.U.A.)].

5.2.6. EXTRAÇÃO DE DNA DO GEL

A recuperação do DNA amplificado a partir do fragmento de gel foi feita utilizando o Gel Extraction Kit (QIAGEN®, U.S.A.). Todos os procedimentos foram feitos seguindo o protocolo do fabricante. O fragmento de gel excisado foi pesado e foi acrescentado o tampão QG em um volume indicado pelo fabricante. A mistura foi incubada por 10 min a 50°C, sendo homogeneizada no meio do intervalo. Em seguida, foram acrescentados 200 µL de isopropanol e a

preparação foi homogeneizada e transferida para uma mini coluna. Nesta etapa, foi feita uma centrifugação de 15.000 x g por 1 min, sendo descartado o eluato. Foram acrescentados 500 µL de tampão QG na coluna e feita uma nova centrifugação, descartando o eluato obtido. Um volume de 750 µL de tampão PE foi acrescentado na coluna e foi feita uma nova centrifugação, descartando o eluato. O tubo coletor foi trocado e 30 µL de água foram adicionados. Novamente, foi feita uma centrifugação de 15.000 x g por 1 min. A coluna foi descartada e o DNA do extrato foi dosado através do espectrofotômetro ND-1000 (NanoDrop Technologies). O extrato obtido foi armazenado a -20°C.

5.2.7. LIGAÇÃO DOS PRODUTOS DE PCR AO VETOR PGEM-T

Os produtos obtidos nas reações de qPCR de YFV, poliovírus, HHV-1, HHV-3 e HHV-5 foram inseridos no vetor pGEM-T de acordo com a técnica descrita pelo fabricante do kit pGEM-T easy vector system (Promega Corporation, EUA), utilizando a proporção de 3:1 (inserto: plasmídeo) na reação de ligação. Estas construções foram utilizadas como controles positivos na padronização das qPCR e para teste de eficiência dos iniciadores.

A montagem da reação foi feita com 5,0 µL de tampão de ligação 2X (60mM TRIS-HCl pH 7,8; 20mM MgCl₂, 20mM DTT, 2mM ATP, 10% polietilenoglicol), 1,0 µL de pGEM-T (50 ng), 1,0 µL de T4 DNA ligase, a quantidade calculada de inserto e água para completar um volume final de 10 µL. A reação foi incubada a 4°C por 16 horas e o produto de ligação foi utilizado para transformação de *Escherichia coli* DH5α quimicamente competentes.

5.2.8. TRANSFORMAÇÃO BACTERIANA (SAMBROOK ET AL, 1989)

O produto da ligação entre o fragmento de DNA do PCR e o vetor pGEM foi utilizado para a transformação de bactérias *Escherichia coli* DH5α quimicamente competentes, preparadas conforme o protocolo descrito por SAMBROOK e colaboradores (1989).

Para a transformação, foram utilizados 5,0 µL do material proveniente da ligação e 100 µL de bactéria competente DH5α descongelada em banho de

gelo. Os tubos foram levemente agitados e incubados em banho de gelo por 30 min. Após essa etapa de incubação, foi feito o choque térmico incubando-se os tubos por 2 min a 42°C e novamente resfriados em banho de gelo por 2 min. Em seguida, foi adicionado 1,0 mL de meio LB sem antibiótico a cada tubo e os mesmos foram incubados a 37°C por 1 hora (HANAHAN *et al.*, 1991). A cultura bacteriana resultante foi centrifugada a 600 x g por 5 min. O volume de 1,0 mL do sobrenadante foi removido e os 100 µL restantes foram utilizados para homogeneizar o sedimento. Todo o volume da suspensão bacteriana foi plaqueado em meio LB-ágar (1% bacto-triptona; 0,5% bacto-extrato de levedura; 1% NaCl; 1% Ágar) contendo ampicilina (50 µg/mL). As placas foram incubadas em estufa a 37°C por 16 horas. Paralelamente, foi feito o controle do crescimento de bactérias competentes não transformadas em placa LB-ágar na presença de ampicilina.

5.2.9. TRIAGEM DAS COLÔNIAS

As colônias foram selecionadas e multiplicadas em 1,0 mL de meio LB contendo ampicilina (50 µg/mL). Os tubos foram incubados em um agitador (Shaker Superohm g-25, Brasil) por 4 horas a 37°C com agitação de 180 rpm. As culturas bacterianas resultantes foram utilizadas em reações de PCR com iniciadores específicos para o fragmento de interesse. Alíquotas de 1,0 µL da cultura bacteriana foram utilizadas como moldes de PCR em um volume final de 20 µL. Os produtos das reações de PCR foram fracionados eletroforicamente em gel de agarose 1% a 100V.

5.2.10. OBTENÇÃO DE DNA PLASMIDIAL EM PEQUENA ESCALA

Para a obtenção do plasmídeo em pequena escala foi utilizado o Kit Wizard Plus SV Minipreps (Promega Corporation – EUA). As bactérias foram crescidas em 10 mL de meio LB contendo ampicilina por 16 horas à temperatura de 37°C com agitação de 180 rpm. Após o crescimento, as culturas foram centrifugadas e o sobrenadante foi descartado. Foi acrescentado ao sedimento 300 µL de solução de ressuspensão com posterior homogeneização em agitador de tubos. Em seguida, foram adicionados 300 µL de solução de lise e a mistura foi homogeneizada por inversão do tubo por 4 vezes. Após essa etapa, foram

adicionados 300 μ L de solução de neutralização, com homogeneização e centrifugação do material a 13000 x g por 15 min, em microcentrífuga Eppendorf 5415C. O sobrenadante foi transferido para uma coluna, onde foi centrifugado e lavado com 2,0 mL de solução de lavagem. O DNA foi eluído da coluna com água, por centrifugação a 13000 x g, e utilizado para dosagem em espectrofotômetro ND-1000 (NanoDrop Technologies). O restante foi armazenado à temperatura de -20°C.

5.2.10.1. QUANTIFICAÇÃO DO NÚMERO DE CÓPIAS PLASMIDIAIS

Para obter o número de cópias de plasmídeo foi utilizado a plataforma *on line* para cálculos desta natureza o site “Science Primer” (disponível on line: <http://scienceprimer.com/copy-number-calculator-for-realtime-pcr>). Com esta ferramenta pode ser obtido o número de cópias fornecendo a quantificação do plasmídeo (ng) e o tamanho (pb).

5.2.11. SEQUENCIAMENTO

O sequenciamento para confirmação do conteúdo do inserto foi feito pelo método de dideoxi descrito por SANGER e colaboradores (1977), em sequenciador automático capilar Mega Bace 1000 (Ge Healthcare), utilizando o kit DYEnamic™ ET Dye Terminator (Mega BACE™), seguindo as condições de reação e leitura indicadas pelo fabricante.

Aproximadamente 200-400 ng do plasmídeo foram utilizadas nas reações de sequenciamento empregando os iniciadores universais do tipo M13. A reação de sequenciamento foi feita em placa de 96 poços, em termociclador Eppendorf 96-well Mastercycler®, com o seguinte ciclo: desnaturaçãõ a 95°C por 25 s, pareamento do iniciador a 50°C por 15 s e extensão a 60°C por 3 min, sendo este ciclo repetido por 36 vezes. Em seguida, o produto do sequenciamento foi purificado por uma reação de precipitação utilizando acetato de amônio e etanol, e homogeneizado em tampão de amostra.

Os resultados do sequenciamento foram armazenados sob a forma de cromatogramas processados automaticamente pela plataforma mencionada.

As sequências foram manualmente inspecionadas para eliminar as regiões do vetor e as de baixa qualidade.

5.2.12. ANÁLISE DAS SEQUÊNCIAS

A montagem e visualização das sequências finais foram obtidas a partir da análise dos cromatogramas, utilizando-se os programas Chromas Lite™ (Technelysium Pty Ltd) e CAP3 *Sequence Assembling Program* (HUANG & MADAN, 1999), através da *home-page* da Embrapa (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária) do Brasil (disponível em: <http://asparagin.cenargen.embrapa.br/phph/>).

As sequências obtidas foram comparadas com as sequências depositadas no GenBank, utilizando-se os programas BLASTn e BLASTx (ALTSCHUL *et al.*, 1997; www.ncbi.nlm.nih.gov/blast).

Os alinhamentos das sequências de nucleotídeos e aminoácidos foram feitos com o auxílio do programa MEGA 4 (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>).

5.3. PADRONIZAÇÃO E VALIDAÇÃO DA PLATAFORMA DE qPCR - SYBR GREEN®

5.3.1. TESTE DE EFICÁCIA DOS INICIADORES

Depois de cumpridas as etapas de teste dos iniciadores e obtenção dos plasmídeos controles foi feito o teste de eficiência dos iniciadores. Para isso, foram utilizadas várias diluições de base 10 dos plasmídeos controles de cada reação, com a concentração de DNA variando em uma escala de 1 ng/μL até 100 fg/μL. Os parâmetros mais importantes analisados nesta etapa foram a eficiência da reação (inclinação da curva padrão), o coeficiente de linearidade e o limite de detecção. Os testes de sensibilidade foram feitos em paralelo com o mix comercial (SYBR Green® PCR Master Mix, Applied Biosystems) e as condições foram as descritas no item 5.2.5.

5.3.2. TESTE DE ESPECIFICIDADE

Nessa etapa os iniciadores propostos para cada vírus tiveram sua especificidade testada. Este ensaio foi feito em qPCR empregando os iniciadores e como amostra molde outros vírus da mesma família e também outros possíveis agentes de meningites virais. Foram preparadas reações com cada iniciador e foi utilizado como amostra molde para as reações 1µl do cDNA de YFV ou 1µl de cDNA de poliovírus ou 10ng de DNA de HHV-1 ou 10ng de DNA HHV-3.

5.3.3. AVALIAÇÃO DE MÉTODOS DE PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS

Para avaliar a melhor forma de se processar o LCR no laboratório, foi feita a contaminação de um “LCR mimético” (descrito a seguir no item 5.3.4.1) com partículas virais que representassem os vírus do gênero *Enterovirus* (Poliovírus), do gênero *Flavivirus* (YFV) e a família *Herpesviridae* (HHV-1). Foram empregadas quantidades de vírus contaminantes de 10⁶ pfu/mL (padrão 10⁶) de cada vírus citado acima até 1 pfu/mL. Foi produzido 1mL de cada concentração de vírus.

Para avaliar a melhor forma de detecção dos vírus de RNA porções de cada padrão foram submetidos a duas formas de extração com o Kit QIAmp® Viral RNA (QIAGEN® , U.S.A.) já descrito no item 5.2.2 ou com TRIZOL® (Invitrogen), que será descrito a seguir. Após a extração o cDNA foi produzido para cada amostra (cada padrão após cada método de extração) conforme descrito no item 5.2.3. Os cDNAs foram utilizados para mensurar por qPCR a tempo qual a forma mais eficiente de extração de RNA.

Para os vírus de DNA porções de cada padrão foram diluídas em água ultrapura 10x e 100x ou submetidos a extração de DNA como descrito no item 5.2.4. As amostras diluídas e as extraídas foram utilizadas na qPCR para se determinar a concentração eficiente.

5.3.3.1. PADRÕES DE LCR MIMÉTICO

Uma solução que mimetiza o LCR em relação à concentração de íons, açúcar, proteínas e células foi feita. Esta solução tem em sua composição 1% de soro fetal bovino, 10mM de CaCl_2 , 10mM de KCl, 4mM de Glicose, 1000 células A549 por mL e água ultrapura. Foi acrescentado a este LCR mimético 10^6 pfu/mL de HHV-1, 10^6 pfu/mL de YFV ou 10^6 pfu/mL de poliovírus, sendo esta solução diluída na base 10 sucessivamente até o padrão de LCR mimético até a concentração de 1 pfu/mL de cada vírus (RATNAMOHAN. *et al.*, 1989).

As células A549 são células derivadas de carcinoma de pulmão humano. As células A549 foram cultivadas em meio mínimo de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM), suplementado com 5% de soro fetal bovino (SFB) (CULTILAB, Brasil), gentamicina (50 $\mu\text{g/mL}$) (SIGMA, EUA), penicilina potássica (100 U/mL) SIGMA, EUA) e fungizona (2 $\mu\text{g/mL}$) SIGMA, EUA). As células foram mantidas em garrafas apropriadas e incubadas em atmosfera de 5% CO_2 a 37°C.

5.3.3.2. EXTRAÇÃO DE RNA POR TRIZOL[®]

A extração de RNA total foi feita com o reagente TRIZOL[®] (Invitrogen). 150 μL das amostras foram homogeneizadas com 750 μL de TRIZOL[®] e incubadas à temperatura ambiente por 5 min. Para a separação das fases, foi adicionado clorofórmio (200 μL) e as misturas foram incubadas à temperatura ambiente por 15 min. As preparações foram centrifugadas a 12.000 x g por 15 min à 4°C. Após a separação, a fase aquosa dos tubos, contendo o RNA, foi transferida para um novo tubo. A precipitação do RNA foi feita pela adição de 500 μL de isopropanol e incubação à temperatura ambiente por 10 min. As preparações foram centrifugadas a 12.000 x g por 10 min à 4°C. Após a remoção do sobrenadante, foi feita a lavagem do precipitado adicionando-se 1 mL de etanol a 75%, com posterior centrifugação a 7500 x g por 5 min à 4°C. O sobrenadante foi novamente removido com subsequente secagem do

precipitado à temperatura ambiente por 5 – 10 min. A dissolução do RNA foi feita adicionando-se 50 µL de água livre de RNase/DNase. As preparações foram incubadas por 10 min à 55 – 60°C para dissolução completa do RNA. As soluções obtidas foram aliquotadas e armazenadas à -70°C até a sua utilização.

5.3.4. TESTE DE SENSIBILIDADE ANALÍTICA

Para avaliar a sensibilidade da plataforma em amostra clínica, foram feitos experimentos utilizando os padrões de “LCR mimético” contaminados com partículas virais que representassem os vírus do gênero *Enterovirus* (poliovírus), do gênero *Flavivirus* (YFV) e a família *Herpesviridae* (HHV-1).

Os padrões com quantidades virais que variavam entre 10^6 pfu/mL à 1 pfu/mL dos vírus HHV-1, YFV e poliovírus, foram utilizados em ensaios de qPCR com os iniciadores para HHV-1/2, ENTV e FLAV; estas reações foram utilizadas para mensurar a sensibilidade da detecção dos vírus do gênero *Enterovirus*, do gênero *Flavivirus* e da família *Herpesviridae*.

Os padrões utilizados neste teste foram diluídos os 10x (usado 1µl por reação) para as reações com iniciadores de HHV-1/2. Para as reações com os iniciadores para ENTV e FLAV o RNA extraído com o Kit QIAmp® Viral RNA (QIAGEN®, U.S.A.), já descrito no item 5.2.2, e o cDNA (usado 1µl por reação) foi produzido conforme descrito no item 5.2.3.

Todos iniciadores foram utilizados na concentração de 200nM nas reações no mix comercial (SYBR Green® PCR Master Mix, Applied Biosystems) como descrito no item 5.2.5. Todas as reações foram feitas em duplicata.

5.3.5. CONCENTRAÇÃO DOS INICIADORES

O método utilizado para definição da melhor concentração dos iniciadores foi através da titulação nos iniciadores nas concentrações de 200nM a 800nM.

Neste teste foi utilizado o padrão de LCR mimético (item 5.3.4.1) com 10^4 pfu/mL para o teste dos iniciadores de HHV-1/2 e o padrão de 10^3 pfu/mL para testar os iniciadores de ENTV e FLAV.

Com exceção das concentrações dos iniciadores todos os outros parâmetros da qPCR foram empregados como descrito no item 5.2.5..

5.3.6. REPETIBILIDADE

A repetibilidade foi estimada pela avaliação da variação nos resultados de replicas de uma amostra, realizada no mesmo ensaio e em um mesmo laboratório. A análise da repetibilidade foi feita utilizando o critério de coeficiente de variação (CV), a partir dos valores de média e desvio padrão dos Cts. Os valores foram representados em porcentagem e a tolerância foi de até 10% de variação (OIE, 2010).

Para a análise da repetibilidade das reações da plataforma, foi feita 21 vezes a mesma reação, utilizando mesmo equipamento, no mesmo laboratório e por um mesmo analista. Neste teste foi utilizada a menor quantidade viral detectada nos padrões do teste de sensibilidade analítica, item 5.3.5. Assim foi feito o teste utilizando padrão com HHV-1(10^4 pfu/mL) , YFV (10^3 pfu/mL) e poliovírus (10^3 pfu/mL) para se mensurar a repetibilidade.

5.3.7. REPRODUTIBILIDADE

A reprodutibilidade se refere à capacidade de um método permanecer inalterado com variações pequenas nas condições do teste, que podem ocorrer em um laboratório durante a sua utilização. As mudanças foram feitas de forma deliberada e essa análise foram obtidos dados sobre a confiabilidade do método durante sua utilização na rotina laboratorial.

Para a análise da reprodutibilidade das reações envolvidas na plataforma, foram utilizadas duas variáveis: o analista e o equipamento. Dessa maneira, foram feitas reações em um mesmo equipamento por diferentes analistas, e também em um segundo equipamento. Cada analista fez duas reações em cada equipamento, para cada alvo (HHV-1/2, ENTV e FLAV). Como amostra também foi utilizados os padrões com HHV-1(10^4 pfu/mL) , YFV (10^3 pfu/mL) e poliovírus (10^3 pfu/mL).

A análise da reprodutibilidade foi feita utilizando o critério de coeficiente de variação (CV), a partir dos valores de média e desvio padrão dos Ct. Os valores foram representados em porcentagem e a tolerância foi de até 10% de variação.

A análise da repetibilidade foi feita utilizando o critério de coeficiente de CV, a partir dos valores de média e desvio padrão dos Ct. Os valores foram representados em porcentagem e a tolerância foi de até 10% de variação.

5.4. CONTROLE INTERNO

5.4.1. CONTROLE INTERNO EXÓGENO

Com a finalidade de controle do processo de diagnóstico foi desenvolvida uma relação para um controle interno exógeno, o tem a finalidade de ser adicionado em quantidade conhecida em todas as amostras clínicas utilizadas na plataforma de diagnóstico para padronizar as etapas pré-analíticas.

A finalidade deste controle interno é garantir que os resultados de quantificação não sejam negativos ou subestimados devido a perdas ou erros do processamento das amostras. Como controle interno foi utilizado o gene GFP (*Aequorea coerulea*), o qual a sequência foi adquirida comercialmente da empresa ClonTech® em um vetor (pEGFP-C1).

Os iniciadores tiveram sua eficiência mensurada através de diluição seriada do plasmídeo na base 10 com a concentração de DNA variando em uma escala de 1 ng/ μ L até 100 fg/ μ L. Análises foram feitas como no item 5.3.1.

Apesar do desenvolvimento do teste esse ainda não foi aplicado às amostras clínicas analisadas na plataforma.

5.4.2. CONTROLE INTERNO ENDÓGENO

Como objetivo se desenvolver um controle interno endógeno para as reações da plataforma e compará-lo como o controle interno exógeno, uma reação foi feita para detecção do gene da β -actina humana. Estes iniciadores tiveram sua eficiência mensurada como foi feito com os outros iniciadores no item 5.3.1.

5.5. TESTES TAQMAN®

5.5.1. TESTES TAQMAN® “two steps”

Testes TaqMan® foram desenvolvidos para detecção de HHV-1/2 e para detecção de vírus do gênero. As sondas foram desenhadas para se adequarem aos iniciadores já desenvolvidos para estes alvos, item 5.2.5.. Todas as reações foram feitas com iniciadores na concentração de 400nM e sondas a 200nM.

As condições utilizadas para o Master Mix comercial (TaqMan® PCR Master Mix, Applied Biosystems) no presente trabalho foram as seguintes: ativação enzimática a 50°C por 2min, desnaturação do DNA a 95°C por 10 min, seguido de 45 ciclos de 95°C por 15 seg. e 60°C por 1 min para amplificação e por fim uma curva de dissociação com aquecimento de 65 °C até 95 °C.

Todas as qPCRs do presente trabalho foram feitas utilizando o termociclador *StepOne*® da Applied Biosystems e os dados de detecção e quantificação foram coletados e analisados pelo *software StepOne*® versão 2.1 da Applied Biosystems.

5.5.2. TESTES TAQMAN® “one step”

Os iniciadores para a detecção específica dos flavivírus foram testados na qPCR utilizando mix comercial na concentração 1X (RNA-to-Ct™ 1-Step Kit Master Mix, Applied Biosystems), 1µM de cada iniciador e 360nM de cada sonda e água ultra pura para que juntamente com a amostra fosse obtido um volume final de 25 µl. As concentrações iniciadores e sondas foram usadas tanto nas reações “singleplex” quanto nas em “multiplex”.

Os RNAs obtidos (1µl), descrito no item 5.2.2, foram utilizados reações com os respectivos iniciadores. Todas as reações descritas neste estudo foram feitas em duplicata e sempre utilizando um controle negativo no qual a amostra era substituída por água.

As condições utilizadas para o Master Mix comercial (RNA-to-Ct™ 1-Step Kit Master Mix, Applied Biosystems) no presente trabalho foram as seguintes: transcrição reversa a 50°C por 2min, desnaturação do DNA a 95°C por 10 min e por fim 45 ciclos de 95°C por 15 seg. e 60°C por 1 min para amplificação.

Todas as qPCR do presente trabalho foram feitas utilizando o termociclador 7500® da Applied Biosystems e os dados de detecção e quantificação foram coletados e analisados pelo *software 7500®* versão 2.0.6 da Applied Biosystems.

Para os testes de eficiência dos iniciadores foram utilizados padrões com quantidades conhecidas de carga viral (cópias/mL) diluídos em água na base 10 (10⁶ até 10 cópias/mL) , estes padrões foram estabelecidos pelo FDA para uso mundial na quantificação de carga viral de flavivírus. Para os testes de sensibilidade analítica estes padrões foram diluídos em LCR mimético (10⁶ até 10² cópias/mL), como descrito no item 5.3.4.

5.5.3. EXTRAÇÃO DE RNA POR MICROESFERAS MAGNÉTICAS - FLAVIVÍRUS

Foram desenvolvidos ensaios para a purificação específica de RNA dos flavivírus alvo deste trabalho (DENVs 1-4, WNV, SLEV, YFV e JEV) utilizando “oligoprobes”, complementares à sequência genômica dos vírus, ligadas à microesferas magnéticas (Dynabeads® MyOne™ Streptavidin C1, Invitrogen USA). As oligoprobes para SLEV, YFV e JEV foram desenhadas após estudo da estrutura secundária do RNA destes vírus, para isso foi utilizado o serviço *online* “RNAfold web server” (<http://rna.tbi.univie.ac.at/cgi-bin/RNAfold.cgi>) . As “oligoprobes” apresentam aproximadamente 70 bases e são ligadas à biotina na porção 5', à sequência das sondas estão descritas na tabela 8. As sondas para extração de RNA de WNV e DENVs 1-4 foram desenhadas por Andriyan Grinev, pós doutor do “Laboratory of emerging pathogens” no FDA, EUA.

Para a extração de RNA, 140µl de LCR mimético foram misturados com 500 µL de tampão de lise (LB) e 3µl (10mg/mL) de microesferas ligadas às respectivas “oligoprobes”, essa mistura foi homogeneizada por 3 min manualmente e incubada no “termoblock” por 60 min (homogeneizando manualmente a cada 10 min). Posteriormente o aquecimento foi desligado e as amostras foram mantidas por mais 30 min no bloco sendo homogeneizadas a cada 10 minutos. Em seguida as amostras foram colocadas em uma rack magnética (DynaMag™-2 , Invitrogen) em temperatura ambiente por 20 min, e foi observado a precipitação das microesferas na lateral do tubo e o sobrenadante. Novamente o precipitado foi homogeneizado com 500µl de LB e colocado na rack magnética por 20 min, após descarte do sobrenadante o mesmo foi feito com o tampão de lavagem (WB). Descartado o WB as microesferas foram homogeneizadas em 50µl de água livre de RNase.

5.6.AVALIAÇÃO DA PLATAFORMA DE DIAGNÓSTICO

Nessa etapa foi utilizada uma coleção de amostras clínicas obtidas em colaboração com o Dr. Roney Coimbra. As amostras foram provenientes do

Hospital Infantil João Paulo II/FEHMIG (HIJPII), situado em Belo Horizonte - MG. Essas amostras foram utilizadas após a submissão e aprovação deste projeto no Comitê de Ética na Pesquisa do HIJPII e no Comitê de Ética em Pesquisa – COEP da UFMG, sendo que todos os pacientes ficaram cientes do estudo e suas metodologias e assinaram um termo livre e esclarecido da participação no estudo. Todas estas amostras de LCR obtidas no HIJPII eram acompanhadas de dados do prontuário dos pacientes. As informações citoquímicas do LCR e o diagnóstico da doença estabelecido no hospital foram coletadas.

Algumas amostras foram obtidas em colaboração com o Dr. Guilherme Machado do hospital Risoleta Neves, Venda Nova, MG, provenientes de pacientes com diagnóstico não determinado de doença grave no SNC.

Os critérios de processamento das amostras foram os estabelecidos no desenvolvimento da plataforma, descrito no item 6.6.3.. Resumidamente, para a detecção de HHV-1/2, HHV-3 e HHV-5 foi utilizado o LCR diluído 10x em água ultrapura e para FLAV, ENTV, e BACT 140µl de LCR foi destinado a extração de RNA, posteriormente feito o cDNA e 1µl foi utilizado nas reações.

As reações foram feitas utilizando o Master Mix comercial (SYBR Green[®] PCR Master Mix, Applied Biosystems) na concentração final de 1x, 200nM de iniciadores, 1 µL de amostra e água ultra-pura na quantidade suficiente para 10 µL. Informações adicionais sobre as condições de reação encontram-se detalhadas no item 5.2.5..

Os critérios avaliados para os resultados positivos foram: amplificação específica das replicas de controle positivo e ausência de amplificação específica nas replicas de controle negativo (água de injeção). Foi considerada amplificação específica aquela com diferença de até 3,0°C no T_m, para mais ou para menos quando comparada ao controle positivo. As amostras foram consideradas positivas quando houve amplificação específica em uma das replicas. As amostras foram consideradas negativas na ausência de amplificação ou quando apresentaram amplificação inespecífica nas replicas,

ou seja, com diferença de T_m acima de $3,0^\circ\text{C}$ quando comparadas ao controle positivo.

As amostras que tiveram resultados positivos para ENTV ou HHV-1/2 foram testados também com o sistema TaqMan®; as reações foram feitas com os mesmos parâmetros do item 5.5..

As amostras também foram testadas com os testes “one step” TaqMan para identificação dos flavivírus, os ensaios de qPCR foram feitos como descrito no item 5.5.2.

VI RESULTADOS

6.1 PADRONIZAÇÃO DA qPCR

6.1.1 TESTES DOS INICIADORES

Para a padronização do qPCR inicialmente foram feitos os testes dos iniciadores com a utilização de mix comercial (SYBR Green® PCR Master Mix, Applied Biosystems) na concentração recomendada pelo fabricante e os iniciadores na concentração final de 200 nM.

A reação para testar os iniciadores de HHV-1/2 foi feita utilizando com a amostra de 10 ng de DNA extraído de HHV-1 (EK). Com o emprego destes iniciadores houve a amplificação de DNA (FIGURA 14 A) de forma específica, como pode ser observado pela curva de dissociação, com Tm de 82,3°C (FIGURA 14B). Não houve amplificação no controle negativo da reação feito com água.

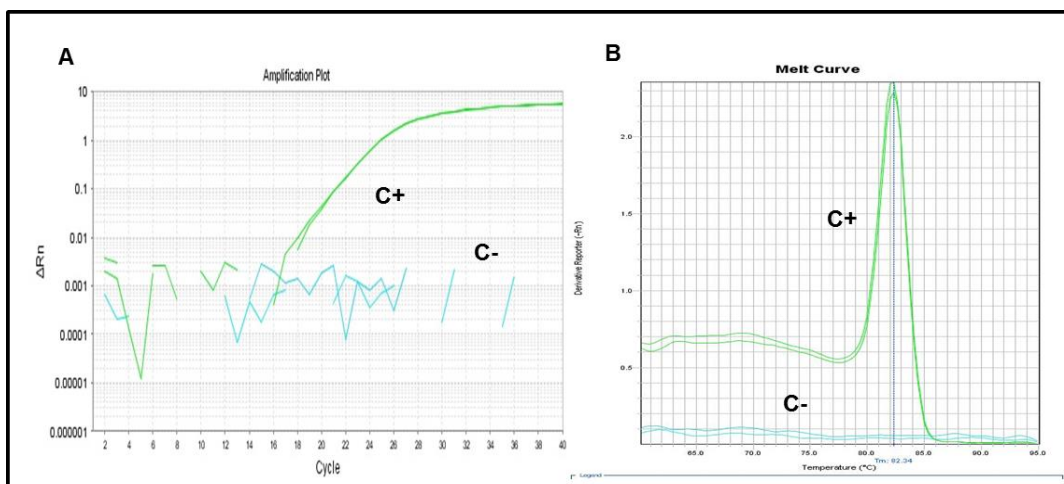


Figura 14: Teste dos iniciadores HHV-1/2 para padronização da qPCR. A) Curvas de amplificação na escala logarítmica. Curva de amplificação para 10 ng de DNA extraído de sobrenadante de células contendo HHV-1(C+) e o controle negativo utilizando água (C-). B) Curva de dissociação. Curva de dissociação do produto amplificado, Tm do fragmento foi de 82,3°C.

Empregando os iniciadores para detecção de HHV-3 foi amplificado DNA deste vírus de forma específica (FIGURA 15A), apresentando uma T_m de 80,4°C (FIGURA 15 B).

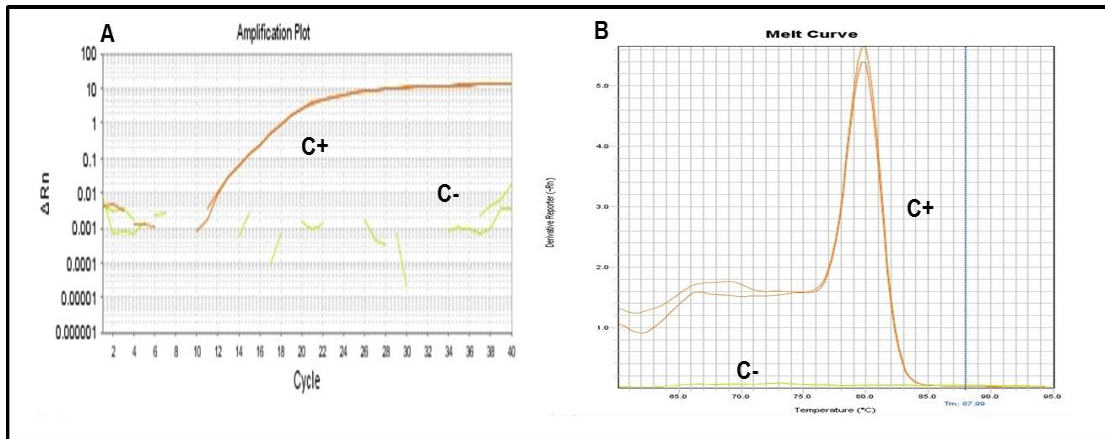


Figura 15: Teste dos iniciadores HHV-3 para padronização da qPCR. A) Curva de amplificação na escala logarítmica para 10 ng de DNA de uma amostra de HHV-3(C+) e o controle negativo utilizando água (C-). B) Curva de dissociação do DNA amplificado. T_m do fragmento do DNA foi de 80,4°C.

Com os iniciadores para detecção de vírus do gênero *Enterovirus* (ENTV) foi amplificado o DNA a partir do cDNA (1 μ l) obtido por transcrição reversa de RNA extraído de poliovírus (FIGURA 16A). O fragmento de DNA amplificado apresentou T_m de 80,0°C (FIGURA 16B).

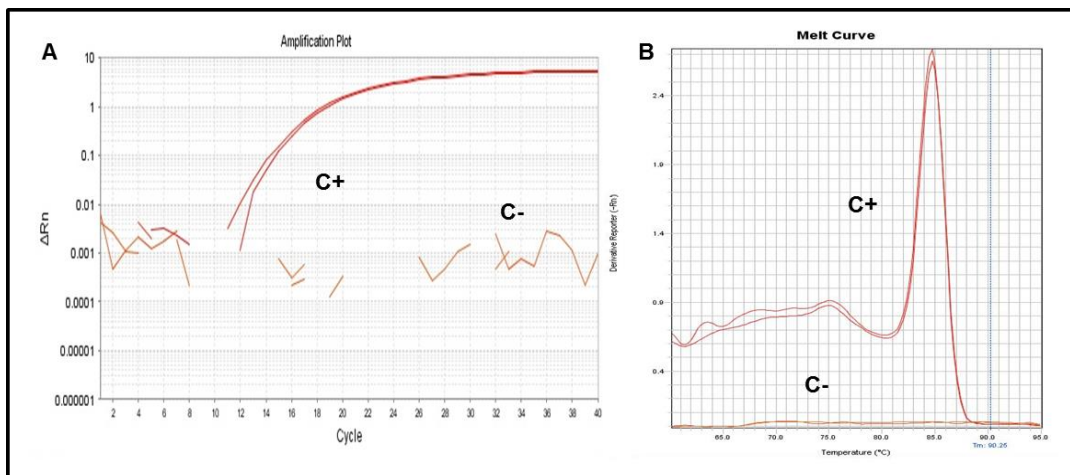


Figura 16: Teste dos iniciadores ENTV para padronização da qPCR. A) Curva de amplificação em escala logarítmica utilizando 1µl cDNA de *Poliovirus* (C+) e o controle negativo utilizando água (C-). B) Curva de dissociação do produto amplificado. Tm do fragmento de DNA foi de 84,0°C.

Assim como os outros iniciadores, os desenhados para detecção de vírus do gênero *Flavivirus* quando empregados foi amplificado DNA específico a partir do cDNA de YFV (FIGURA 17A) com um Tm= 82,5°C (FIGURA 17 B).

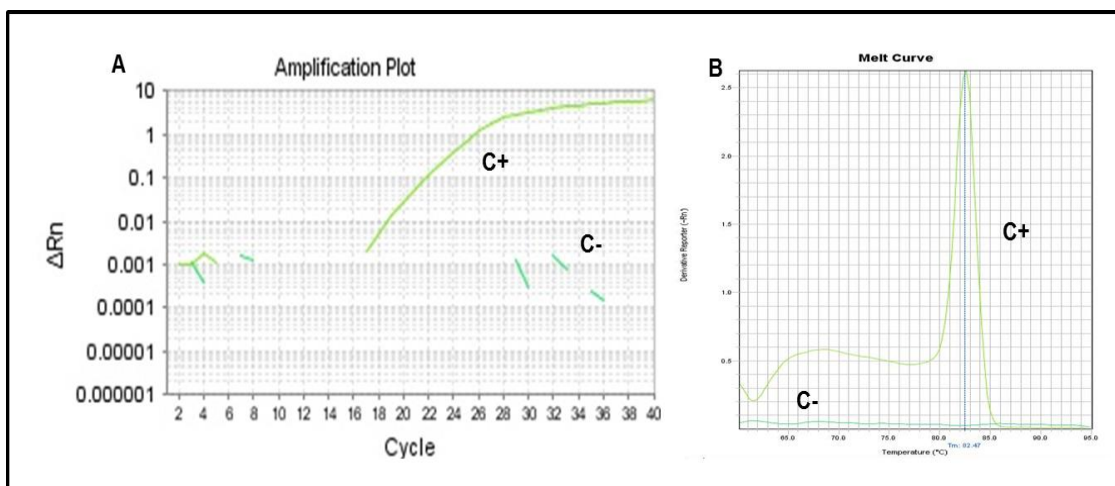


Figura 17: Teste dos iniciadores FLAV para YFV para padronização da qPCR. A) Curvas de amplificação na escala logarítmica para 1µl cDNA de YFV (C+) e o controle negativo utilizando água (C-). B) Curva de dissociação do DNA amplificado. Tm do fragmento foi de 82,5°C.

Os iniciadores de FLAV também foram testados com cDNA de DENVs 1, 2,3 e 4, e foi possível observar a amplificação de material genético viral, de forma específica, em todos os testes. Os fragmentos de DNA DENV 1, DENV 2 e

DENV 4 apresentaram a mesma T_m : 81,4°C. o T_m para DENV 3 foi de 79,1°C (FIGURA 18).

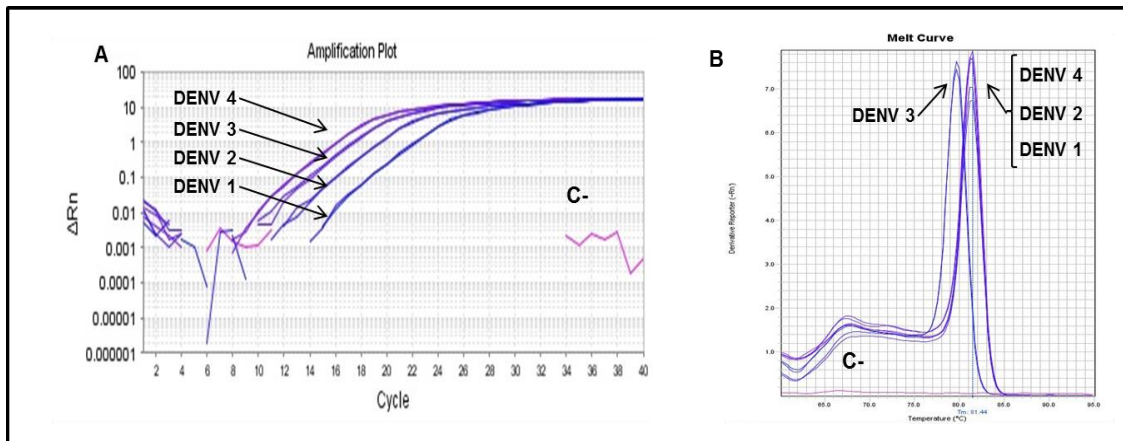


Figura 18: Teste dos iniciadores FLAV para DENV para padronização da qPCR. A) Curvas de amplificação na escala logarítmica para 1µl cDNA de DENV1, DENV 2, DENV 3 e DENV 4 e o controle negativo utilizando água (C-). B) Curva de dissociação do DNA amplificado. T_m dos fragmentos de DENV 1, DENV 2 e DENV4 foi de 81,4°C. T_m do fragmento de DENV 3 foi de 79,1°C.

Com o objetivo de verificar se os fragmentos de DNA amplificados apresentavam os tamanhos esperados, estes foram coletados após os qPCRs e submetidos a fracionamento em gel de agarose 1%. Todos os fragmentos de DNA amplificados apresentaram o tamanho esperado (FIGURA 19).

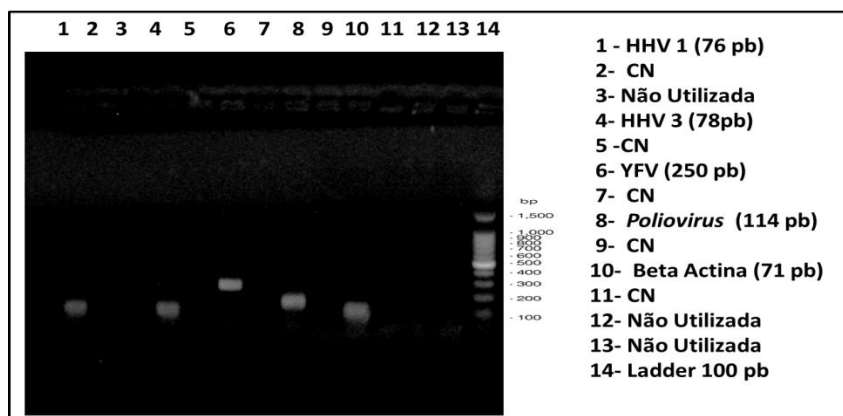


Figura 19: Eletroforese de produtos da qPCR obtidos a partir das reações para padronização da qPCR. Após a qPCR com iniciadores para HHV-1/2, HHV-3, ENTV, FLAV e BACT os DNAs amplificados foram submetidos a eletroforese em gel de agarose 1%, todos os fragmentos de DNA apresentaram o tamanho molecular esperado. *Ladder* 100pb: padrão de tamanho molecular.

6.1.2 OBTENÇÃO DE PLASMÍDEOS CONTROLES

Após a eletroforese (FIGURA 19) as bandas referentes aos produtos de PCR (HHV-1/2, HHV-3, ENTV, FLAV e BACT) foram extraídas do gel e purificadas. O DNA purificado de cada banda foi inserido no vetor pGEM-T, e empregado no processo de transformação de *E. coli* para cada fragmento separadamente.

A triagem das colônias foi feita por PCR com iniciadores específicos e o DNA plasmidial extraído apresentou concentrações de 144,0 ng/μL (HHV-1), 98,8 ng/μL (HHV-3), 230,1 ng/μL (poliovírus), 157,2 ng/μL (YFV) e 89,3 ng/μL (BACT). Este material foi utilizado no sequenciamento e as sequências nucleotídicas obtidas apresentaram alta similaridade com as amostras utilizadas como protótipos, presentes GenBank (FIGURA 20). Somente o produto clonado obtido a partir de YFV apresentou substituições nucleotídicas (3 no total), não comprometendo no entanto, sua utilização em testes posteriores.

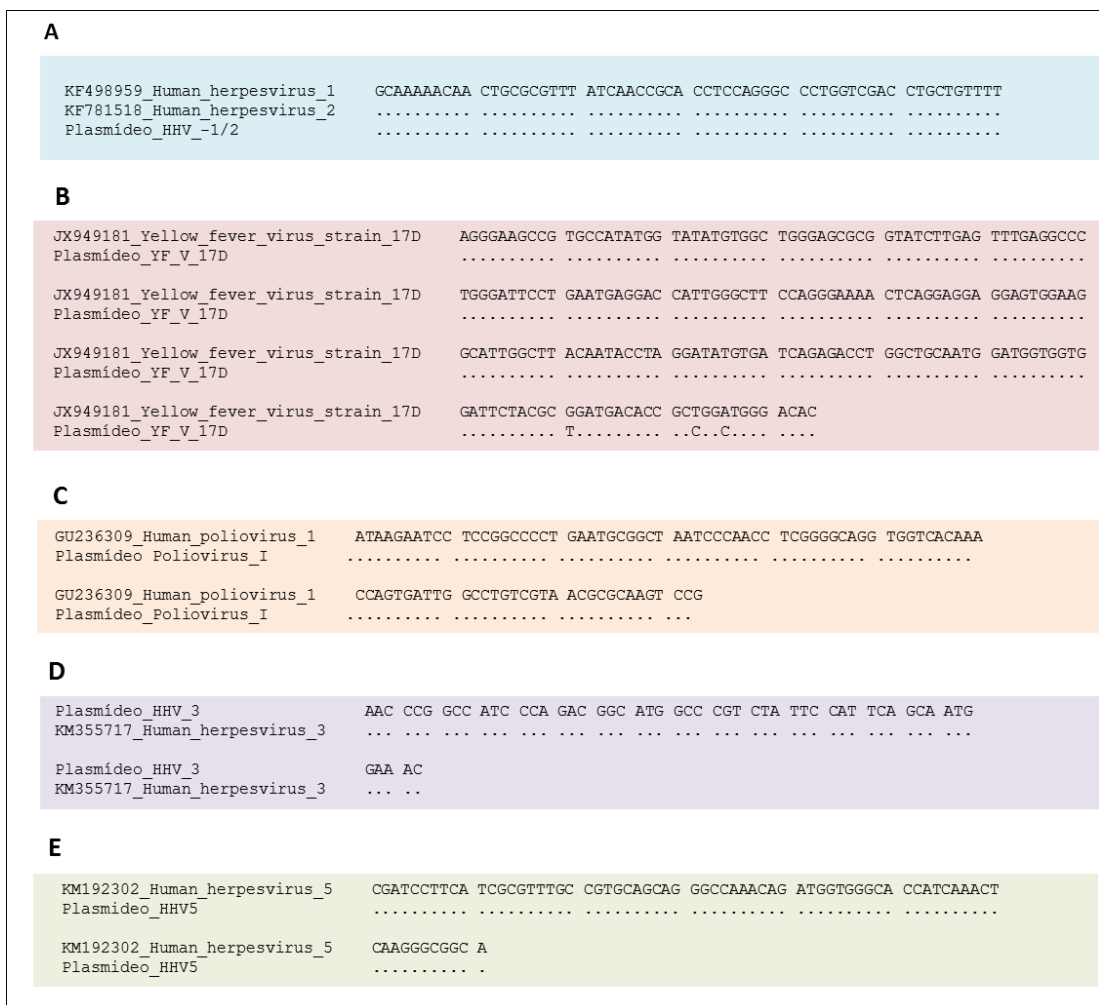


Figura 20: Alinhamento das sequências de nucleotídeos dos plasmídeos controle. Alinhamentos de sequencias nucleotídicas e o valor de identidade das sequencias dos plasmídeos controle com amostras do Genbank. A) HHV-1/2.- 100% B) YFV - 98% C) ENTV-100% D) HHV-3-100% E) HHV-5 – 100% Os alinhamentos foram feitos utilizando-se o programa MEGA 4.

6.1.3TESTE DE EFICIÊNCIA DOS INICIADORES

Para se determinar a eficiência de cada iniciador selecionado para a plataforma foi construída uma curva padrão para cada alvo, utilizando como padrão os respectivos plasmídeos controles.

A curva para testar a eficiência dos iniciadores foi feita com as diluições seriadas do plasmídeo controle que variaram de 1ng a 100fg. O resultado obtido para HHV-1/2 pode ser observado na FIGURA 21. A curva apresenta

cinco pontos alinhados e coeficiente de linearidade (R^2) igual a 0,992, com eficiência de aproximadamente 114%. Não foi observada amplificação no controle negativo.

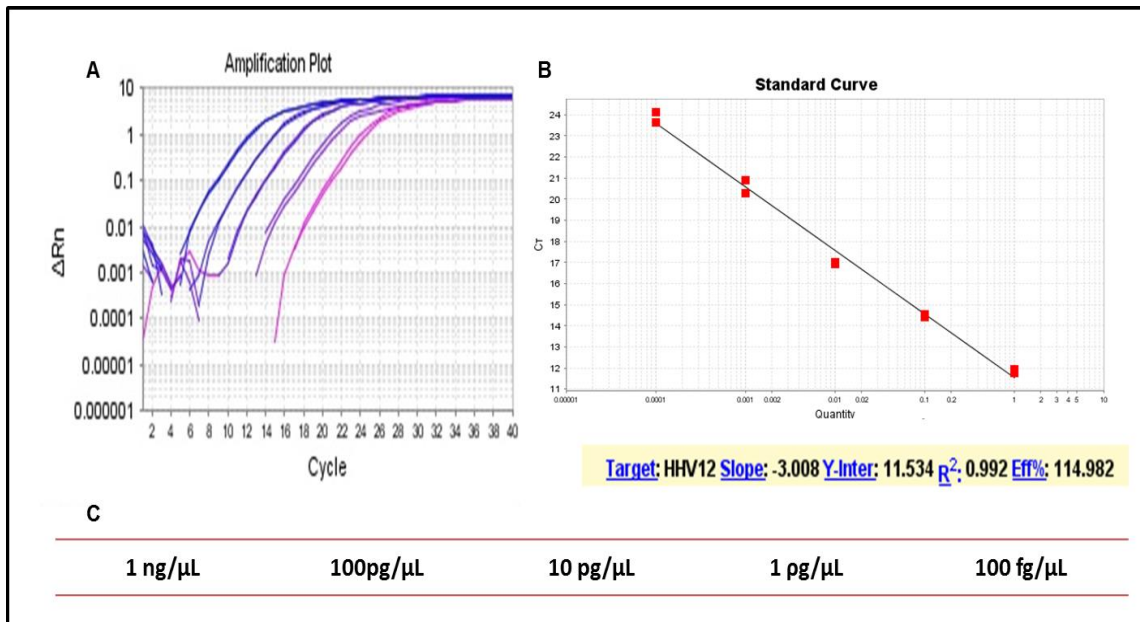


Figura 21: Teste de eficiência dos iniciadores HHV-1/2 na plataforma de qPCR. A) Curvas de amplificação na escala logarítmica para plasmídeo HHV 1 diluído na base, 1,0ng a 100fg. B) Curva padrão. Diluições seriadas do plasmídeo controle na base 10, variando de 1,0ng a 100fg com eficiência de 114%. C) Diluições utilizadas para fazer a curva padrão.

O resultado obtido da curva padrão feita para testar a eficiência dos iniciadores de HHV-3 pode ser observado na FIGURA 22. A curva apresenta cinco pontos alinhados e coeficiente de linearidade (R^2) igual a 0,993, com eficiência de 113%. Não foi observada amplificação de DNA no controle negativo.

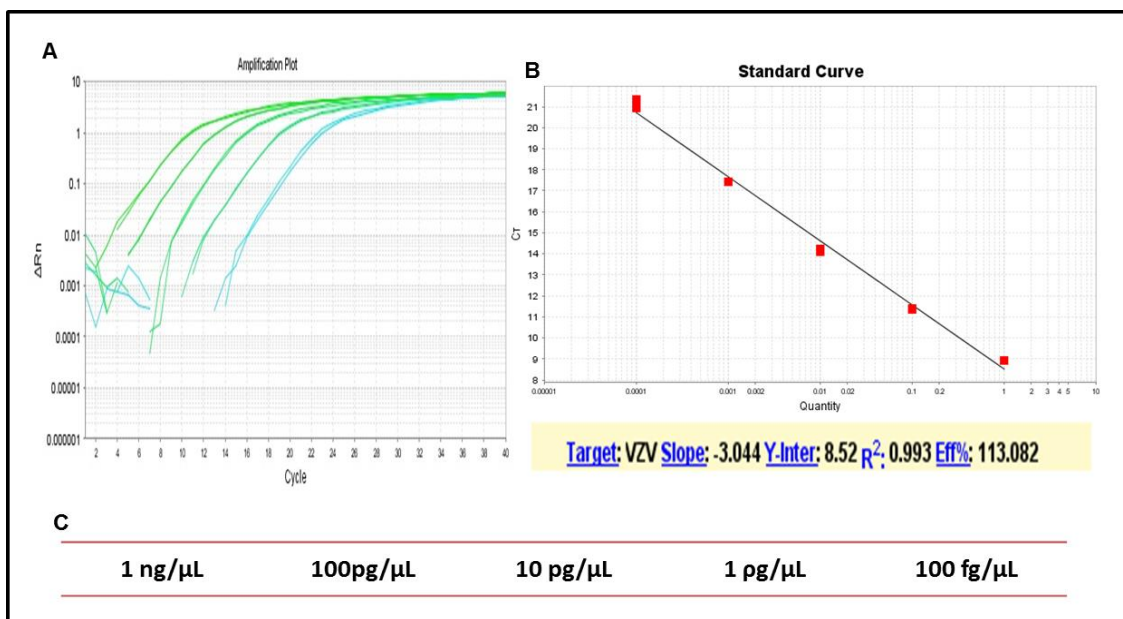


Figura 22: Teste de eficiência dos iniciadores HHV-3 na plataforma de qPCR. A) Curvas de amplificação na escala logarítmica para plasmídeo HHV-3 diluído na base 10, 1,0ng a 100fg B) Curva padrão com diluições seriadas do plasmídeo controle na base 10, variando de 1,0ng a 100fg com eficiência de 113%. C) Diluições utilizadas para fazer a curva padrão.

A curva padrão feita para testar a eficiência dos iniciadores de ENTV está demonstrada na FIGURA 23. A curva apresenta cinco pontos alinhados e coeficiente de linearidade (R^2) igual a 0,972, com eficiência de 110%. Não foi observada amplificação de DNA no controle negativo.

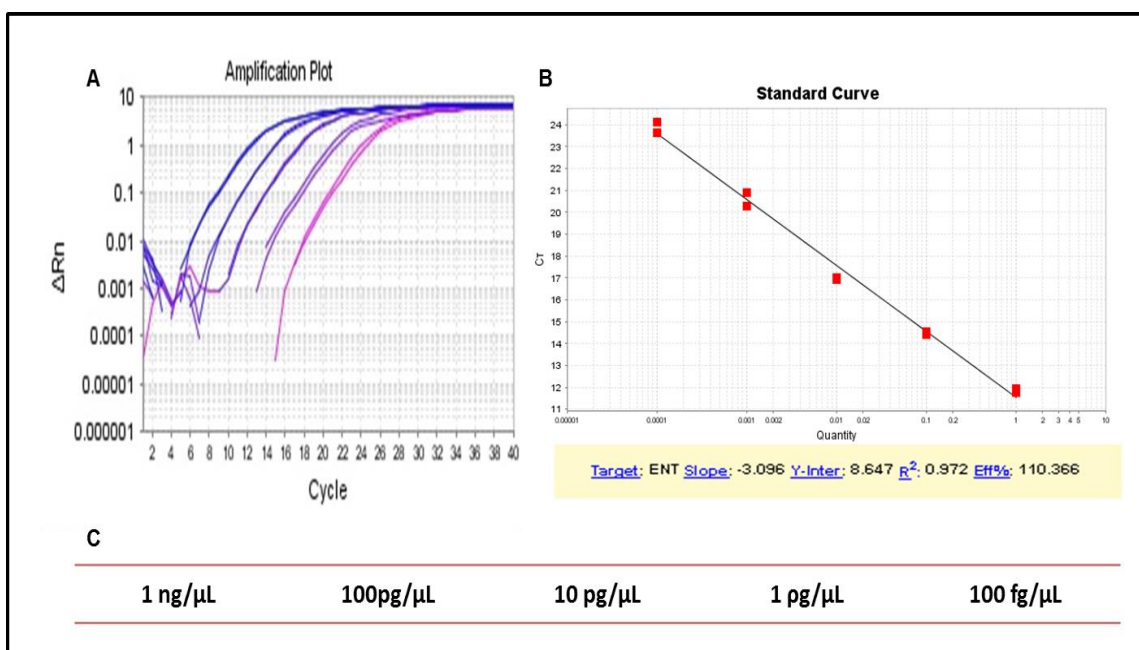


Figura 23: Teste de eficiência dos iniciadores ENTV na plataforma qPCR. A) Curvas de amplificação na escala logarítmica para plasmídeo poliovírus diluído na base 10, 1,0ng a 100fg

B) Curva padrão com diluições seriadas do plasmídeo controle na base 10, variando de 1,0ng a 100fg com eficiência de 110%. C) Diluições utilizadas para fazer a curva padrão.

A curva padrão de FLAV pode ser observada na FIGURA 24. A curva apresenta cinco pontos alinhados e coeficiente de linearidade (R^2) igual a 0,987, com eficiência de 92,0%. Não foi observada amplificação de DNA no controle negativo.

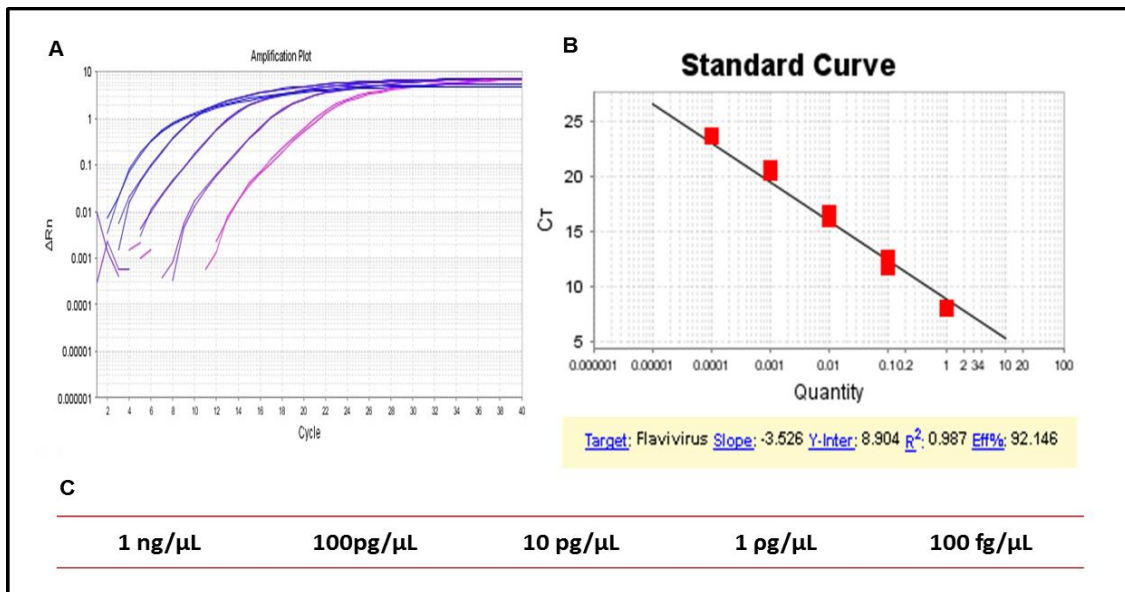


Figura 24: Teste de eficiência dos iniciadores FLAV na plataforma qPCR. A) Curvas de amplificação na escala logarítmica para plasmídeo YFV diluído na base 10, 1,0ng a 100fg B) Curva padrão com diluições seriadas do plasmídeo controle na base 10, variando de 1,0ng a 100fg com eficiência de 92%. C) Diluições utilizadas para fazer a curva padrão.

6.1.4. PADRONIZAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE INICIADORES

Com o objetivo de padronizar as concentrações dos iniciadores nos testes identificando os de melhor desempenho na detecção de padrões que mimetizam o LCR, diferentes concentrações dos iniciadores foram utilizadas em reações para detectar padrões com 10^3 pfu/mL HHV-1, 10^2 pfu/mL poliovírus e 10^2 pfu/mL YFV. Foi utilizado água ultrapura em todos os controles negativos. Como todas as reações descritas utilizando SYBR estes testes também foram

feitos Master Mix comercial (SYBR Green[®] PCR Master Mix, Applied Biosystems).

As concentrações utilizadas de iniciadores neste teste foram as de 200nM, 400nM, 600nM e 800nM. Para todas as reações com os iniciadores de HHV-1/2, ENT e FLAV a concentração de 200nM foi a mais eficiente. Nesta concentração não houve perda da sensibilidade nas reações e foi observado um menor número de reações inespecíficas no controle negativo quando comparado com as outras condições.

Os testes feitos com os iniciadores de HHV-1/2, estão representados na FIGURA 25. A concentração de 200nM apresentou a mesma sensibilidade que as reações com concentrações superiores, sendo capaz de detectar o padrão utilizado no ct 28. Assim esta concentração será adotada nos próximos testes deste trabalho.

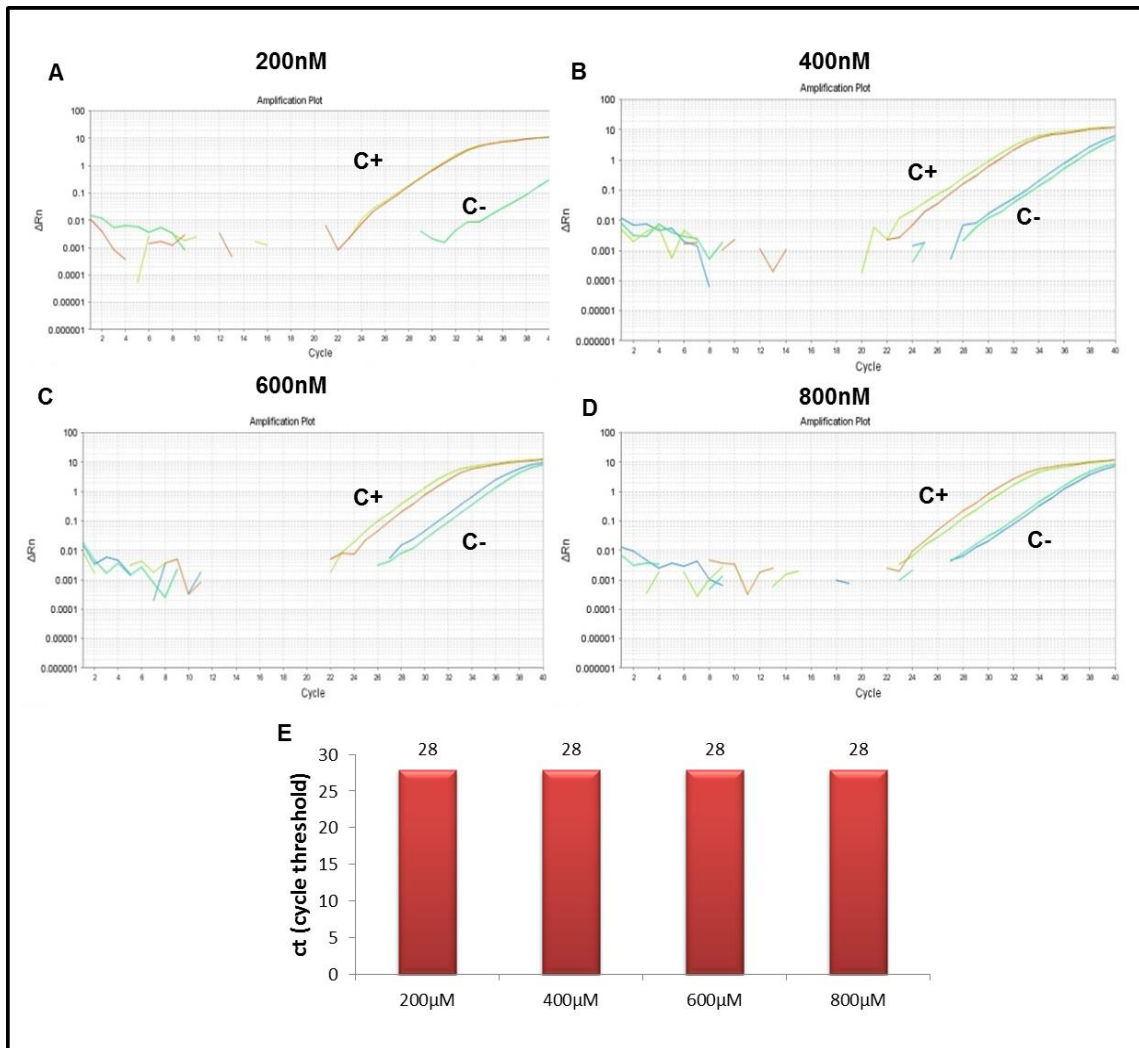


Figura 25: Padronização da concentração dos iniciadores HHV-1/2 na plataforma qPCR.

Curvas de amplificação em escala logarítmica. padrão com 10^3 pfu/mL HHV-1 e controle negativo empregando diferentes concentrações de cada iniciadore A) 200 nM B) 400 nM C) 600 nM D) 800 nM E) Gráfico da variação do Ct.

Os iniciadores para ENTV também apresentaram a mesma sensibilidade que as reações com concentrações superiores, sendo capaz de detectar o padrão utilizado no ct 25. Assim esta concentração será adotada nos próximos testes deste trabalho. quando utilizados na concentração de 200nM nas qPCRs (FIGURA 26).

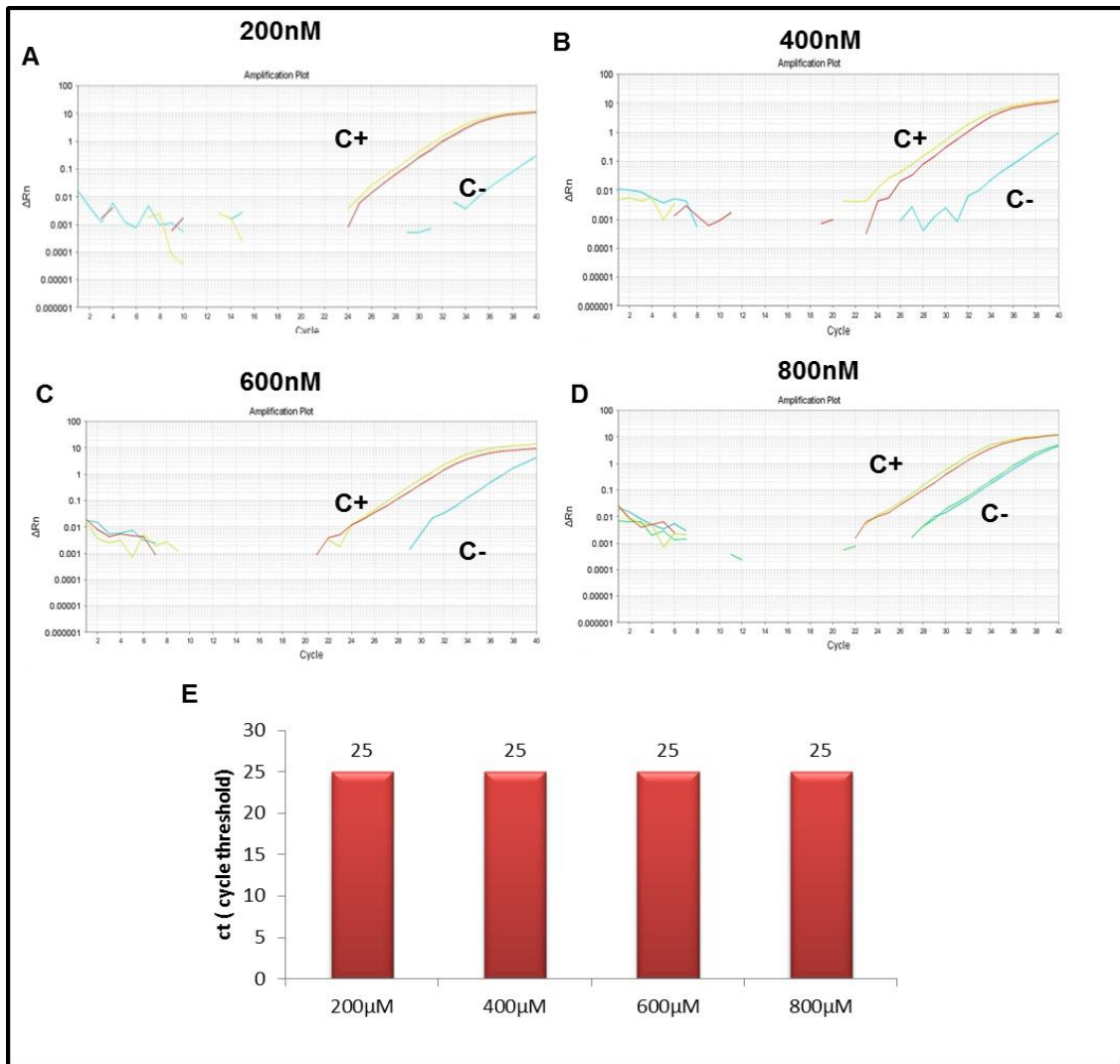


Figura 26: Padronização da concentração dos iniciadores ENTV na plataforma qPCR.

Curvas de amplificação em escala logarítmica. padrão com 10^2 pfu/mL poliovírus e controle negativo empregando diferentes concentrações de cada iniciadore A) 200 nM B) 400 nM C) 600 nM D) 800 nM E) Gráfico da variação do Ct.

Assim como para os outros iniciadores o de FLAV na concentração de 200nM apresentou a mesma sensibilidade que as reações com concentrações superiores, sendo capaz de detectar o padrão utilizado no ct 26. Assim esta concentração será adotada nos próximos testes deste trabalho. nas qPCRs (FIGURA 27).

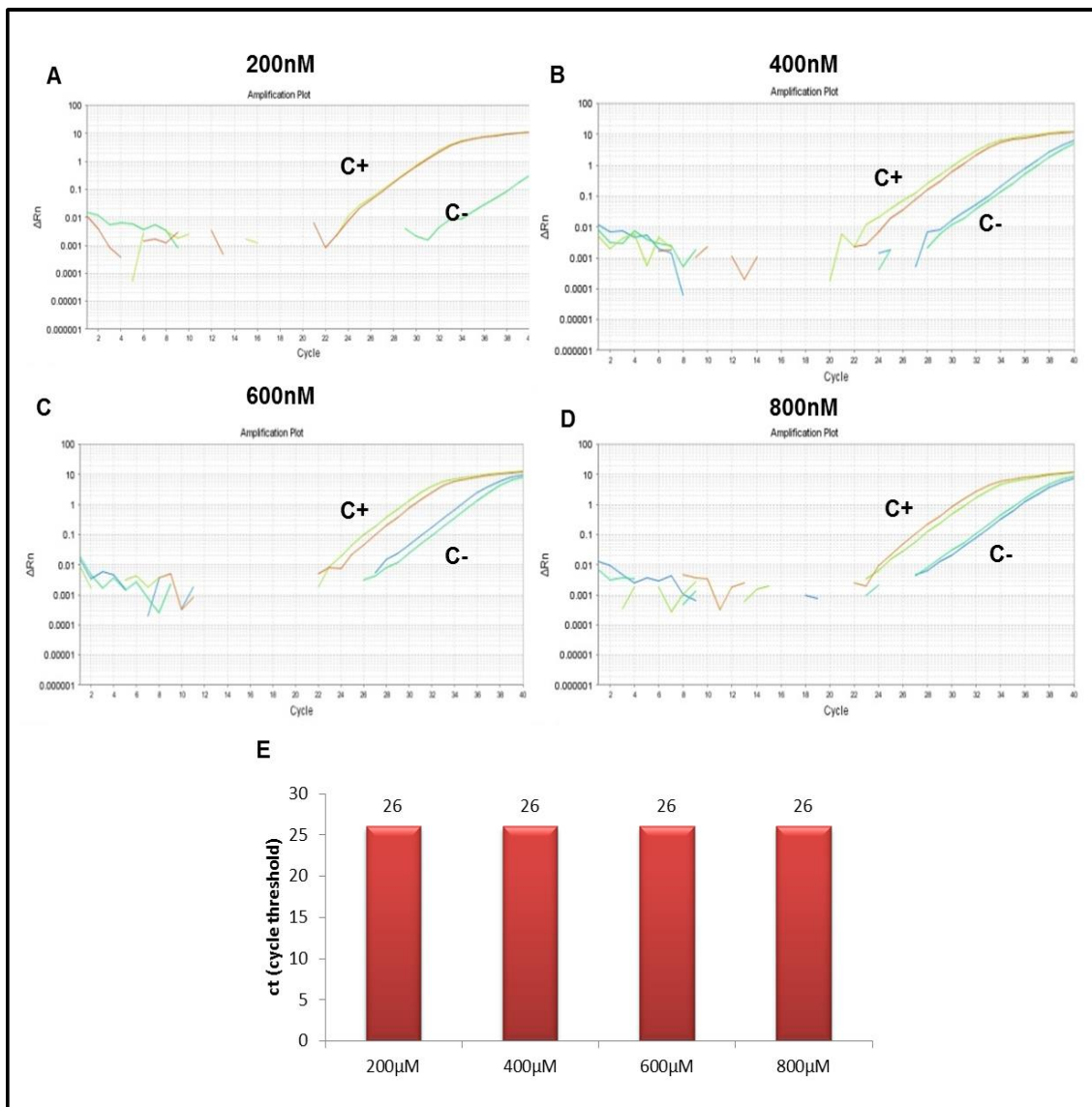


Figura 27: Padronização da concentração dos iniciadores FLAV na plataforma qPCR.

Curvas de amplificação em escala logarítmica, padrão com 10^2 pfu/mL YFV e controle negativo empregando diferentes concentrações de cada iniciadora A) 200 nM B) 400 nM C) 600 nM D) 800 nM E) Gráfico da variação do Ct.

6.2. SELEÇÃO DE MÉTODO PARA O PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS DE LCR

Este teste teve o objetivo de selecionar o método de processamento da amostra (LCR) mais eficiente para o diagnóstico por qPCR. Para isso foram construídos padrões que mimetizam o LCR e nesta matriz foram acrescentadas quantidades conhecidas de partículas virais de HHV-1, poliovírus e YFV. Nestes testes o HHV-1 representou os vírus da família

Herpesviridae, os poliovírus representam os vírus do gênero *Enterovirus* e o YFV representa os vírus do gênero *Flavivirus*. As concentrações de partícula viral infecciosas acrescentadas no “LCR mimético” variaram de 10^6 pfu/mL a 1pfu/mL.

6.2.1 VÍRUS DE DNA – HHV-1

Foi feita uma diluição da amostra de 10 ou 100 vezes em água ultrapura, ou foi feita a extração de DNA, pelo método do fenol-clorofórmio-álcool isoamílico, os produtos foram utilizados com amostra em qPCR com iniciadores HHV-1/2 (200nM). O “LCR mimético” com 10^6 pfu/mL foi o único ponto detectado após o processamento com os diferentes métodos.

A diluição do LCR mimético 10 vezes em água e a extração de DNA foram igualmente eficientes (detecção ct 26), porém a diluição das amostras 100 vezes em água foi menos eficiente gerando um sinal na detecção 256 vezes menor (FIGURA 28). Desta forma o método de diluição 10x em água foi o selecionado para os testes seguintes.

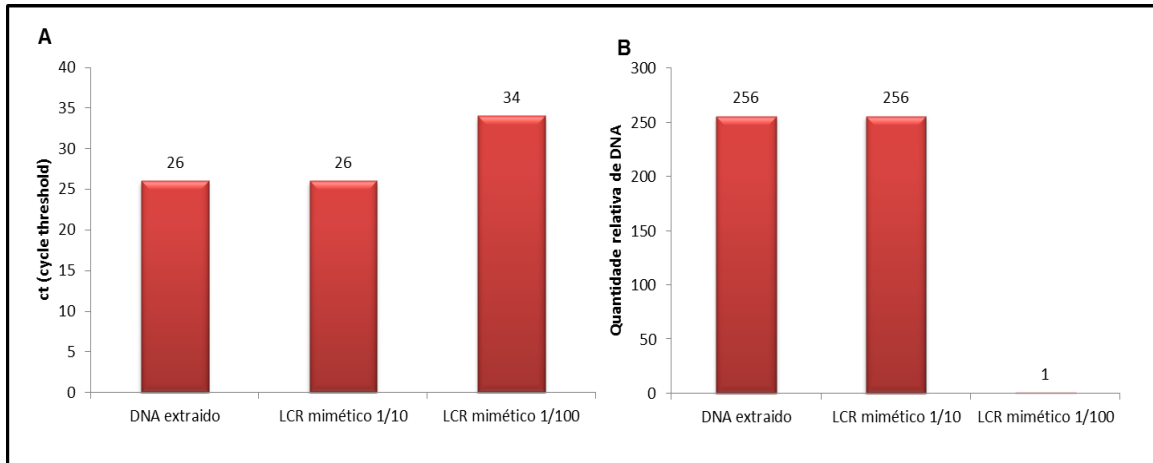


Figura 28: Processamento LCR contendo vírus de DNA para emprego na plataforma de qPCR. LCR mimético com 10^6 pfu/mL de HHV-1 foi processado por extração ou diluição.

A) Ct detecção das amostras. B) Quantidade relativa de DNA calculado baseado no Ct de detecção

6.2.3 VIRUS DE RNA – *Poliovirus*

Foram empregados dois métodos de extração de RNA para os testes de detecção de poliovírus: com o Kit QIAamp Viral® e com Trizol®. Em seguida, este material foi submetido a transcrição reversa e então foi feita a qPCR com os iniciadores ENTV (200nM). O “LCR mimético” com 10^5 pfu/mL foi o único ponto detectado após o processamento.

A extração utilizando o Kit QIAamp Viral® (detecção ct 24) foi mais eficiente gerando um sinal na detecção 512 vezes maior que a amostra extraída com Trizol® (FIGURA 29)

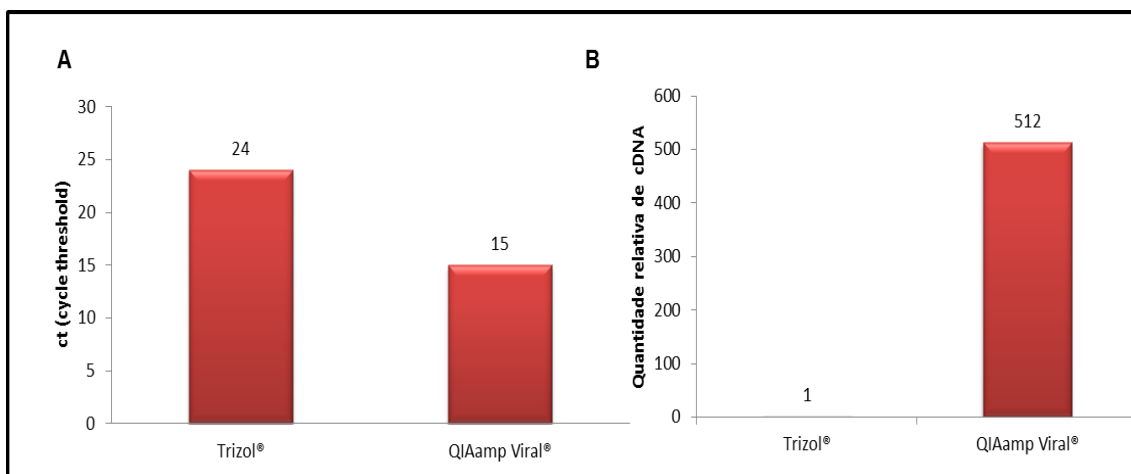


Figura 29: Processamento LCR contendo vírus de DNA para emprego na plataforma de qPCR. LCR mimético com 10^6 pfu/mL de poliovírus foi processado por extração com Trizol ou o kit QIAamp Viral. A) Ct detecção das amostras. B) Quantidade relativa de DNA calculado baseado no Ct de detecção

6.3 ALGORITMO PARA PROCESSAMENTO DA AMOSTRA LCR PARA PLATAFORMA DE qPCR

Baseado nos resultados obtidos foi formulado um algoritmo de como processar as amostras de LCR no laboratório para o diagnóstico viral baseado em qPCR (FIGURA 30).

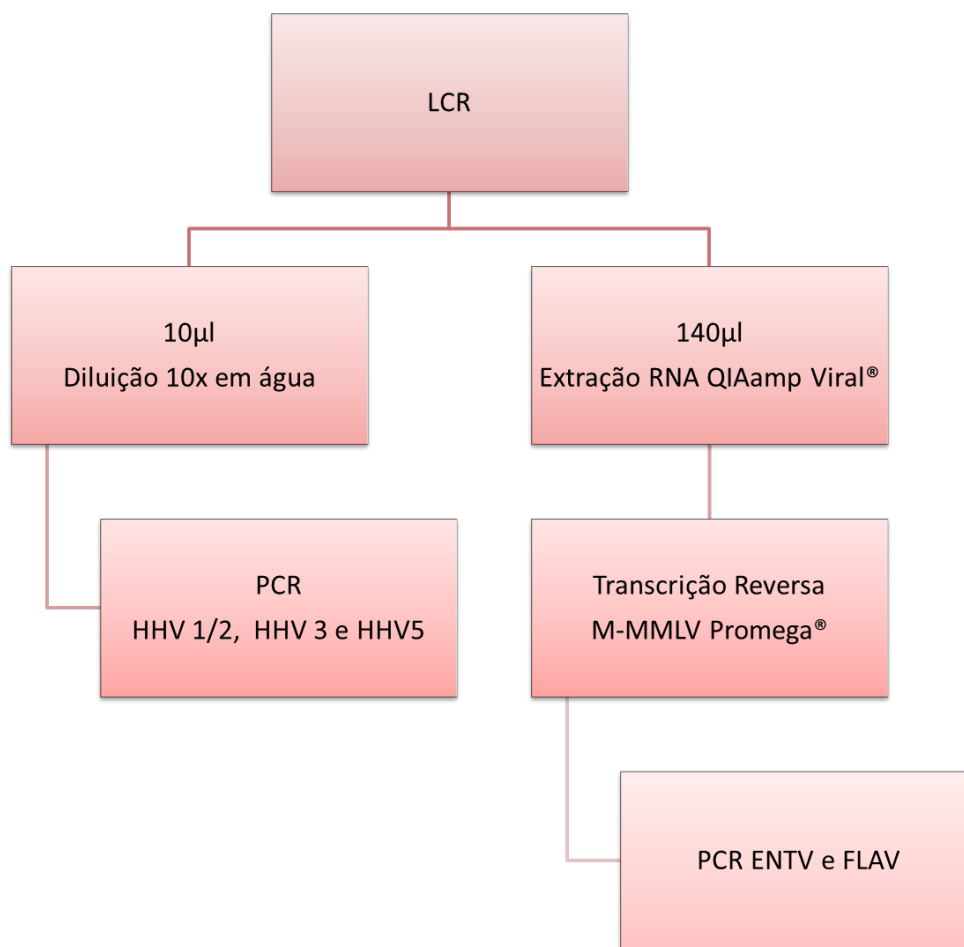


Figura 30: Algoritmo para processamento de LCR. Baseado nos resultados dos testes apresentados previamente, foi formulado um algoritmo para processamento dos LCR na plataforma de qPCR.

6.4. TESTE DE SENSIBILIDADE ANALÍTICA

Para determinar da sensibilidade analítica das reações da qPCR, foram utilizados os padrões que mimetizam o LCR com quantidades conhecidas de partículas virais de HHV-1, poliovírus e YFV, sendo que estas quantidades variaram de 10^6 pfu/mL a 1pfu/mL.

Para determinar a menor quantidade viral que a reação para HHV-1/2 é capaz de detectar, cada padrão foi diluído 10 vezes em água ultrapura e estas amostras utilizadas na qPCR com iniciadores para HHV-1/2. Foi possível detectar até 10^3 pfu/mL de HHV-1 (FIGURA 31).

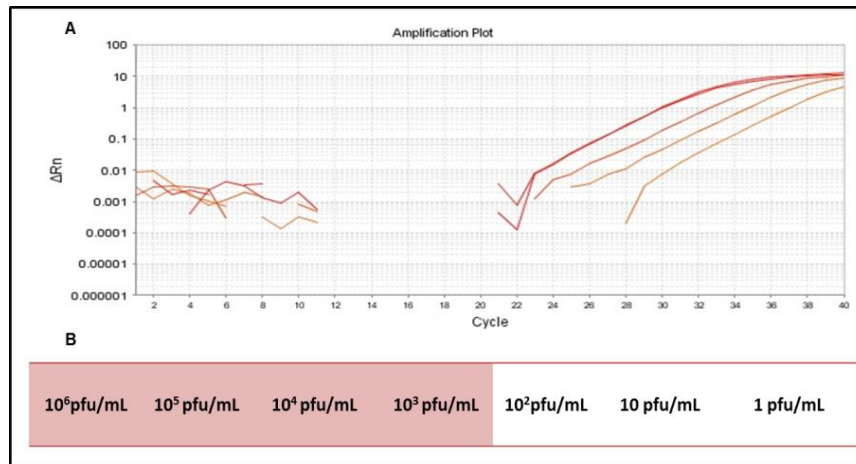


Figura 31: Teste de sensibilidade analítica HHV-1/2 na plataforma qPCR. A) Curvas de amplificação na escala logarítmica LCR mimético contendo de 1 a 10^6 pfu/mL B) Quantidade de partículas virais presente em cada amostra e a área demarcada em rosa mostra as quantidades de vírus que foram detectadas.

Da mesma forma que para a reação de HHV-1/2 foi feito o teste de sensibilidade analítica para a qPCR para ENTV, sendo que neste teste foi empregado poliovírus como representante deste gênero. A reação para ENTV foi mais sensível que a para HHV-1/2, sendo capaz de detectar até 10^2 pfu/mL, como demonstrado na FIGURA 32.

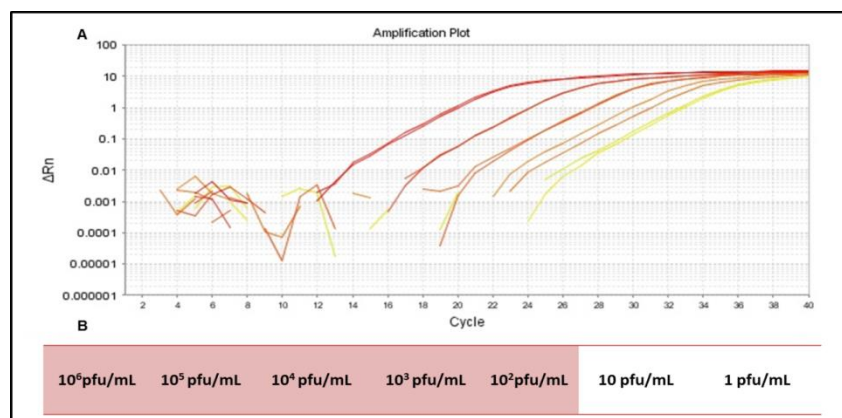


Figura 32: Teste de sensibilidade analítica ENTV na plataforma qPCR. A) Curvas de amplificação na escala logarítmica LCR mimético contendo de 1 a 10^6 pfu/mL B) Quantidade de partículas virais presente em cada amostra e a área demarcada em rosa mostra as quantidades de vírus que foram detectadas.

Para se obter a sensibilidade da reação para FLAV foi mensurado neste teste a capacidade desta reação em detectar YFV. Esta reação apresentou uma sensibilidade igual a observada nos testes envolvendo ENTV, sendo capaz de detectar até 10^2 pfu/mL (FIGURA 33).

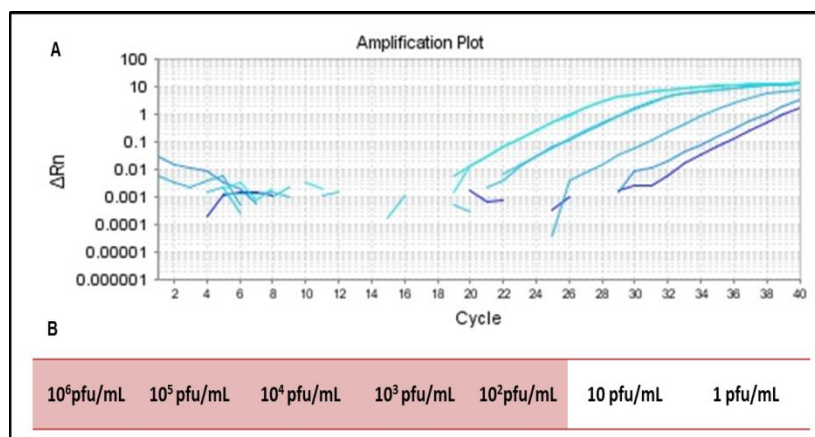


Figura 33: Teste de sensibilidade analítica FLAV na plataforma qPCR. A) Curvas de amplificação na escala logarítmica LCR mimético contendo de 1 a 10^6 pfu/mL B) Quantidade de partículas virais presente em cada amostra e a área demarcada em rosa mostra as quantidades de vírus que foram detectadas.

6.5. TESTE DE ESPECIFICIDADE ANALÍTICA

Os testes de especificidade foram feitos para avaliar a capacidade dos iniciadores de amplificar apenas o fragmento de DNA do alvo, mesmo na presença de outras amostras de ácidos nucleicos. Os iniciadores alvos da plataforma (HHV-1/2; HHV-3, HHV-5; FLAV; ENTV) foram utilizados em reações onde a amostra foi material genético de todos os vírus da plataforma (HHVs= DNA; YFV e poliovírus=cDNA) e genoma humano. Na figura 34 pode ser observado que não houve amplificações inespecíficas. Somente foi observada a amplificação do alvo correspondente aos iniciadores. Algumas amplificações tardias, como ct maior que 36, aconteceram mas estas ocorreram provavelmente devido à formação de dímeros de iniciadores, fato corroborado pela observação de T_m distintas das observadas nas reações onde o alvo específico foi adicionado.

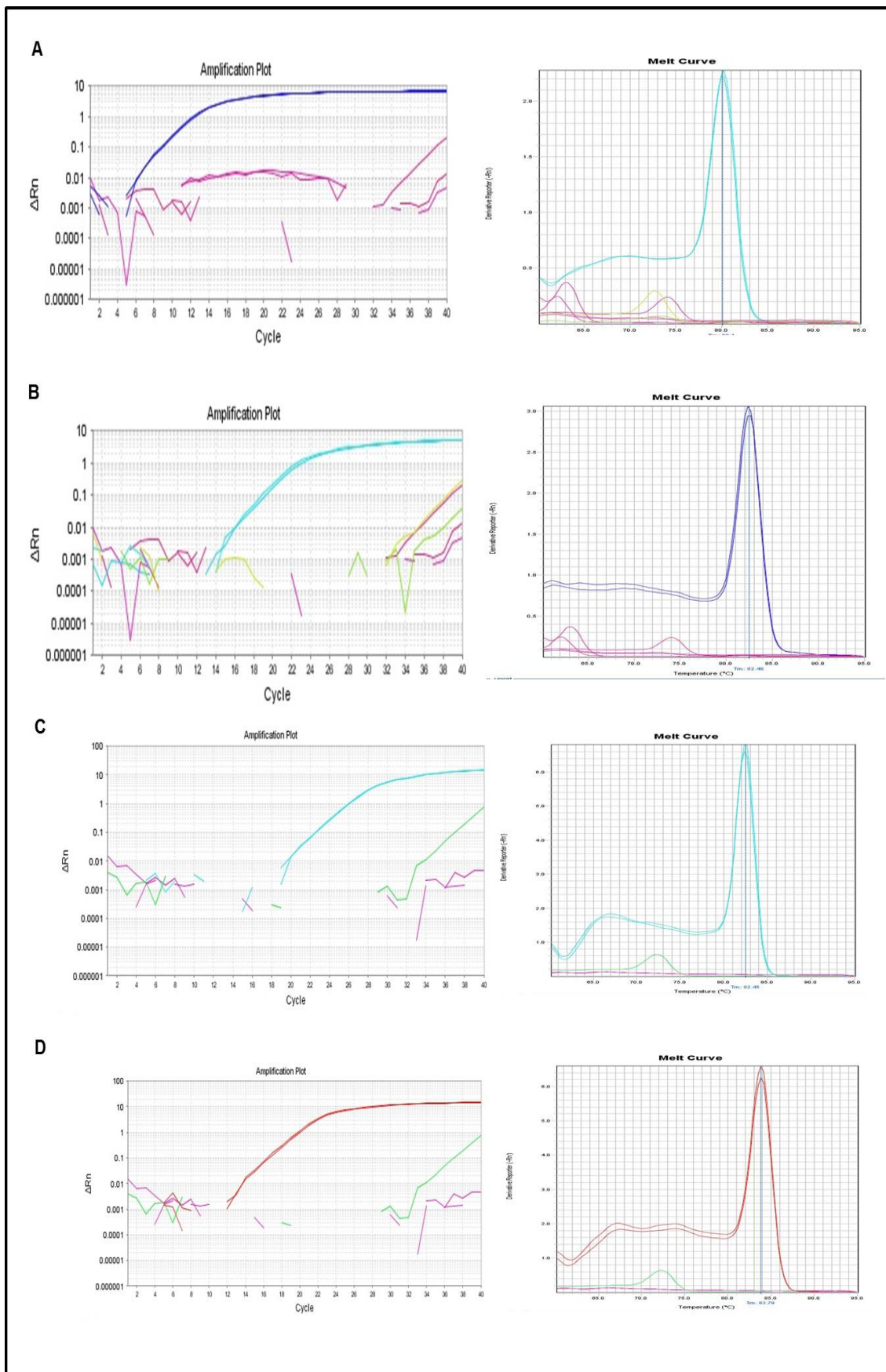


Figura 34: Testes de especificidade analítica na plataforma qPCR. A) Curvas de amplificação em escala logarítmica e curvas de dissociação para a reação de HHV-1/2.

Amplificação do controle positivo C(+) e ausência de amplificação do controle negativo e das amostras de HHV-3; YFV; poliovírus; genoma Humano. B) Amplificação de HHV-3 e ausência de amplificação do controle negativo e das amostras de HHV-1; YFV; poliovírus; genoma Humano. C) Amplificação de ENTV e ausência de amplificação do controle negativo e das amostras de HHV-1; YFV; HHV-3; genoma Humano. D) Amplificação de FLAV e ausência de amplificação do controle negativo e das amostras de HHV-1; poliovírus; HHV-3; genoma Humano

6.6 REPETIBILIDADE

Para analisar se as reações desenvolvidas para a plataforma eram capazes de se repetir, foi realizado o teste de repetibilidade.

Após se analisar a 21 reações, feitas nas mesmas condições, para detecção de HHV-1/2 em um padrão contendo 10^3 pfu/mL de HHV-1, foi observado que este padrão apresentou uma pequena variação no Ct de detecção nas diferentes réplicas, a média dos 21 Cts foi 29,5, o desvio padrão entre os valores dos Cts foi de 1,8 e o coeficiente de variação entre as réplicas foi de 6,1% (FIGURA 35).

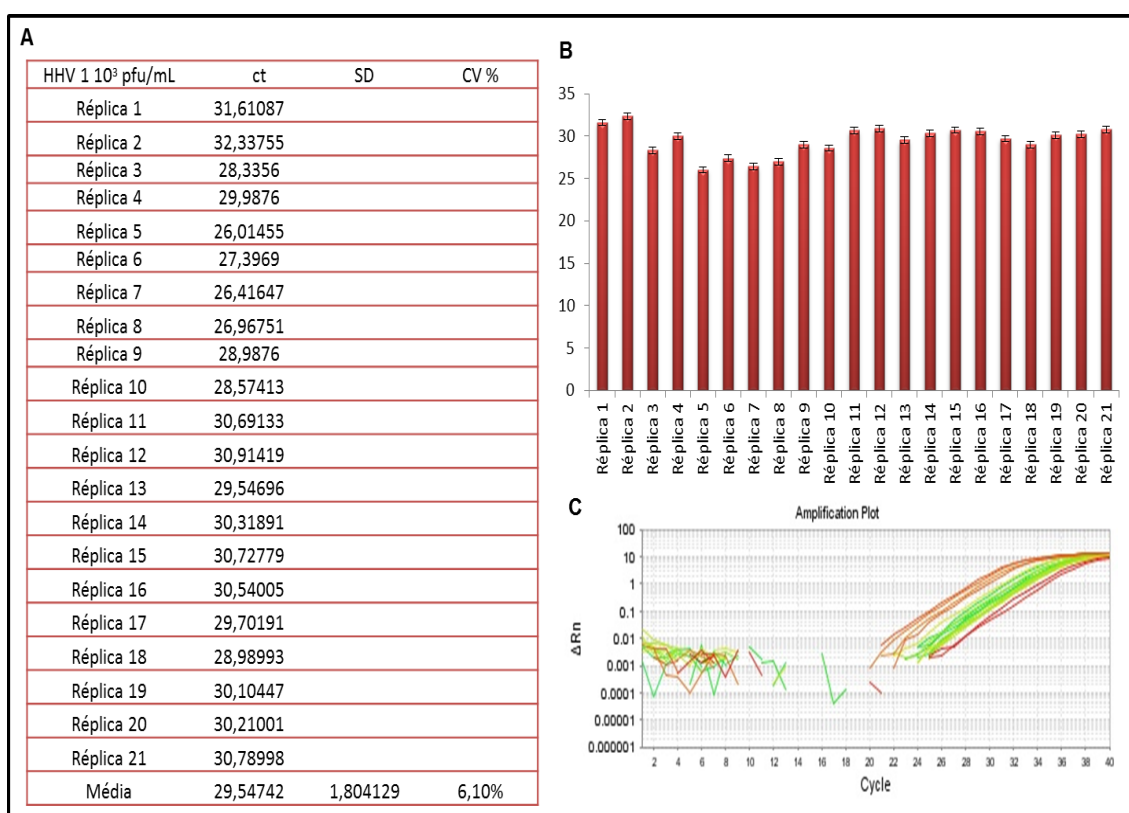


Figura 35: Análise de repetibilidade com iniciadores para HHV-1/2 da plataforma qPCR.

A) Tabela representando os valores dos Cts, a média, desvio padrão e o coeficiente de variação das 21 réplicas feitas no ensaio com o padrão 10^3 pfu/mL partículas de HHV-1. B)

Gráfico representando valor do Ct de cada réplica e o desvio padrão da cada amostra. C) Curva de amplificação das 21 réplicas do ensaio.

Nos testes com iniciadores para detecção de vírus do gênero *Enterovirus* o Ct médio de detecção de um padrão contendo 10^2 pfu/mL de poliovírus foi 33,9, o desvio padrão entre estes Cts foi 1,0 e o coeficiente de variação foi 3.0%, como representado na FIGURA 36.

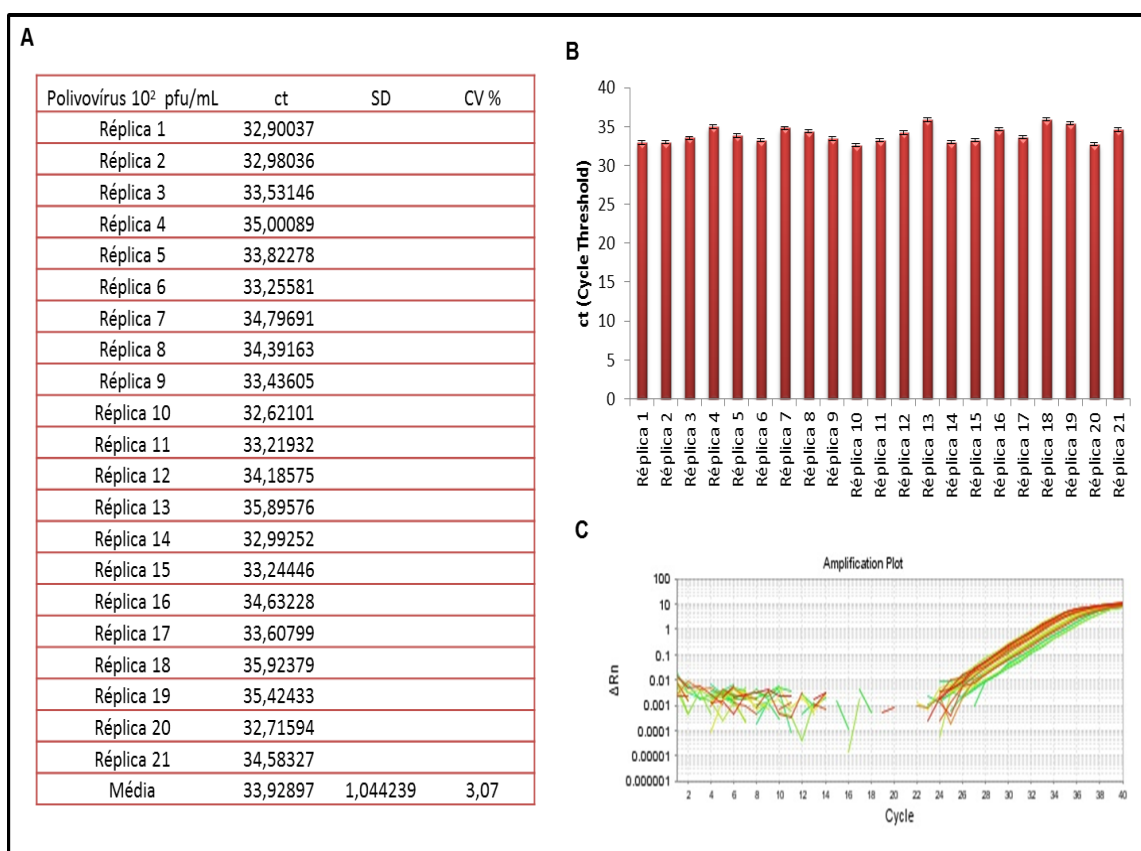


Figura 36: Análise de repetibilidade com iniciadores para ENTV da plataforma qPCR. A) Tabela representando os valor do Ct, a média, desvio padrão e o coeficiente de variação das 21 réplicas feitas no ensaio com o padrão 10^2 pfu/mL partículas de Poliovírus B) Gráfico representando valor do Ct de cada réplica e o desvio padrão da cada amostra. C) Curva de amplificação das 21 réplicas do ensaio.

Da mesma forma que as duas reações testadas anteriormente, as reações com iniciadores para detecção de vírus do gênero *Flavivirus* apresentaram média dos Cts para detecção de um padrão com 10^2 pfu/mL de YVF foi de 32,6, o

desvio padrão entre os Cts foi de 1,7 e o coeficiente de variação foi de 5,4 (FIGURA 37).

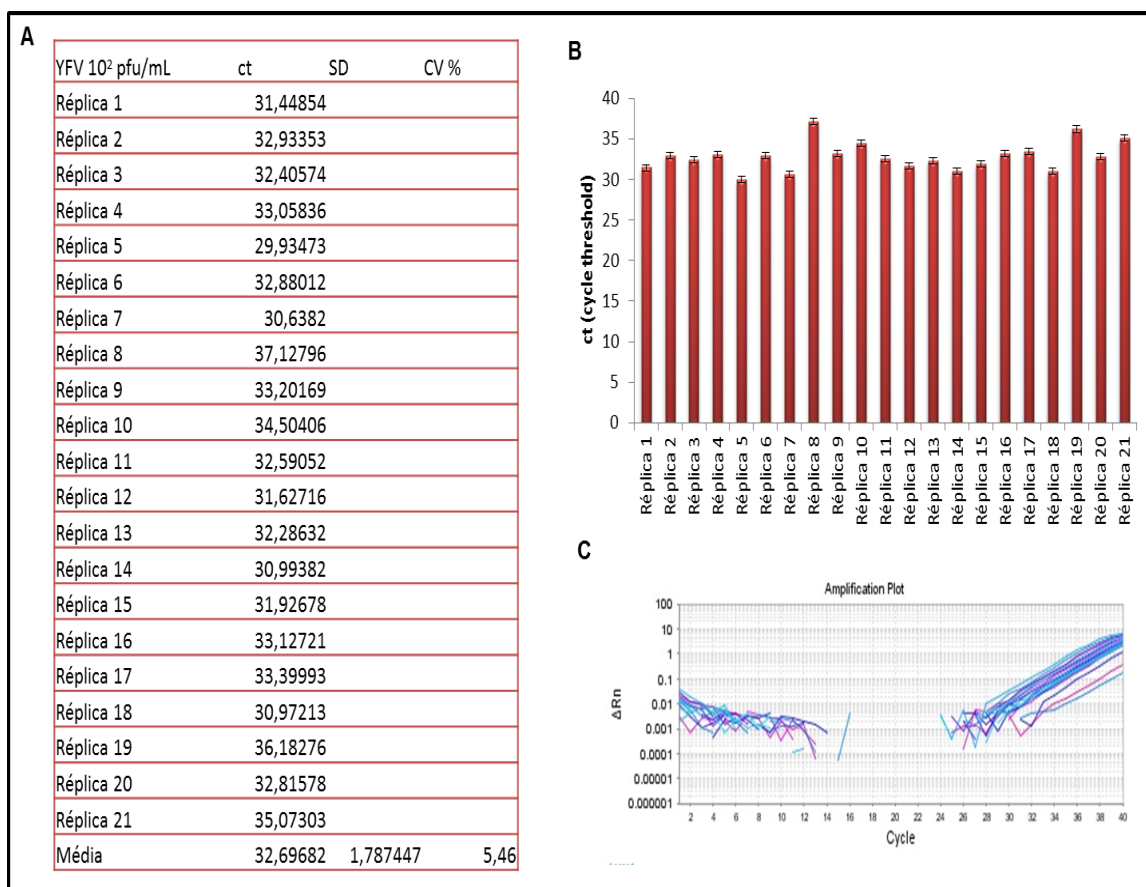


Figura 37: Análise de repetibilidade com iniciadores para FLAV da plataforma qPCR. A) Tabela representando os valor do Ct, a média, desvio padrão e o coeficiente de variação das 21 réplicas feitas no ensaio com o padrão 10²pfu/mL partículas de Poliovírus B) Gráfico representando valor do Ct de cada réplica e o desvio padrão da cada amostra. C) Curva de amplificação das 21 réplicas do ensaio.

6.7 REPRODUTIBILIDADE

Com intuito de verificar se as reações desenvolvidas eram capazes de reproduzir em diferentes condições, foi realizado um teste de reprodutibilidade. Neste teste padrões com carga viral conhecida foram submetidos ao mesmo teste, porém feitos por analistas diferentes e equipamentos diferentes.

As reações para detecção de HHV-1 foram testadas com o padrão contendo 10³ pfu/mL de HHV-1; apresentaram a média do Cts nos testes em diferentes

condições de 28,9, o desvio padrão entre Cts foi de 1,3 e coeficiente de variação 4,6% (FIGURA 38).

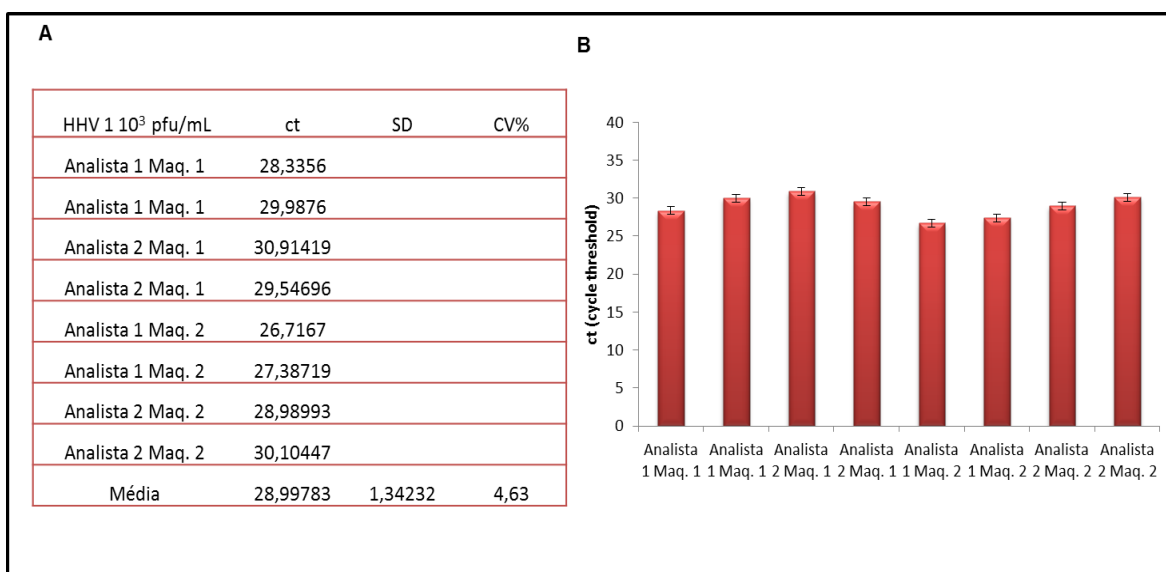


Figura 38: Análise de reprodutibilidade com iniciadores para HHV-1/2 da plataforma qPCR. A) Tabela representando os valor do Ct, a média, desvio padrão e o coeficiente de variação das 8 réplicas feitas no ensaio com o padrão 10³ pfu/mL partículas de HHV-1.B) Gráfico representando valor do Ct de cada teste e o desvio padrão da cada amostra.

As reações para detecção de vírus do gênero *Enterovirus*, quando utilizadas para detectar 10² pfu/mL de poliovírus em diferentes condições apresentaram um Ct médio 33,3, os desvio padrão destes valores foi de 0,6 e o coeficiente de variação 1,8% (FIGURA 39)

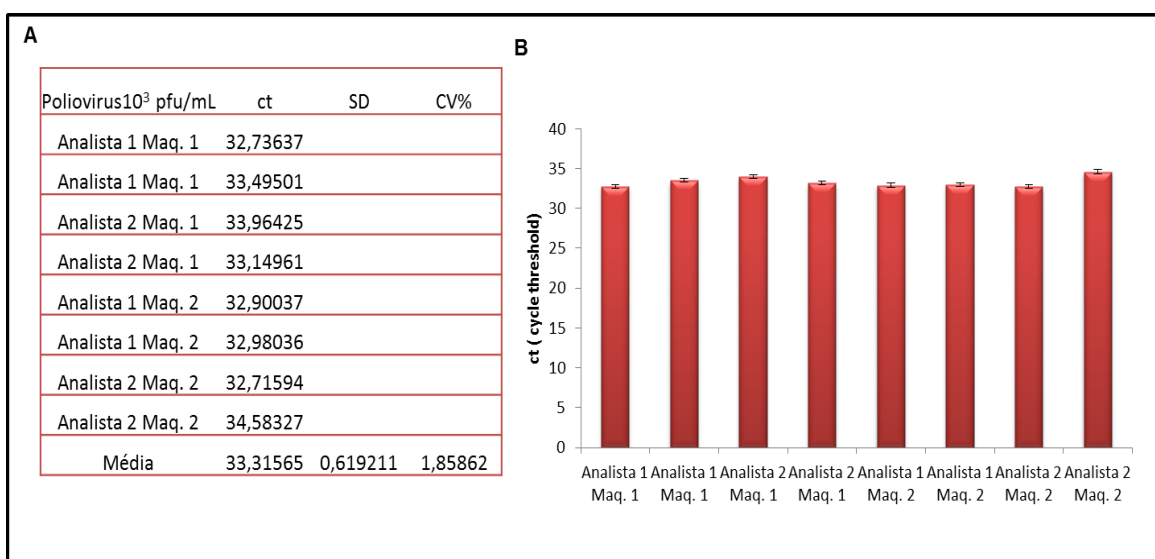


Figura 39: Análise de reprodutibilidade com iniciadores para ENTV da plataforma qPCR. A) Tabela representando os valor do Ct, a média, desvio padrão e o coeficiente de variação

das 8 réplicas feitas no ensaio com o padrão 10^2 pfu/mL partículas de Poliovírus B) Gráfico representando valor do Ct de cada teste e o desvio padrão da cada amostra.

As reações para detecção de vírus do gênero *Flavivirus* apresentaram no teste de reprodutibilidade um Ct médio de 33,3, o desvio padrão entre estes Cts foi de 0.8 e coeficiente de variação 2,4% (FIGURA 40).

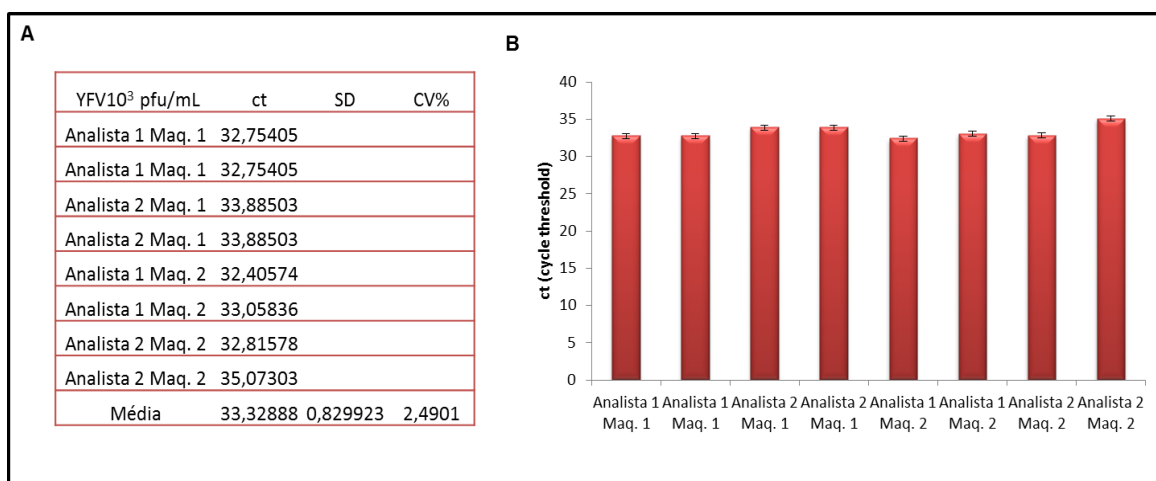


Figura 40: Análise de reprodutibilidade com iniciadores para FLAV da plataforma qPCR.

A) Tabela representando os valor do Ct, a média, desvio padrão e o coeficiente de variação das 8 réplicas feitas no ensaio com o padrão 10^2 pfu/mL partículas de YFV. B) Gráfico representando valor do Ct de cada teste e o desvio padrão da cada amostra.

6.8. CONTROLES INTERNOS

Foram desenvolvidas também reações para controles internos endógenos e exógenos a serem utilizados na plataforma. A detecção destes controles nas reações tem o objetivo de validar etapas pré-analíticas, como por exemplo extração de RNA e síntese de cDNA.

6.8.1 ENDÓGENO

Como controle interno endógeno foi selecionado o gene da beta actina humana. Sendo que os iniciadores foram eficientes (93%) e específicos, sendo capazes de amplificar um único fragmento (FIGURA 41 E FIGURA 19). O teste

de eficiência foi feito por diluição seriada, base 10, de um plasmídeo com um fragmento do gene da beta actina humana.

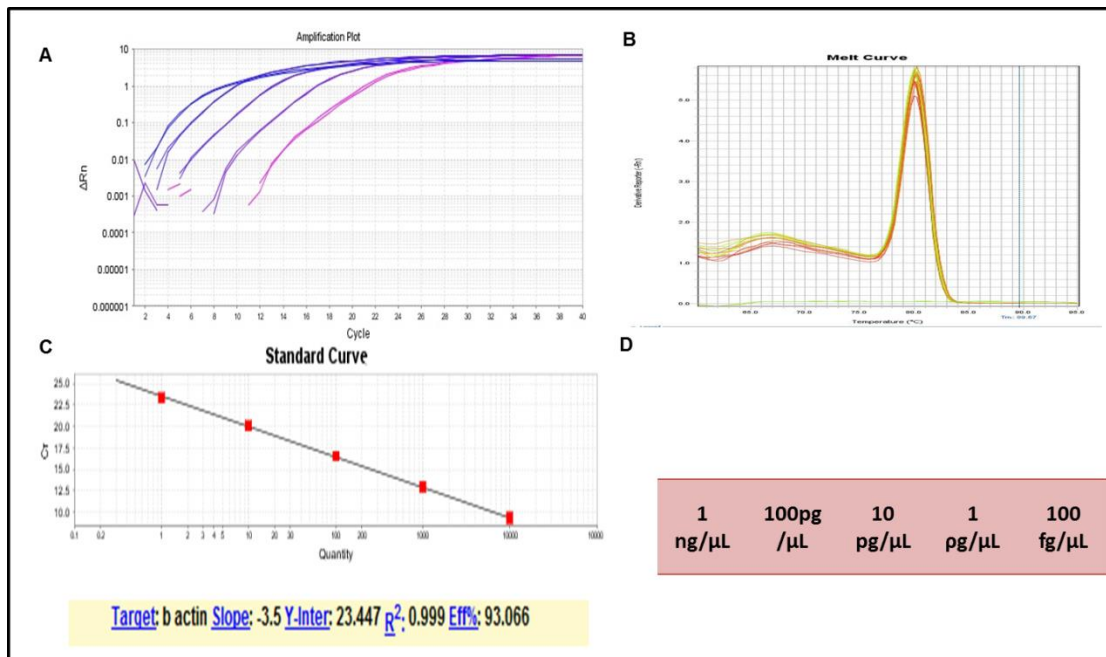


Figura 41: Reação controle interno endógeno da plataforma de qPCR empregando o plasmídeo contendo o gene da beta actina . A) Curvas de amplificação na escala logarítmica empregando o plasmídeo diluído na base 10, de 1,0ng a 100 fg. B) Curva de dissociação das diluições do plasmídeo, T_m 80,3°C. C) Curva padrão empregando diluições seriadas do plasmídeo controle na base 10, variando de 1,0ng a 100 fg. A eficiência foi de de 93%. D) Diluições utilizadas nas reações para construção da curva padrão.

6.8.2.CONTROLE EXÓGENO

Um plasmídeo comercial clonado com o gene “green fluorescent protein” (GFP) foi escolhido como controle interno exógeno a ser utilizado na plataforma de qPCR. Os iniciadores desenhados para detecção deste gene apresentaram uma eficiência de 107% e amplificaram apenas um fragmento de DNA específico, o qual apresentou uma T_m de 82,7°C. O ensaio foi capaz de detectar quantidades do plasmídeo alvo iguais ou superiores a 10pg (FIGURA 42).

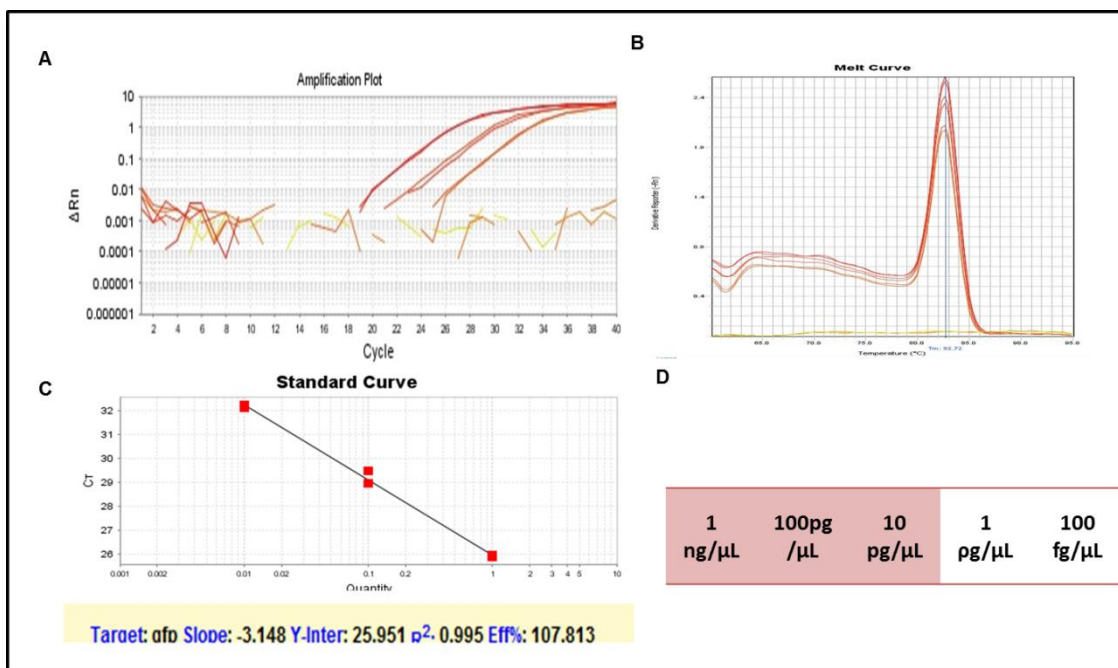


Figura 42: Reação controle interno exógeno da plataforma de qPCR empregando o plasmídeo contendo o gene “green fluorescent protein” (GFP). A) Curvas de amplificação na escala logarítmica empregando o plasmídeo diluído na base 10, de 1,0ng a 100 fg. B) Curva de dissociação das diluições do plasmídeo, T_m 82,7°C. C) Curva padrão empregando diluições seriadas do plasmídeo controle na base 10, variando de 1,0ng a 100 fg. A eficiência foi de 107%. D) Diluições utilizadas nas reações para construção da curva padrão.

6.9. DESENVOLVIMENTO DE TESTES TAQMAN®

Nesta etapa o objetivo foi de fazer uma comparação entres os testes já desenvolvidos na plataforma (SYBR®) e testes com outro sistema de detecção também amplamente utilizado em qPCR: o sistema TaqMan®. Para isso foram desenvolvidos dois testes (HHV-1/2 e *Enterovirus*) empregando o sistema TaqMan®, o qual utiliza sondas para emissão de fluorescência. Este sistema aumenta a especificidade pois para se observar a emissão de fluorescência a partir da amplificação de fragmentos de ácido nucleico é obrigatória a ligação da sonda. As sondas foram baseadas em sequencias da literatura ou desenhadas utilizando o software Primer Express® v3.0, como descrito no item 5.2.1., (TABELA 4).

Tabela 4: Descrição das sondas utilizadas nos testes com sistema TaqMan® e a fluorescência utilizada

Sonda	Sequência	Fluorescência	Referência
HHV 1/2 P	FAM-5'-CAACCGCACCTCCAGGGCCC-3'	FAM	Dierssen et al, 2008
ENTV P	FAM-5'-CCGGCCCCTGAATCGGCTAAT-3'	FAM	Oliveira, D, B (Danos não publicados)

Os padrões de LCR mimético contaminados com vírus que foram utilizados nos testes de sensibilidade no sistema SYBR®, foram também utilizados para testar a sensibilidade do sistema TaqMan® para HHV-1/2 e enterovírus. Assim como o teste com o sistema SYBR® o teste TaqMan® para HHV-1/2 foi capaz de detectar 10^3 pfu/mL (FIGURA 43)

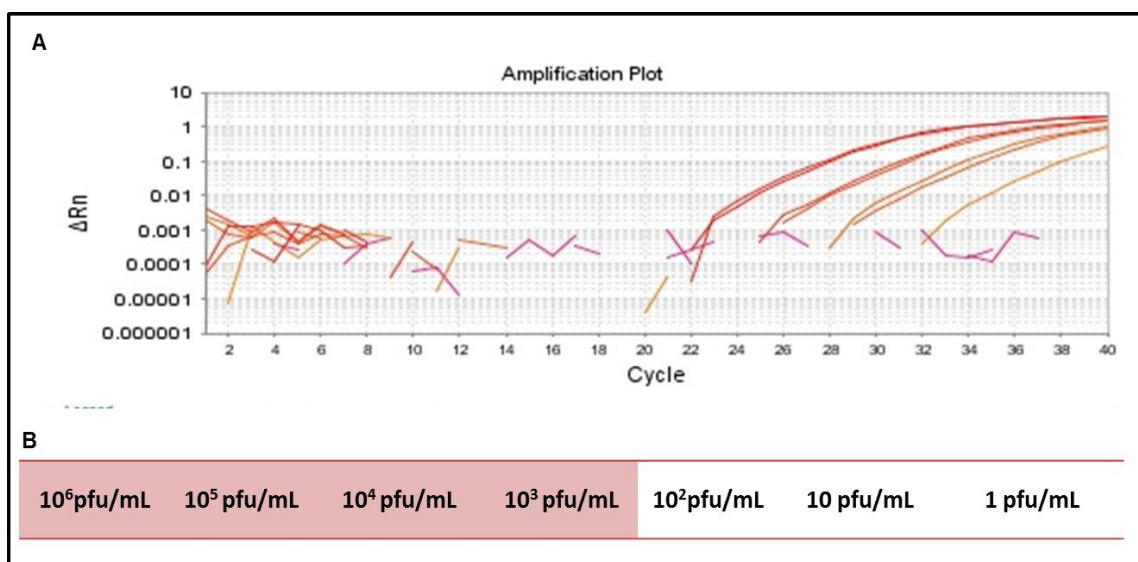


Figura 43: Teste de sensibilidade analítica TaqMan® HHV-1/2 na plataforma qPCR . A) Curvas de amplificação na escala logarítmica LCR mimético contendo de 1 a 10^6 pfu/mL B) Quantidade de partículas virais presente em cada amostra e a área demarcada em rosa mostra as quantidades de vírus que foram detectadas.

O teste TaqMan® para detecção de vírus do gênero *Enterovirus* também foi muito sensível, assim como no sistema SYBR®. O teste foi capaz de detectar 100 pfu/mL (FIGURA 44)

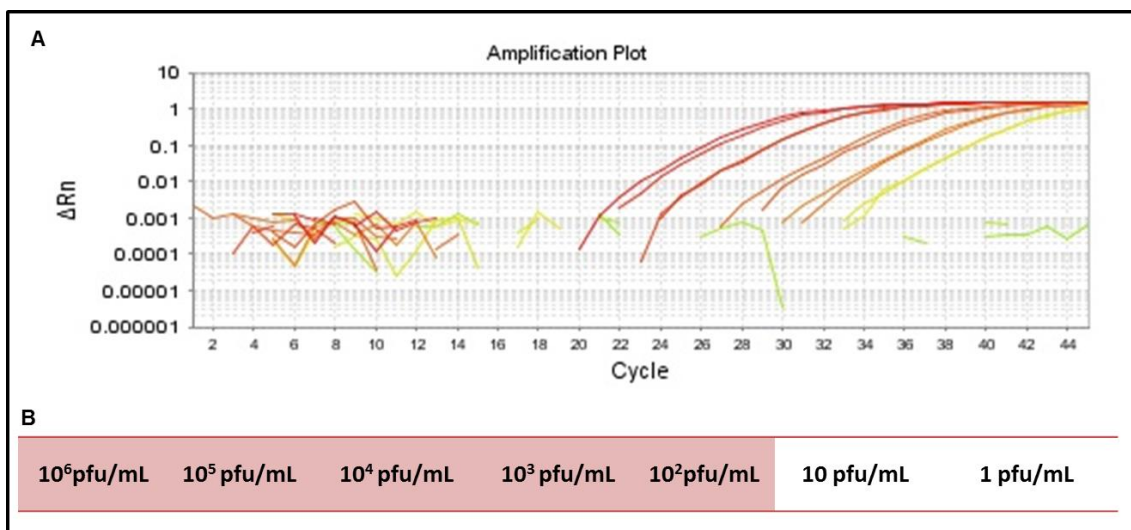


Figura 44: Teste de sensibilidade analítica TaqMan® ENTV na plataforma qPCR. A) Curvas de amplificação na escala logarítmica LCR mimético contendo de 1 a 10^6 pfu/mL B) Quantidade de partículas virais presente em cada amostra e a área demarcada em rosa mostra as quantidades de vírus que foram detectadas.

6.9.1 COMPARAÇÃO DOS TESTES SYBR® E TAQMAN®

Os testes de sensibilidade analítica do sistema TaqMan® e SYBR® foram capazes de detectar as mesmas quantidades de vírus, porém foi feito também uma análise para comparar em que Ct cada um dos testes foi capaz de detectar os padrões com diferentes quantidades de HHV-1. Os padrões com diferentes quantidades de vírus foram detectados em média 2,4 Ct de antecedência com SYBR® do que com Taqman®, isso é equivalente a uma diferença média no sinal de detecção de aproximadamente 5 vezes (FIGURA 45).

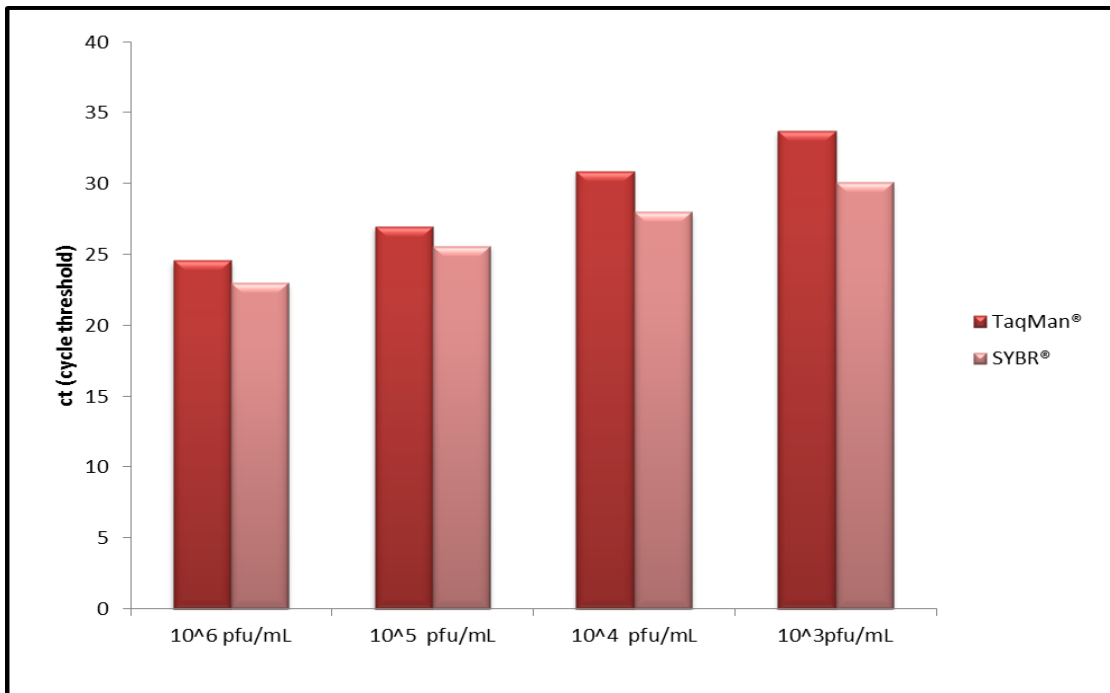


Figura 45: ComparaçãoTaqMan® vs SYBR® HHV-1/2. Ct no qual cada ponto dos padrões com quantidades conhecidas de HHV-1 (10^6 pfu/mL – 10^3 pfu/mL) foram detectados no sistema TaqMan® e no sistema SYBR®.

O mesmo foi observado para o teste de detecção dos vírus do gênero *Enterovirus*, onde a diferença do sinal foi mais acentuada sendo em média 500 vezes maior no sistema SYBR® (FIGURA 46).

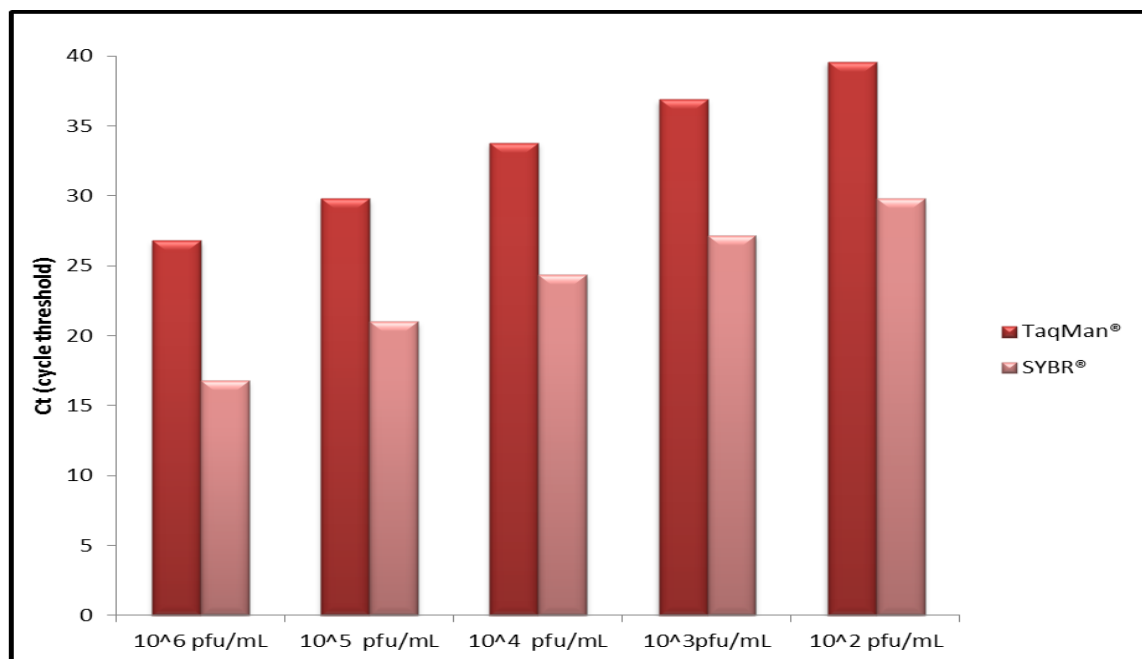


Figura 46: Comparação TaqMan® vs SYBR® ENTV. Ct no qual cada ponto dos padrões com quantidades conhecidas de Poliovírus (10^6 pfu/mL – 10^2 pfu/mL) foram detectados no sistema TaqMan® e no sistema SYBR®.

6.10. DESENVOLVIMENTO DE TESTES PARA IDENTIFICAÇÃO DE FLAVIVÍRUS

6.10.1 TESTES PARA DETECÇÃO DE FLAVIVÍRUS POR qPCR – TAQMAN® “ONE STEP”

Com o objetivo de desenvolver testes específicos capazes de identificar os principais vírus do gênero *Flavivirus* de importância médica, foram feitos ensaios TaqMan® “one step” para detecção de DENV-1, DENV-2, DENV-3, DENV-4, WNV, SLEV, JEV e YFV. Estes ensaios foram desenvolvidos no período de estágio sanduíche no Food and Drug Administration no EUA (FDA) sob a supervisão da Dra. Maria Rios.

Todos os conjuntos de iniciadores e sondas desenhados tiveram sua eficiência mensurada através da construção de curvas padrões utilizando padrões virais diluídos de forma seriada e apresentaram eficiência entre 90% e 100%, valores adequados para ensaios baseados em qPCR (TABELA 5).

Tabela 5: Eficiência dos ensaios para detecção de WNV, SLEV, YFV e JEV por qPCR

Alvo	Eficiência
WNV	98,4%
SLEV	94,6%
YFV	96,6%
JEV	97,5%

Para mensurar a sensibilidade analítica dos ensaios, padrões virais foram adicionados em LCR mimético e diluídos de forma seriada, variando de 10^6 à 10^2 cópias/mL. As amostras foram testados separadamente (FIGURA 47) (TABELA 6) e em “multiplex” (FIGURA 48) (TABELA 7).

Quando testados separadamente os ensaios apresentaram diferentes sensibilidades analíticas. Os ensaios para DENV 1-4 foram capazes de detectar até 10^2 cópias/mL; os ensaios para WNV e SLEV detectaram até 10^3 cópias/mL; o ensaio para detecção de JEV até 10^4 cópias/mL e; o para YFV foi capaz de detectar até 10^5 cópias/mL. Os valores dos Cts de amplificação de cada padrão estão descritos nas tabela 5 (DENVs 1-4) e tabela 6 (JEV, SLEV, WNV e YFV). As curvas de amplificação do ensaio em “singleplex” estão na figura 47 : JEV; SLEV; WNV; YFV; DENVs 1-4

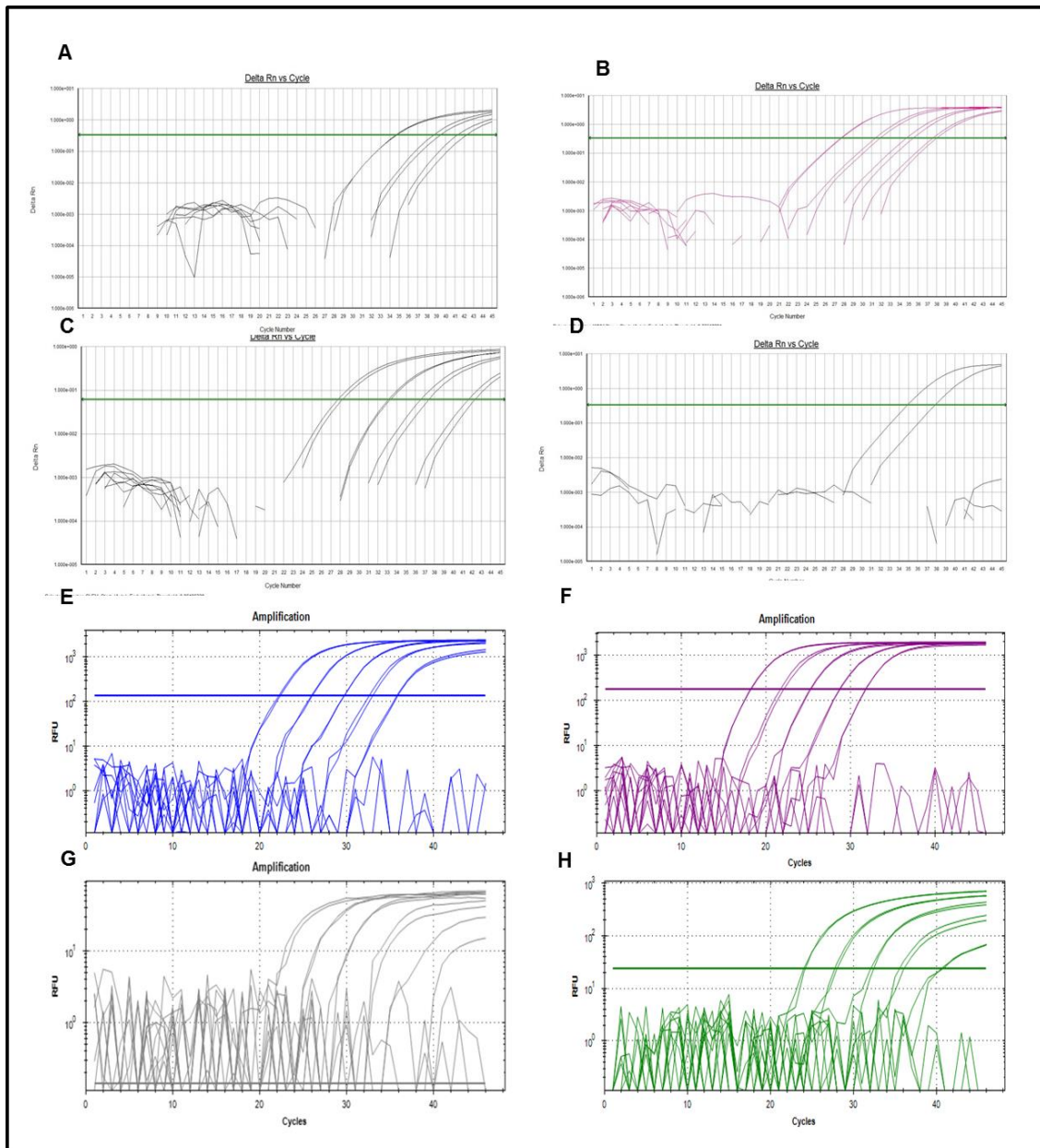


Figura 47: Teste de sensibilidade analítica para os ensaios “singleplex” para detecção de JEV, SLEV, WNV, YFV e DENVs 1-4 por qPCR. Curvas de amplificação na escala logarítmica de padrões que mimetizam LCR A) JEV. B) SLEV. C) WNV. D) YFV. E) DENV-1. F) DENV-2. G) DENV-3. H) DENV-4

Tabela 6: Teste de sensibilidade analítica para os ensaios de detecção de DENVs por qPCR*.

Amostra – Padrão	Carga viral (LCR)	Ct de amplificação “Singleplex”	Ct de amplificação “Multiplex” (DENVs 1-4)
DENV 1	10 ⁶ cópias/mL	22,17	22,25
	10 ⁵ cópias/mL	25,76	26,01
	10 ⁴ cópias/mL	29,34	29,70
	10 ³ cópias/mL	32,29	32,79
	10 ² cópias/mL	35,21	35,82
DENV 2	10 ⁶ cópias/mL	21,03	20,73
	10 ⁵ cópias/mL	24,88	24,47
	10 ⁴ cópias/mL	28,10	27,91
	10 ³ cópias/mL	32,45	32,34
	10 ² cópias/mL	37,33	36,28
DENV 3	10 ⁶ cópias/mL	16,49	18,2
	10 ⁵ cópias/mL	20,49	21,91
	10 ⁴ cópias/mL	23,87	25,25
	10 ³ cópias/mL	27,31	28,71
	10 ² cópias/mL	30,64	31,79
DENV 4	10 ⁶ cópias/mL	23,28	24,08
	10 ⁵ cópias/mL	27,48	27,86
	10 ⁴ cópias/mL	31,20	32,21
	10 ³ cópias/mL	35,13	35,79
	10 ² cópias/mL	39,31	40,73

*Padrões que mimetizam o LCR com cargas virais de 10⁶ a 10² cópias/mL foram usados como amostra em ensaios “singleplex” e “multiplex” para detecção de DENVs

As reações também foram testadas em “multiplex” (mais de um alvo em uma reação), foi montado um ensaio para detecção dos DENV 1-4 em uma mesma reação e estes apresentaram sensibilidade similar ao apresentado quando os testes foram feitos separadamente (TABELA 6). Para os outros alvos foram feitas duas combinações, sendo uma com JEV/YFV/SLEV onde apenas os a detecção de SLEV apresentou sensibilidade similar ao teste “one step” (TABELA 7) (FIGURA 48). A reação, em multiplex, para os alvos SLEV/JEV/WNV apresentou desempenho inferior para todos os alvos quando comparado com o teste das reações individuais. A detecção de SLEV foi 32 vezes menos sensível, a de JEV 4 vezes menos e a reação para detecção de

YFV não detectou o padrão com 10^5 cópias/mL, valores comparativos com as reações em “singleplex”.

Tabela 7: Teste de sensibilidade analítica para os ensaios de detecção de JEV, SLEV, WNV e YFV por qPCR *.

Amostra – Padrão	Carga viral (LCR)	Ct de amplificação “Singleplex”	Ct de amplificação “Multiplex” (SLEV, JEV and YFV)	Ct de amplificação “multiplex” (SLEV, JEV and WNV)
JEV FDA	10^6 cópias/mL	34,37075	35,5335	X
	10^5 cópias/mL	38,75925	42,3112	40,7
	10^4 cópias/mL	41,4823	ND	X
	10^3 cópias/mL	ND	ND	X
	10^2 cópias/mL	ND	ND	X
SLEV NIH	10^6 cópias/mL	27,9461	28,0919	X
	10^5 cópias/mL	33,2033	33,4545	38,1
	10^4 cópias/mL	36,9249	38,4027	X
	10^3 cópias/mL	41,91845	43,3545	X
	10^2 cópias/mL	ND	ND	X
WNV NY 99	10^6 cópias/mL	27,6267	x	x
	10^5 cópias/mL	31,6133	x	X
	10^4 cópias/mL	35,0282	x	38,22
	10^3 cópias/mL	37,73695	x	X
	10^2 cópias/mL	ND	x	X
YFV FDA	10^6 cópias/mL	34,8588		
	10^5 cópias/mL	37,8147	37,8825	X
	10^4 cópias/mL	ND	40,316	X
	10^3 cópias/mL	ND	ND	X
	10^2 cópias/mL	ND	ND	X

* Padrões que mimetizam o LCR com cargas virais de 10^6 a 10^2 cópias/mL foram usados como amostra em ensaios “singleplex” e “multiplex” para detecção de JEV, SLEV, WNV e YFV.

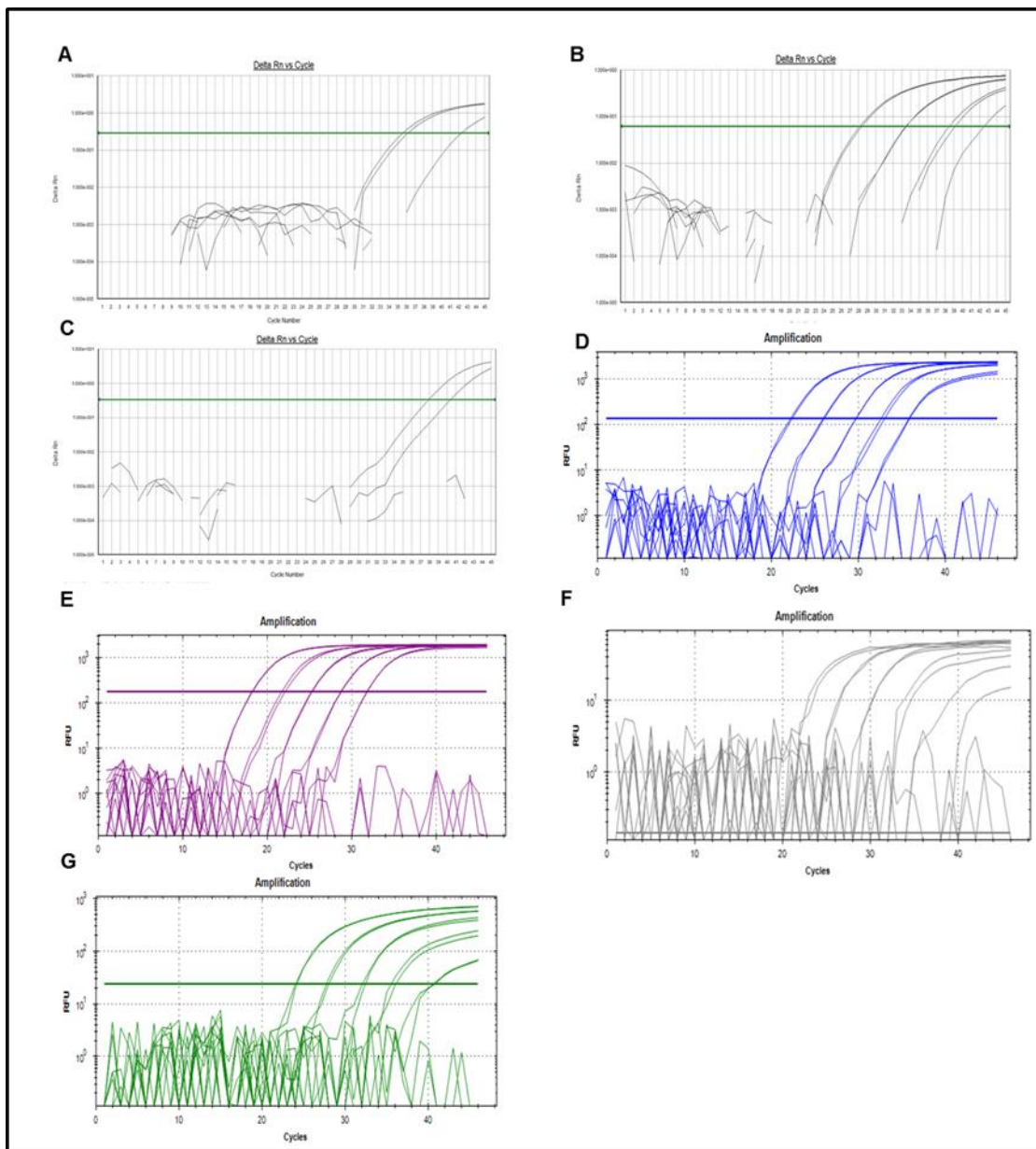


Figura 48: Teste de sensibilidade analítica para os ensaios “multiplex” para detecção de JEV, SLEV, WNV, YFV e DENVs 1-4 por qPCR. Curvas de amplificação na escala logarítmica de padrões que mimetizam LCR A) JEV. B) SLEV. C) YFV. D) DENV-1. E) DENV-2. F) DENV-3. G) DENV-4

6.10.2 PURIFICAÇÃO DE RNA POR MICROESFERAS MAGNÉTICAS MARCADAS

Foram desenvolvidos ensaios de extração de RNA viral utilizando microesferas magnéticas marcadas com sondas específicas para os flavivírus alvo do nosso

projeto (WNV, SLEV, YFV, JEV e DENVs 1-4). Para isso “oligoprobes” foram desenhadas tendo como alvo o RNA de SLEV, WNV e YFV (TABELA 8) ou obtidas no “Laboratory of emerging pathogens” no FDA (WNV e DENVs 1-4) (Desenhadas por Andriyan Grinev, Pós Doutor).

Tabela 8: “Oligoprobes” desenhadas para purificação de RNA viral.

Oligoprobes	Sequência	Referência
YFV-1	5' Biotina 30 (A) CTA GCA ACT CGA TTT GCA GAC CAA TGC ACC TCA ATT AGC 3'	Oliveira, D. B (Dados não publicados)
YFV-2	5' Biotina 30 (A) ATT TGG CAC AAG TGA ATT TGG CGC ATG CCA CAA TGC TCC 3'	
YFV-3	5' Biotina 30 (A) GCT TTA CGA CCA GAC ATG TTC TGG TCA GTT CTC TGC 3'	
JEV -1	5' Biotina 30(A) CGA AGG ACC TCC TGG GTG GCC AGA AAC ATC ACC 3'	
JEV -2	5' Biotina 30(A) CAG AAG ATC TCC CAG TCT ATT CCC AGG TGT CAA TAT GC 3'	
JEV -3	5' Biotina 30(A) AAA CTG TTT AAA CTG CAC TAA TCT CTC GAT TCT TCT CAA CG 3'	
SLEV -1	5' Biotina 30(A) CTC TCT TTC CTA GGT ATG GAA TGT CGT TCC AAG CCG CCA ATG 3'	
SLEV- 2	5' Biotina 30(A) CAT GCT TTC AGG TGG CAT TTC TGG TCT GAC TTT TGC GTC 3'	
SLEV -3	5' Biotina 30(A) ATG CCA TTG GCA TGC GCC TCT TGA ATC ACA CGC GCT TG 3'	

*“Oligoprobes” foram desenhadas para purificação específica de RNA de YFV, WNV e SLEV. Foram desenhadas 3 “oligoprobes” para cada vírus alvo.

Padrões de LCR mimético com quantidades conhecidas de vírus (10^4 cópias/mL) WNV, SLEV, JEV, YFV e DENVs 1-4 foram submetidos a extração de RNA utilizando microesferas magnéticas marcadas. Para analisar a eficiência deste método de extração, o produto obtido foi utilizado como amostra nos testes por qPCR (Singleplex) para detecção dos flavivírus descritos no tópico anterior (TABELA 9).

Tabela 9: Extração de RNA viral com “oligoprobes”.

Amostra/ Padrão	Carga viral (LCR)	Diluição do Produto da extração (RNA + Esferas magnéticas)	Ct de detecção do padrão	Ct de detecção – Extração QIAmp viral®
JEV FDA	104 cópias/mL	0	ND	38,76
		10x	ND	
		100x	ND	
SLEV NIH	104 cópias/mL	0	ND	33,20
		10x	33,45	
		100x	39,59	
WNV NY 99	104 cópias/mL	0	ND	31,6
		10x	32,9	
		100x	36,3	
YFV FDA	104 cópias/mL	0	ND	38,68
		10x	34,86	
		100x	37,81	
DENV1	104 cópias/mL	0	ND	26,1
		10x	28,06	
		100x	32,44	
DENV2	104 cópias/mL	0	ND	24,4
		10x	32,27	
		100x	34,38	
DENV3	104 cópias/mL	0	ND	21,9
		10x	22,63	
		100x	27,32	
DENV4	104 cópias/mL	0	ND	27,8
		10x	32,45	
		100x	36,41	

* RNA de WNV, JEV, SLEV, YFV e DENVs 1-4 foi extraído utilizando oligoprobes e o rendimento da extração foi verificado por qPCR.

As extrações de RNA utilizando as microesferas marcadas desenvolvidas foram capazes de extrair o RNA alvo do padrão, com exceção para JEV. A extração foi verificada através de detecção do RNA pela “one-step” qPCR. O produto da extração (RNA + microesferas magnéticas) quando diluído 10 vezes em água ultrapura torna mais sensível a detecção por qPCR (TABELA 9).

A extração de RNA utilizando as microesferas magnéticas foi comparada com a extração pelo kit QIAamp Viral®. Foi observado que utilizando um volume de 140µl do padrão (carga viral constante de 10⁴ cópias/mL) o kit QIAamp Viral® apresentou um desempenho melhor que os ensaios utilizando as microesferas magnéticas para os vírus analisados (Tabela 8). Porém quando comparadas às extrações de RNA feitas com menores volumes iniciais de amostras (80 µL, 60 µL, 40 µL ou 20 µL), foi observado que a extração feita com as microesferas apresenta uma eficiência superior ao kit. Essa comparação foi feita para os ensaios por microesferas desenvolvidos para os alvos DENV-1, DENV-2 e SLEV (TABELA 10).

Tabela 10: Extração de RNA viral por “oligoprobes” em diferentes volumes de amostra.

Amostra / Padrão	Carga viral	Volume (µL)	Ct de detecção do padrão (Microesferas)	Ct de detecção do padrão (QIAamp Viral®)
SLEV NIH	10 ⁴ cópias/mL	20	ND	ND
		40	34,76	ND
		60	35,07	34,67
		80	34,43	32,19
DENV-1	10 ⁴ cópias/mL	20	31,00	ND
		40	30,08	ND
		60	28,70	31,00
		80	29,29	28,40
DENV-3	10 ⁴ cópias/mL	20	40,24	ND
		40	40,01	ND
		60	39,53	43,50
		80	40,30	39,11

* Diferentes volumes de amostras (20µL, 40µL, 60µL e 80µL) com carga viral constante (10⁴ cópias/mL) foram submetidos a extração utilizando oligoprobes.

6.11. APLICAÇÃO DA PLATAFORMA DE qPCR

Os testes de diagnósticos foram desenvolvidos para um mesmo sistema de detecção e todas as etapas pré-analíticas padronizadas para normatizar a

eficiência dos testes utilizados foram feitas. A plataforma desenvolvida foi aplicada em amostras de LCR de pacientes do Hospital Infantil João Paulo II.

Todas as amostras são provenientes de pacientes que tiveram suspeita de infecção no SNC no HIJPII. Após análises clínicas em conjunto com exames laboratoriais (Ex: dados cito-químicos do LCR) estes pacientes tiveram o diagnóstico estabelecido no hospital. Baseado no diagnóstico presuntivo estabelecido no HIJPII esses pacientes foram divididos em 3 grupos: pacientes com meningoencefalites virais (n=70); pacientes com meningite bacteriana (n=22); pacientes com outras morbidades em que a suspeita de infecção no SNC foi descartada (n=36).

6.11.1. PACIENTES COM SUSPEITA DE INFECÇÃO VIRAL NO SNC

6.11.1.1. INFORMAÇÕES CLÍNICAS DOS PACIENTES

Todos os pacientes cujo LCR foi analisado nesta tese, ao serem admitidos no HIJPII (amostras coletadas entre 2010 e 2013) passaram por análises clínicas e os sinais e sintomas relacionados à infecção no SNC foram coletados em um formulário, além de informações sócio demográficas. Analisando as informações dos 70 pacientes com suspeita de meningite viral, 71,4% eram do sexo masculino e 28,6% do feminino. A média de idade dos pacientes foi de 3,6 anos, variando de 1 mês até 9,8 anos. Os dados referentes às idades dos pacientes analisados estão no gráfico da figura 49, onde podemos observar que 34,3% (24) dos pacientes tinham menos de 2 anos e 22,9% (16) tinham menos de 1 ano de idade.

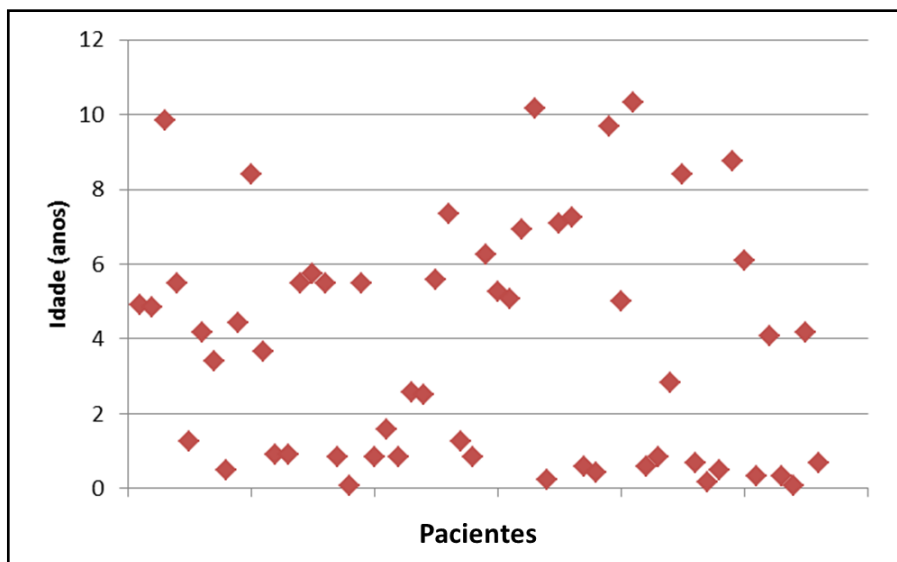


Figura 49: Idade dos pacientes com suspeita de meningite viral. Idade em anos dos pacientes do HIJPII com suspeita de infecção no SNC.

6.11.1.2. DETECÇÃO MOLECULAR DE AGENTES VIRAIS

Os testes moleculares desenvolvidos na plataforma de diagnóstico foram utilizados para diagnóstico molecular das 70 amostras de pacientes com suspeita de meningite viral. Foram detectados agentes virais em 44 amostras, 62,9% do total analisadas (FIGURA 50).

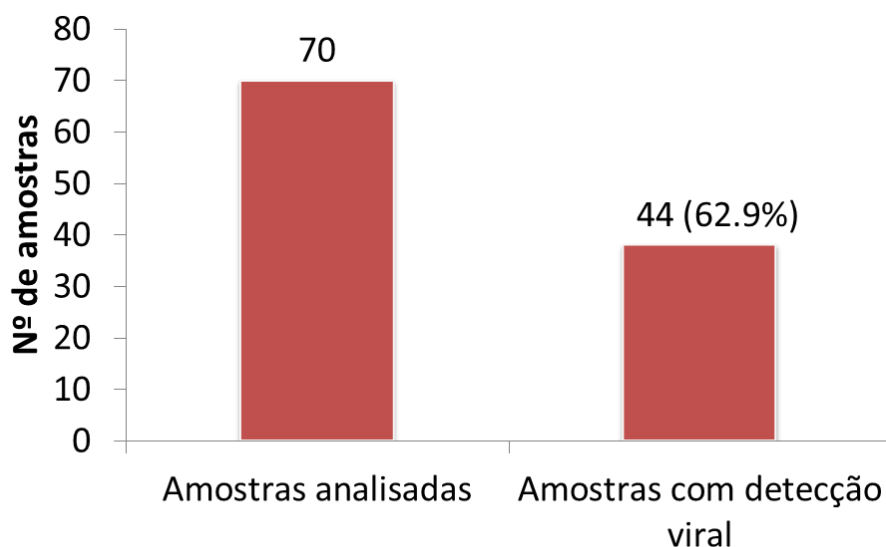


Figura 50: Percentual de detecção por qPCR de LCR de pacientes com suspeita de meningite viral

Das 44 amostras positivas nos testes de qPCR, em 31 foi detectado material genético de ENTV (70,4%), 6 de HHV-3 (13,6%), em 5 foram detectados os DENVs (11,7%), em 1 HHV-1/2 (2,3%) e 1 HHV-5 (2,3%) (FIGURA 51). Nas 5 amostras com detecção de DENVs, o sorotipo foi identificado utilizando a plataforma “one step” com sondas TaqMan, sendo que 4 amostras o sorotipo detectado foi DENV-2 e em uma foi detectado uma coinfeção com os sorotipos DENV-1 e DENV-3.

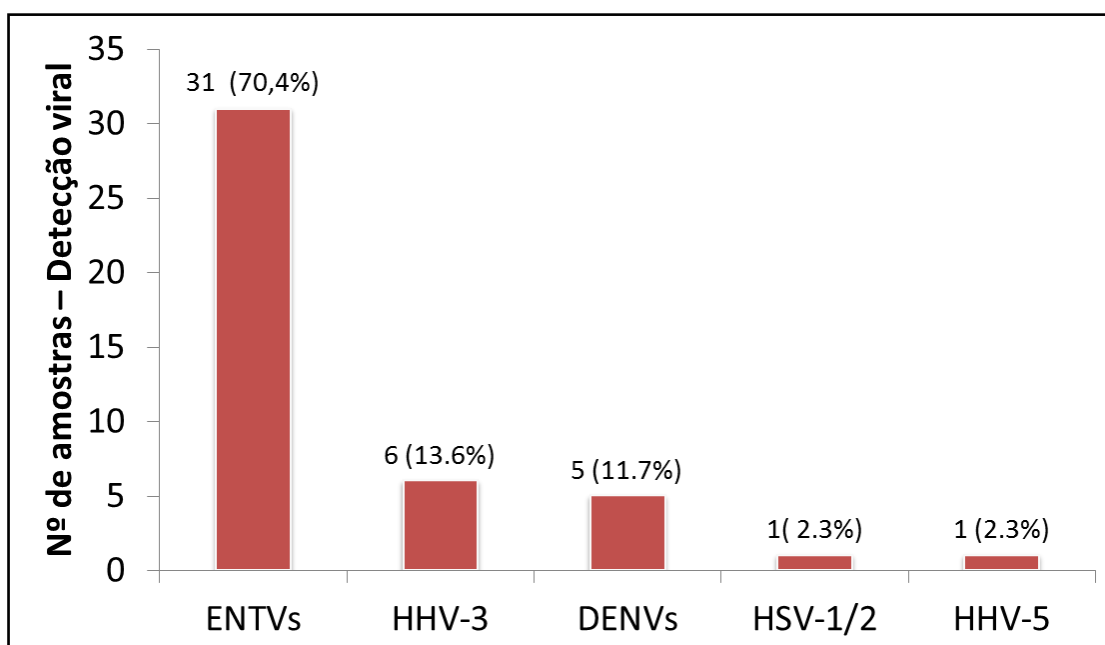


Figura 51: Agentes virais detectados em LCR de pacientes com suspeita de infecção viral no SNC. No eixo y temos o número total de amostras (de pacientes diferentes) analisadas e no eixo x os respectivos alvos.

O diagnóstico molecular dos agentes virais foi confrontado com os sinais clínicos e sintomas por grupo viral detectado (enterovírus, flavivírus e herpes vírus) (TABELA 11). Assim observamos que o aumento de pressão intracraniana é mais frequente no pacientes infectados com HHVs e DENVs (100%). Todos pacientes infectados com DENVs apresentaram náuseas o que não aconteceu em nenhum dos pacientes infectados com HHVs. Convulsão foi mais frequente entre os pacientes com HHVs, 37,5%. Cefaleia é mais frequente nos pacientes com DENVs, 60%. Metade ou mais dos pacientes com

infecções por HHVs, DENVs e ENTV apresentaram rigidez na nuca e febre (TABELA 11).

Tabela 11: Sintomas e sinais dos pacientes na admissão no HIJPII.

Característica	Homens 50 (71.4%)		Mulheres 20 (28.6%)	
Sexo (n=70)	Homens 50 (71.4%)		Mulheres 20 (28.6%)	
Sintomas e sinais na admissão hospitalar	Enterovírus (n=31)		Herpes vírus (n=8) Dengue vírus(n=5)	
Sinais de aumento de pressão intracraniana	23 (74.2%)	8 (100.0%)	5 (100.0%)	
Náusea ou vômito	20 (64.5%)	0 (0.0%)	4 (80.0%)	
Convulsão	3 (9.7%)	3 (37.5%)	0 (0.0%)	
Rigidez na nuca	21 (67.8%)	4 (50.0%)	3 (60.0%)	
Febre	24 (77.4%)	6 (75.0%)	5 (100.0%)	
Cefaleia	11 (35.5%)	2 (25.0%)	3 (60.0%)	

6.11.1.3. ANÁLISE DE FATORES CITO-QUÍMICOS E CARACTERÍSTICAS DA HOSPITALIZAÇÃO POR GRUPO VIRAL IDENTIFICADO

Os pacientes com suspeita de infecção no SNC ao serem admitidos no HIJPII tinham seu LCR coletado e este era enviado ao laboratório do hospital para análise cito-química. Estes dados junto com os sinais e sintomas do paciente foram utilizados para o diagnóstico do tipo de infecção (Ex: viral ou bacteriana). Os dados cito-químicos (leucócitos, proteínas, glicose e proporção de polimorfo nucleares/mononucleares) das 44 de LCR com detecção viral no SNC foram analisados e separados por grupo viral diagnosticado (ENTV, HHVs e DENVs).

Nenhuma das amostras apresentou contagem de leucócitos acima de 500/mL de LCR e não foi estatisticamente diferente o valor médio de leucócitos dentre os grupos virais analisados (FIGURA 52A). O valor de glicose também não apresentou diferença estatística entre os grupos, apenas 7 (15,9%) pacientes apresentaram valor de glicose inferior à 50 mg/dL(FIGURA 52B). Também não houve diferença na média do valor de proteínas entre os grupos virais diagnosticados, 4 pacientes diagnósticos com infecção por ENTV e 1 por HHV apresentaram valor de proteína acima de 50 mg/dL e todos esses pacientes tinham mais de 5 anos de idade (FIGURA 52C). Foi considerado

estatisticamente significativo valor de $p < 0,05$, o teste ANOVA foi utilizado para comparação estatística entre os grupos.

Foi analisado também a proporção de células polimorfo nucleares e mononucleares no LCR destes pacientes. O grupo com diagnóstico positivo para ENTV apresentou um aumento estatisticamente significativo no número de células mononucleares (MN) em relação aos polimorfo nucleares (PMN). O grupo diagnosticado com HHVs apresentou um aumento de polimorfo nucleares em relação aos monoclereares, também com significância estatística ($p < 0,05$). O grupo com diagnóstico de DENVs apresentou um aumento dos mononucleares (FIGURA 52D).

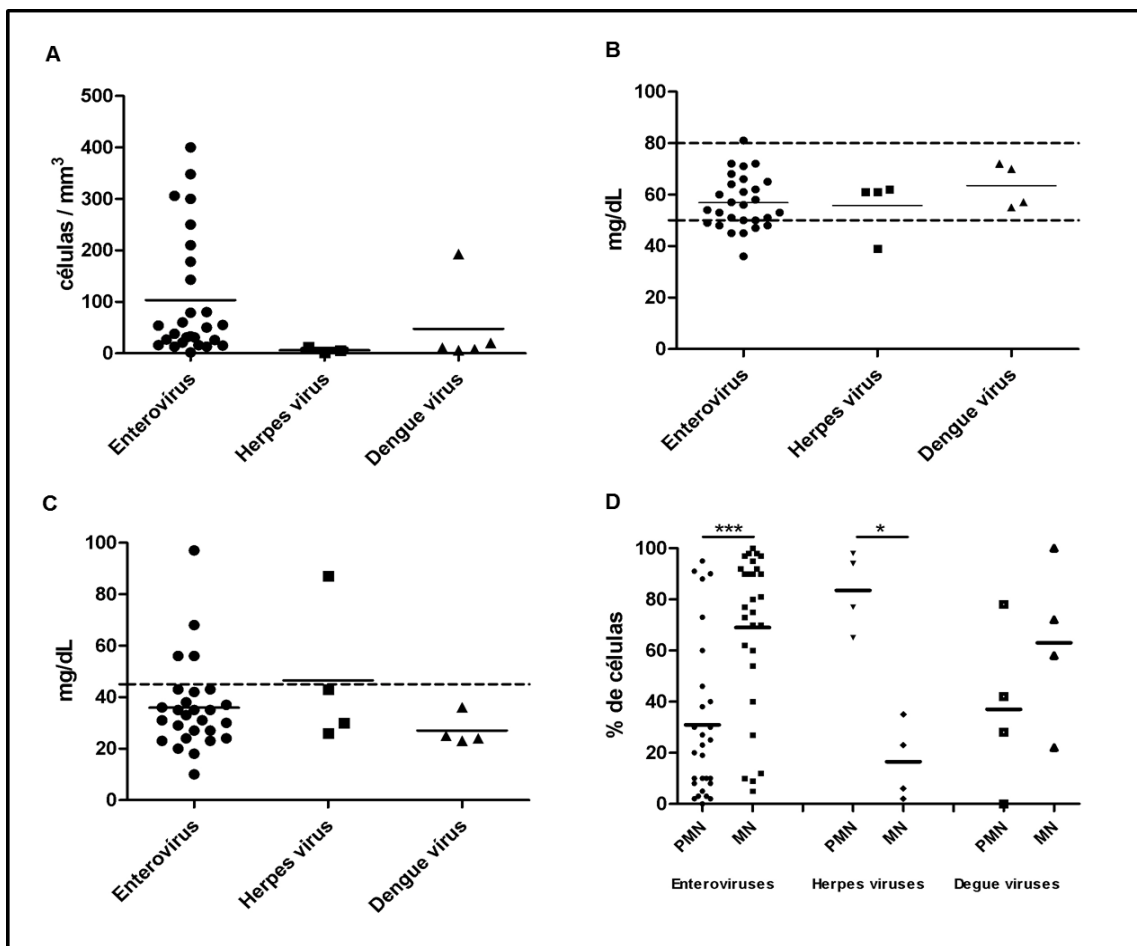


Figura 52: Características cito-químicas das amostras de LCR de pacientes. LCR de 70 pacientes com diagnóstico presuntivo de meningite viral separadas por grupo viral detectado. A) Leucócitos. B) Glicose. C) Proteínas. D) Células polimorfonucleares e mononucleares

Foi analisado o tempo de internação médio dos pacientes com diagnóstico molecular positivo para ENTV, HHVs e DENVs. Os pacientes com infecção por ENTV ficaram internados em média 10 dias, os por HHVs 6 dias e os com infecção por DENVs 5 dias (FIGURA 53).

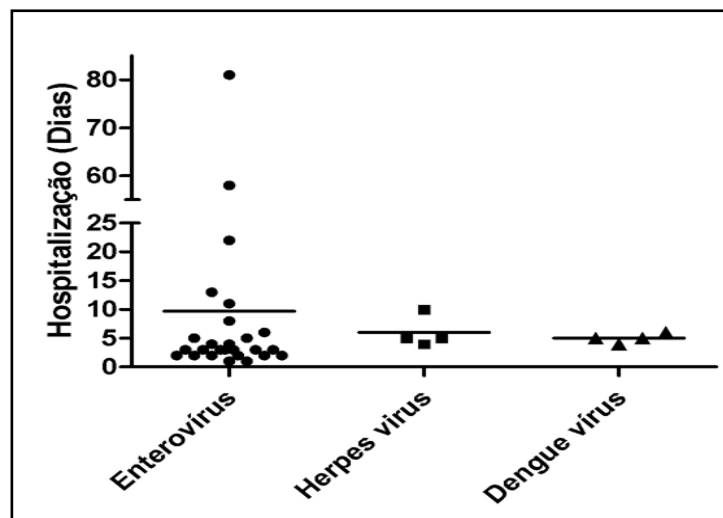


Figura 53: Tempo de internação dos pacientes com infecção no SNC por ENTVs, HHV e DENV.

6.11.1.4. PACIENTES COM MENINGITE BACTERIANA

Amostras de LCR (n=22) de pacientes com diagnóstico clínico-laboratorial (isolamento do microrganismos ou imunoenaios) de meningite bacteriana tiveram amostras coletadas para análise na plataforma de diagnóstico desenvolvida. Foram detectados agentes virais em 22,7% das amostras analisadas, sendo que o mais frequentes foram ENTV e HHV-3 que foram detectados em duas amostras cada (9,1%). HHV-5 foi detectado em amostra onde um agente bacteriano foi identificado também (FIGURA 54).

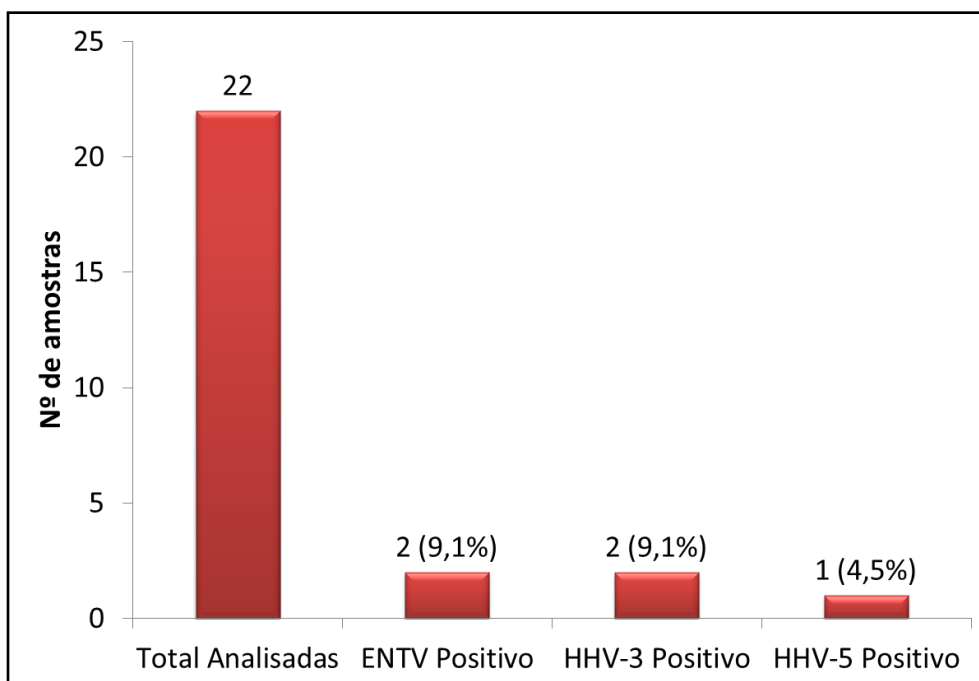


Figura 54: Detecção viral em amostras onde bactérias foram previamente detectadas no LCR. LCR de 22 pacientes com diagnóstico de meningite bacteriana foram testadas na plataforma.

6.11.1.5. PACIENTES COM OUTRAS MORBIDADES

Durante o período de coleta das amostras foram coletadas amostras de LCR de pacientes com suspeita de infecção no SNC que posteriormente foi descartada, baseado em dados clínicos e exames laboratoriais complementares (Ex: análise cito-química do LCR). Esses pacientes receberam diagnóstico de outras doenças e foram tratados para estas. As amostras coletadas de LCR foram analisadas em nossa plataforma. Das 36 amostras de LCR analisadas com pacientes de diversas morbidades em 19 (52%) agentes virais foram detectados no LCR, sendo que em 12 foram detectados ENTVs, em quatro foi detectado HHV-3 e em cinco foi detectado uma coinfeção com ENTV e HHV-3 (TABELA 12)

Tabela 12: Detecção viral em LCR de pacientes com diagnóstico descartado de infecção no SNC.

Morbidade	ENTV Positivo	HHV-3 Positivo	Coinfecção ENTV e HHV-3
Otite	-	-	1
Pneumonia / Insuficiência respiratória	1	-	-
Septicemia	2	2	1
Síndrome de Guillain Barré	-	-	1
Síndrome de ADEM	-	-	1
Síndrome respiratória	1	-	-
Anemia	1	-	-
Bronquiolite, infecção respiratória, cardiopatia congênita	1	-	-
Bronquite	1	-	1
Cefaleia	1	-	-
Celulite na face	1	-	-
Gastroenterite	2	-	-
Febre	1	-	-
Neurossífilis	-	1	-
Nistigamo	-	1	-

6.11.2. SEQUENCIAMENTO E ANÁLISE FILOGENÉTICA DE AMOSTRAS POSITIVAS NA PLATAFORMA

Fragmentos amplificados em amostras positivas para alvos da plataforma foram sequenciados, as sequências foram alinhadas através do “software” MEGA 4. Foram sequenciados fragmentos obtidos de 10 amostras positivas para ENTV, 1 de HHV-1/2 e 2 de HHV-3. As amostras sequenciadas são oriundas dos três grupos de pacientes estudados: Meningite/meningoencefalite viral; meningite bacteriana; pacientes com outras morbidades (ANEXO I).

O alinhamento das sequências de ENTV está demonstrado na figura 55A, como amostras de referência para o alinhamento foi utilizado a sequência de *Human echovirus 6* (AF532046) depositada no GenBank. O fragmento amplificado da amostra de HHV-1/2 foi sequenciado e alinhado com amostras de HHV-1 e HHV-2, as sequências foram 100% idênticas (FIGURA 55B). As

sequências obtidas de 2 fragmentos amplificados em amostras positivas para HHV-3 também foram sequenciados e as sequencias apresentaram 100% de identidade com a amostra strain ZR5 (KF853235) (FIGURA 55C).

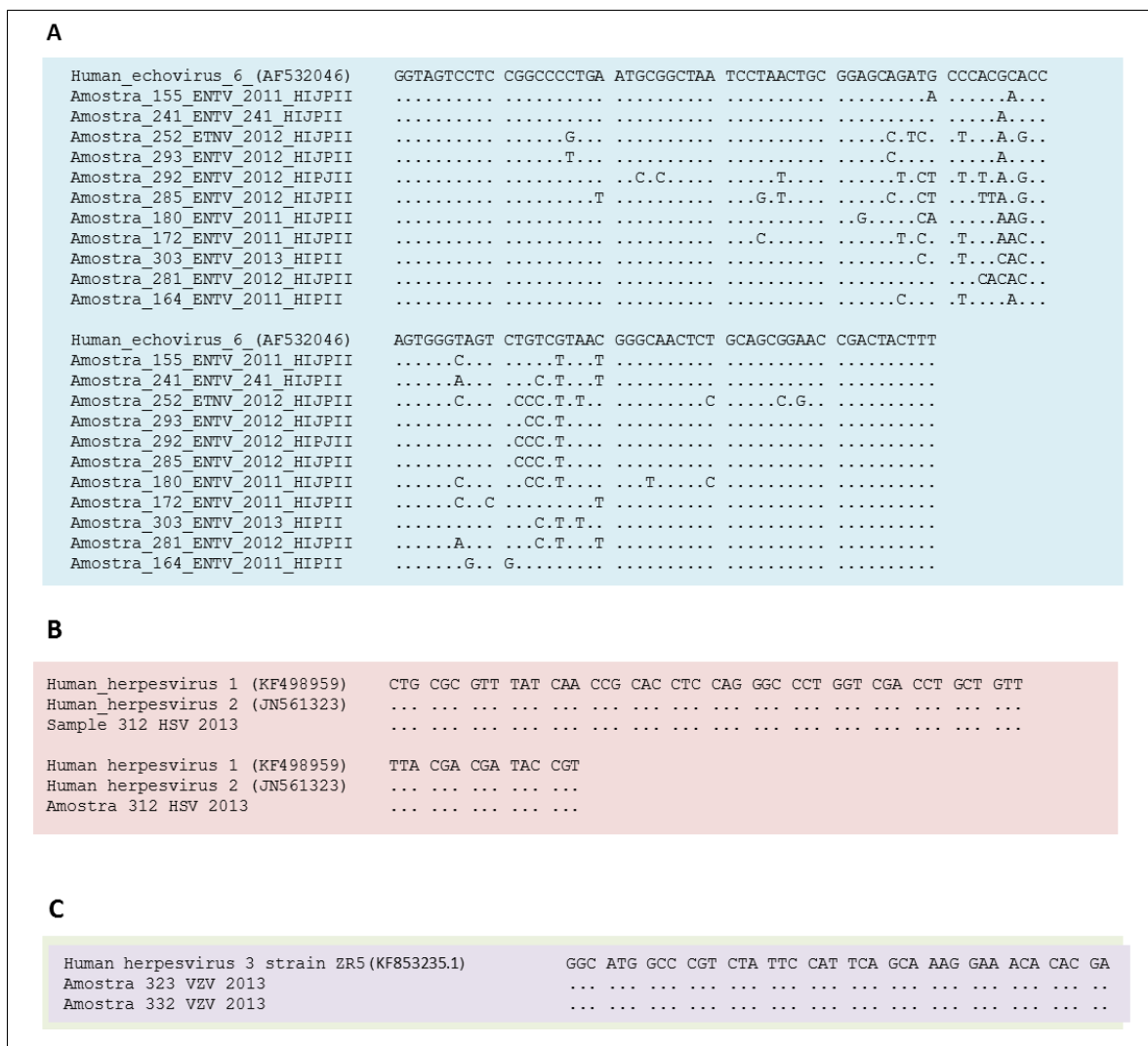


Figura 55: Alinhamento de sequencias de amostras positivas para ENTV, HHV-1/2 e HHV-3. A) Alinhamento das sequencias de ENTV. Os fragmentos amplificados por qPCR nas amostras 241, 252, 293, 292, 285,180, 172, 303, 281 e 164 foram sequenciados e as sequencias obtidas alinhadas com a amostra de *Human echovirus 6* depositada no GenBank. B) Alinhamento da sequencia de HHV-1/2. Amostras 312 foi sequenciada e alinhada com amostras de HHV-1 e HHV-2 depositada no GenBank. C) Alinhamento das sequencias de HHV-3. Amostras 323 e 332 foram sequenciadas e alinhadas com amostra ZR5 depositada no GenBank.

As sequencias de ENTV obtidas foram alinhadas com amostras das espécies *Enterovirus A*, *Enterovirus B* e *Enterovirus C* depositadas no GenBank, o alinhamento foi utilizado para análise de similaridade genética entre as amostras e construção de árvore filogenética. A análise filogenética demonstrou que nove das amostras se agrupam no ramo em que estão as amostras da espécie *Enterovirus B* e uma delas (amostra 164) se agrupa com amostras da espécie *Enterovirus A* (FIGURA 56).

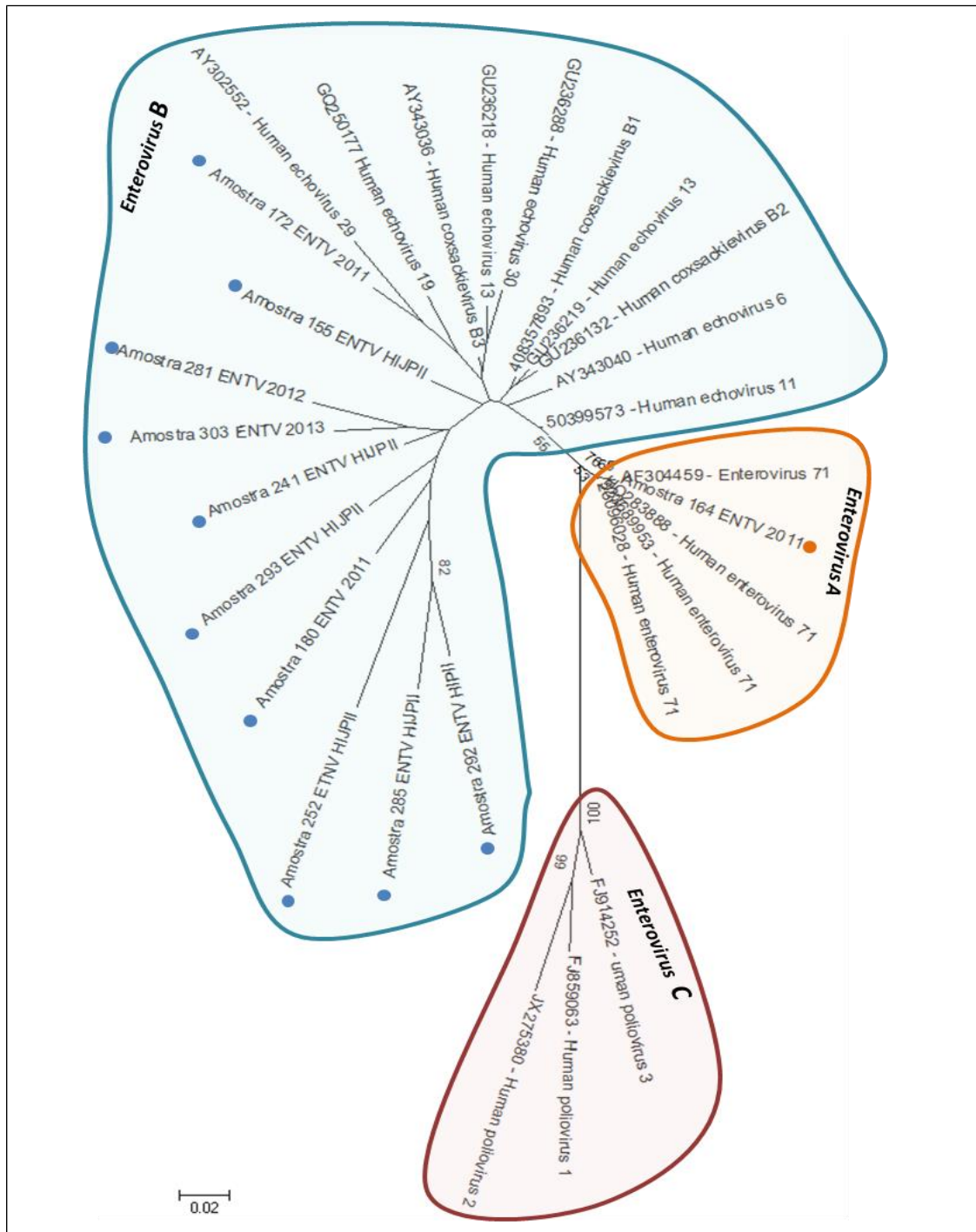


Figura 56: Árvore filogenética da região 5'UTR dos ENTV detectados na plataforma qPCR. Análise filogenética da região 5' - não traduzida (5'UTR) de ENTVs (110 pb). Alinhamento realizado com outras sequências depositadas no "GenBank" foi analisado pelo método de "Neighbor joining" utilizando o modelo de substituições de nt de Tamura-2 parâmetros implementado no programa MEGA 4. Valores de "bootstrap" estão representados nos nós.

Com o objetivo de analisar a identidade genética das nossas amostras com outras amostras virais, nossas sequencias foram comparadas com sequencias depositadas no “GenBank” através do programa “BLASTn”. As sequencias da região 5`UTR (110pb) das nossas amostras apresentaram similaridade de 95% até 100% com outras amostras depositadas. Na tabela 13 estão listados os sorotipos de ENTV que apresentam maior similaridade genética com as amostras sequenciadas no presente estudo.

Tabela 13: Similaridade genética entre as amostras de ENTV detectadas e amostras depositadas no GenBank.

Amostra	“Top hit”	Espécie	Similaridade Genética
155	Human echovirus 14 (GU236225)	<i>Enterovirus B</i>	99%
241	Human echovirus 18 (HM777023)	<i>Enterovirus B</i>	97%
252	Human echovirus 30 (AY343022)	<i>Enterovirus B</i>	98%
293	Human echovirus 6 (GU236173)	<i>Enterovirus B</i>	98%
292	Human echovirus 6 (AF532050)	<i>Enterovirus B</i>	98%
285	Human echovirus 30 (AF521517)	<i>Enterovirus B</i>	95%
180	Human enterovirus B (JX129469)	<i>Enterovirus B</i>	97%
172	Human enterovirus (AY271460)	<i>Enterovirus B</i>	95%
303	Coxsackievirus A9 (KM201659)	<i>Enterovirus B</i>	98%
281	Human coxsackievirus B3 (JX976770)	<i>Enterovirus B</i>	95%
164	Human enterovirus 71 (JN544419)	<i>Enterovirus A</i>	100%

6.11.3. QUANTIFICAÇÃO ABSOLUTA

Utilizando LCR mimético com carga viral conhecida de HHV-1 e poliovírus, foi possível construir uma curva padrão para cada um destes vírus que correlaciona a carga viral (pfu/mL- eixo y) com o ct de amplificação de cada padrão (Ct – eixo x). A partir destes dados foi feita a linearização dos pontos e foi obtida a equação da reta que melhor satisfaz os pontos, com esta equação obtivemos a carga viral das amostras positivas na plataforma para HHV-1 e *Enterovirus*.

Na figura 57 está a reta obtida através da curva padrão de HHV-1, e sua respectiva equação, a qual utilizamos para obter a carga viral da amostra 312 que foi positiva para HHV -1/2, a carga viral estimada foi em 1000 pfu/mL.

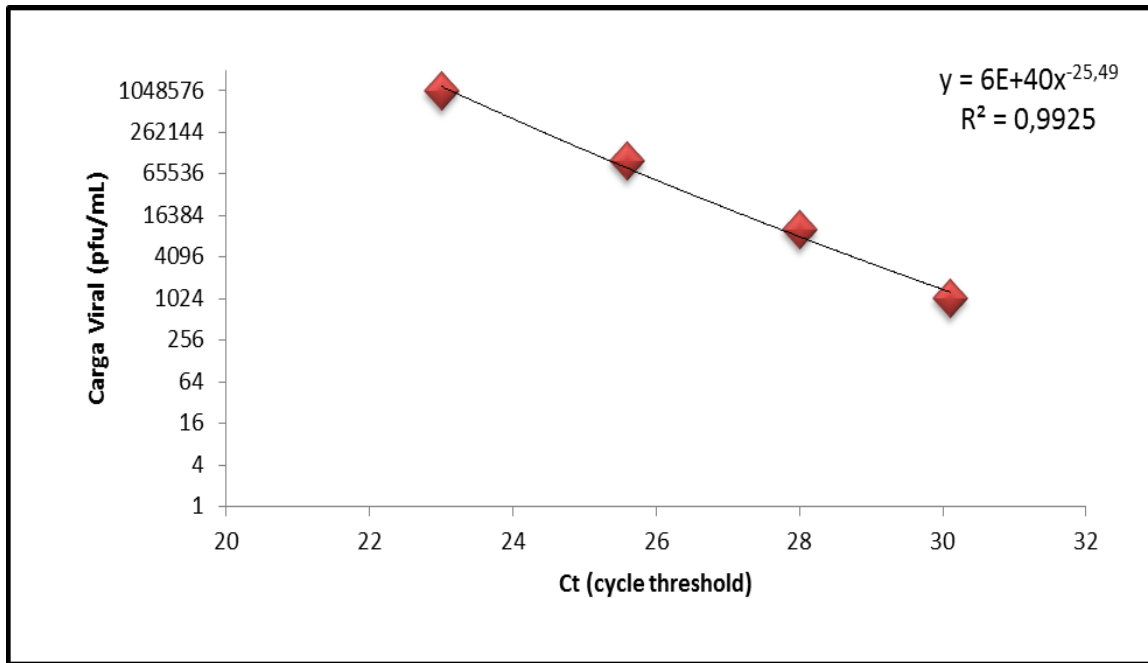


Figura 57: Linearização da curva padrão HHV-1. Retas obtidas através da curva padrão de HHV-1 e sua respectiva equação.

A reta obtida através da curva padrão de poliovírus foi utilizada para quantificação das amostras positivas para enterovírus da plataforma de diagnóstico (FIGURA 58)

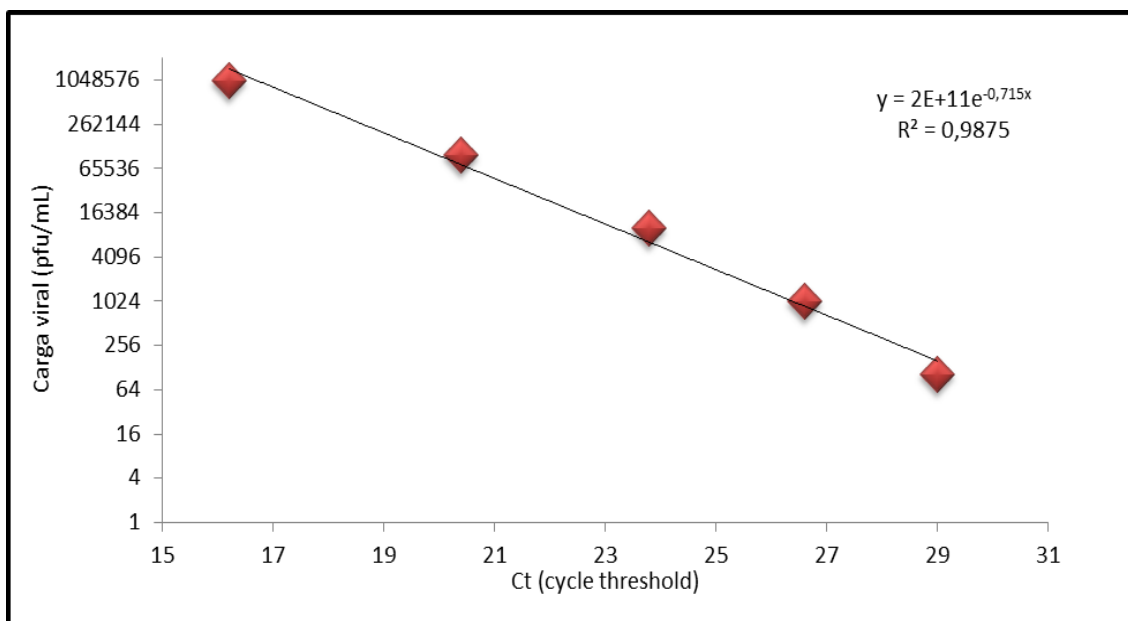


Figura 58: Linearização da curva padrão poliovírus. Retas obtidas através da curva padrão de poliovírus e sua respectiva equação

O resultado da carga viral de cada amostra está na tabela 14, a seguir. Apenas cargas maiores que 100 pfu/mL puderam ser calculadas com confiança, isto se deve porque este é o limite de sensibilidade do teste. A maior carga viral detectada foi de aproximadamente 85.000 pfu/mL na amostra 186. Cargas inferiores à 100 pfu/mL foram detectadas em 18 amostras dentre as positivas para ENTV (TABELA 14).

As cargas virais obtidas nas amostras positivas para ENTV na plataforma foram correlacionadas com o tempo de internação destes pacientes. Foi observado que não existe neste grupo amostral uma correlação positiva entre a carga viral de ENTV no LCR e o tempo em que o paciente ficou internado no HIJPII (FIGURA 59).

Tabela 14: Carga viral de amostras com detecção de ETNV.

AMOSTRA	Carga Viral (pfu/mL)
19	225
83	< 100
194	215
20	< 100
49	204
169	< 100
163	225
152	< 100
155	3758
186	85441
191	< 100
65	298
55	< 100
84	< 101
171	< 100
172	141
178	2306
164	2016
161	319
10	< 100
17	< 100
155	230
180	< 100
241	< 100
254	< 100
281	< 100
303	215
356	< 100
310	< 100
350	< 100
354	< 100
325	< 100
353	< 100
306	< 100
349	1653
330	2161

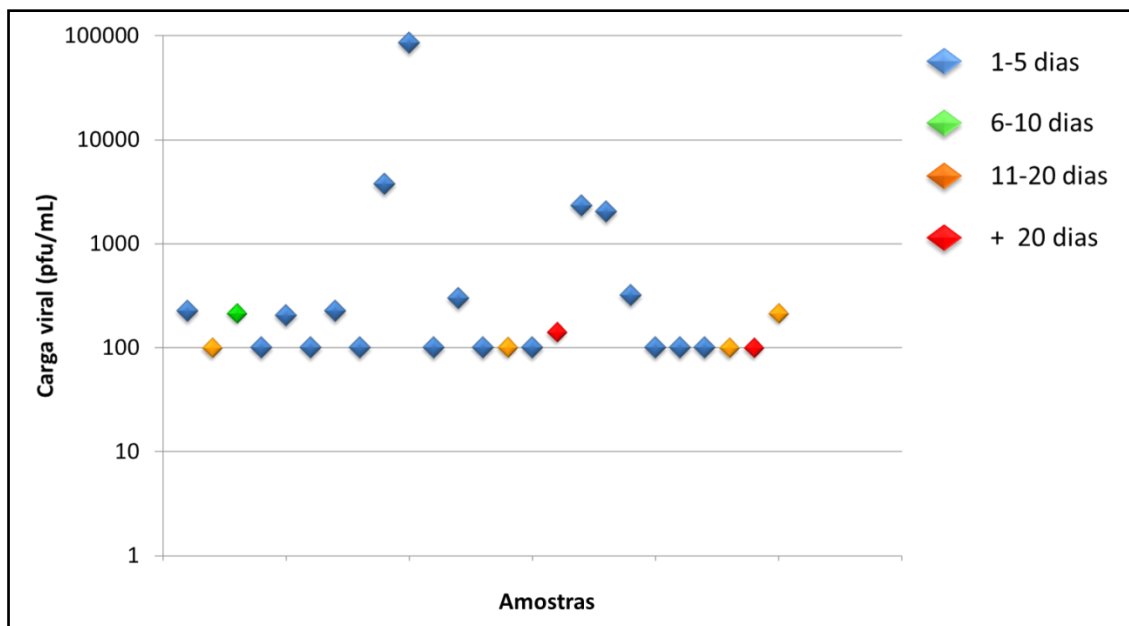


Figura 59: Carga viral de amostras com detecção de ENTV e relação com tempo de internação. Dispersão das amostras em relação a carga viral no eixo y, as cores indicam o tempo de internação de cada pacientes.

6.11.3.1 CORRELAÇÃO ENTRE N^oCÓPIAS/mL E PFU/mL

Para quantificar a carga viral foram utilizados padrões, baseados em partículas virais infecciosas.

Para comparar os padrões baseados em plasmídeos e os baseados em partículas virais infecciosas, foi comparada a detecção obtida por 10^6 cópias plasmidiais com a obtida por 10^6 pfu/mL. Foi observado que quando se utiliza plasmídeos, o sinal de detecção apresenta uma diferença de 1,4 (Ct) em relação a detecção de um padrão com 10^6 pfu/mL (FIGURA 60 A), o que gera uma quantificação teórica 2,6 vezes maior no caso dos plasmídeos (FIGURA 60 B). Este fato demonstra que apesar das partículas defectivas não serem consideradas ao se gerar o padrão, este tem um sinal menor que plasmídeos purificados e quantificados. Desta forma nossos resultados sugerem que a utilização de padrões baseados em partículas virais (demonstrado para HHV-1) é mais adequado para quantificação, além de ser mais próximo do que observamos em uma infecção natural.

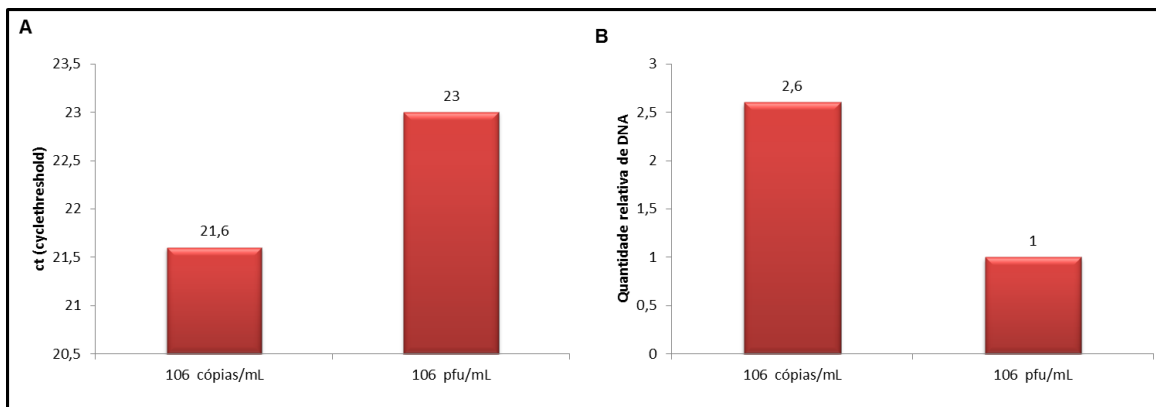


Figura 60: Comparação de padrões cópias/mL vs pfu/mL. A) Ct de detecção de do padrão contendo 10⁶ cópias plasmidiais /mL e do padrão contendo 10⁶ pfu/mL. B) Comparação da quantidade relativa de DNA entre o padrão plasmidial e o com partículas virais

6.11.4.APLICAÇÃO DA PLATAFORMA DE DIAGNÓSTICO EM CASOS CLÍNICOS GRAVES

Amostras de dois pacientes obtidas em colaboração com Dr. Guilherme Machado neurologista do Hospital Risoleta Neves foram aplicadas em nossa plataforma para o diagnóstico.

6.11.4.1. CASO 1– INFECÇÃO NO SNC POR *Dengue vírus 3* GENÓTIPO I

Paciente A.C.G.N com 21 anos, sem doenças crônicas ou uso regular de medicamentos, apresentou vários episódios de crise convulsiva generalizada mesmo com uso de fenitoína 300mg/dia. A análise cito-química do LCR apresentou os seguintes resultados: leucócitos 7 por mL; hemácias 10,000 por mL; glicose 78 (mg/dL); proteínas 35,8 (mg/mL); cultura bacteriana negativa; pesquisa de HHV-1 e CMV negativa (PCR).

O resultado na plataforma de diagnóstico foi positivo para FLAV e negativo para os outros vírus testados (HHV-1/2; VZV; ENTV; CMV) (FIGURA 61 A e B). Para identificar a espécie viral foi feita uma PCR para detecção de *Dengue virus*, e o resultado foi positivo (LANCIOTTI *et al.*1994). O sequenciamento do produto de PCR revelou uma infecção por DENV 3 e a análise filogenética da

sequencia demonstrou que o vírus detectado pertence ao genótipo I (FIGURA 61 C).

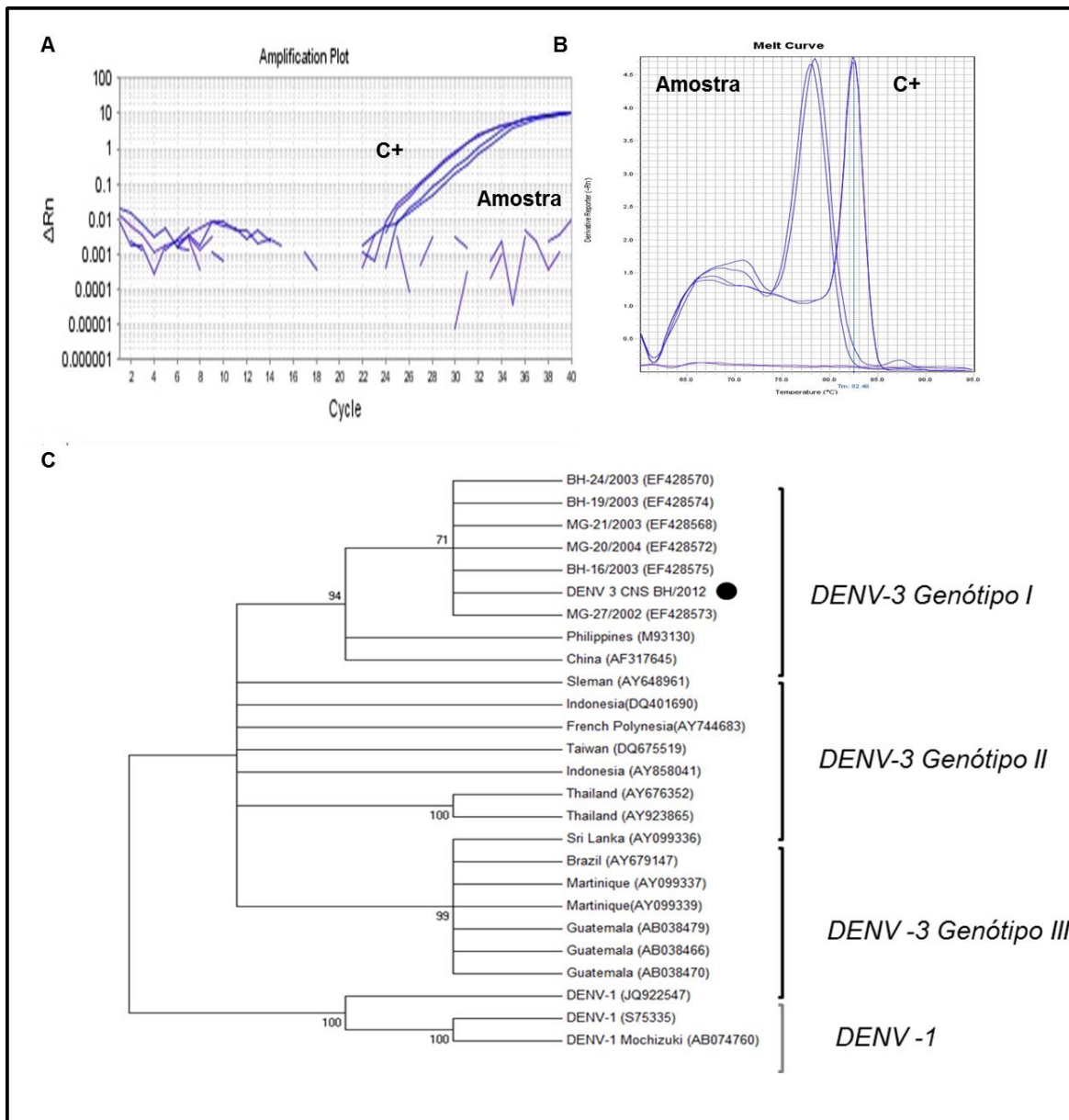


Figura 61: Diagnóstico Caso 1 empregando a plataforma qPCR. A) Curvas de amplificação na escala logarítmica para FLAV (Amostra), cDNA de *St. Louis encephalitis vírus* (C+) e o controle negativo utilizando água (C-). B) Curva de dissociação os produto amplificado. Tm do fragmento da amostra de 79,1°C e o do controle positivo foi de 82,1°C. C) Análise filogenética da região “C pré-membrana” (CprM) de DENVs (451b). Alinhamento realizado com outras sequências depositadas no “GenBank” foi analisado pelo método de “Neighbor joining” utilizando o modelo de substituições de nt de Tamura-2 parâmetros implementado no programa MEGA 4. Valores de “bootstrap” estão representados nos nós.

6.11.4.2. CASO 2 – CASO FATAL DE INFECÇÃO NO SNC POR *Enterovirus A*

Paciente R.C.M.S., obesa, previamente hígida. Apresentou quadro de febre, cefaleia e mialgia. O quadro febril persistiu e a paciente apresentou quadro convulsivo generalizado, sendo então sedada e intubada.

Análise do LCR apresentou os seguintes resultados: 2 células por mL; glicose 89 (mg/dL); proteínas 48 (mg/mL); pesquisa de HHV-1 e CMV negativa (PCR); cultura bacteriana negativa. O tratamento empírico com aciclovir e posteriormente meropenem + vancomicina.

Febre (42°C) e as crises convulsivas mantiveram-se. Doze dias após a internação a paciente apresentou três paradas respiratórias e foi a óbito.

O resultado na plataforma de diagnóstico foi positivo para ENTV e negativo para os outros vírus testados (HHV-1/2; VZV; FLAV; CMV) (FIGURA 62 A e B). O produto da qPCR foi purificado e sequenciado. O sequenciamento de nucleotídeos confirmou se tratar de um vírus do gênero enterovírus e análise filogenética mostrou que o vírus detectado se agrupava com outras amostras, depositadas no “GenBank”, de *Enterovirus A* (FIGURA 62 C).

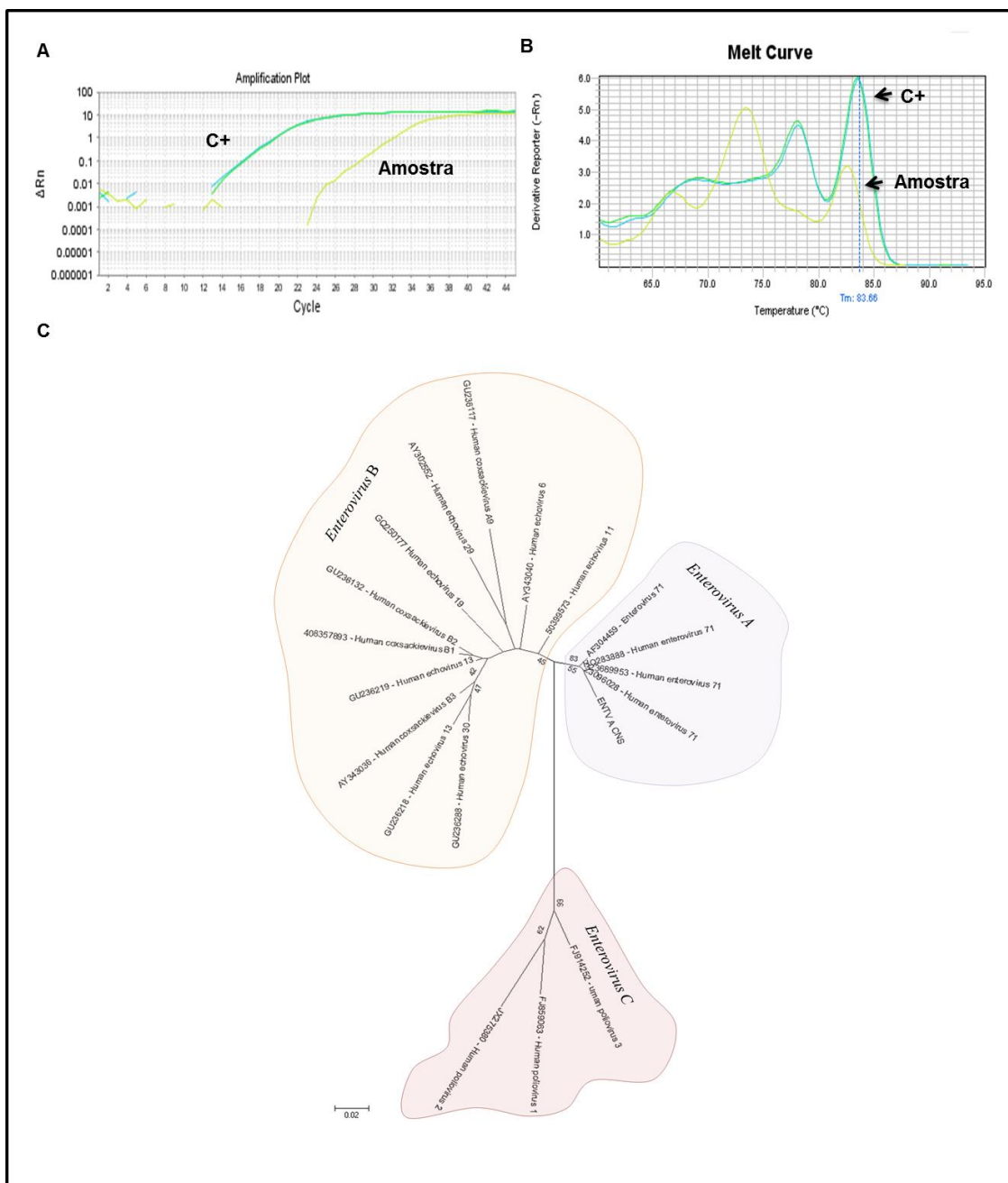


Figura 62: Diagnóstico Caso 2 empregando a plataforma qPCR. A) Curvas de amplificação na escala logarítmica para ENTV (Amostra), cDNA de Poliovírus (C+) e o controle negativo utilizando água (C-). B) Curva de dissociação do DNA amplificado. Tm do fragmento da amostra é de 83,0 °C e do controle positivo de 82,3°C. C) Análise filogenética da região 5' não traduzida (5'UTR) de ENTV (110b). Alinhamento realizado com outras sequências depositadas no "GenBank" foi analisado pelo método de "Neighbor joining" utilizando o modelo de substituições de nt de Tamura-2 parâmetros implementado no programa MEGA 4. Valores de "bootstrap" estão representados nos nós.

6.11.5. APLICAÇÃO DOS TESTES TAQMAN®

Algumas amostras do HIJPII em que ENTV e HHV-1/2 foram detectados no sistema SYBR® da plataforma, foram também testadas no sistema TaqMan®.

Das amostras positivas para ENTV no sistema SYBR®, 88% foram também positivas nos sistema TaqMan®. A única amostra positiva para HHV -1/2 (312) da plataforma no sistema SYBR®, também foi positiva no sistema TaqMan® (FIGURA 63)

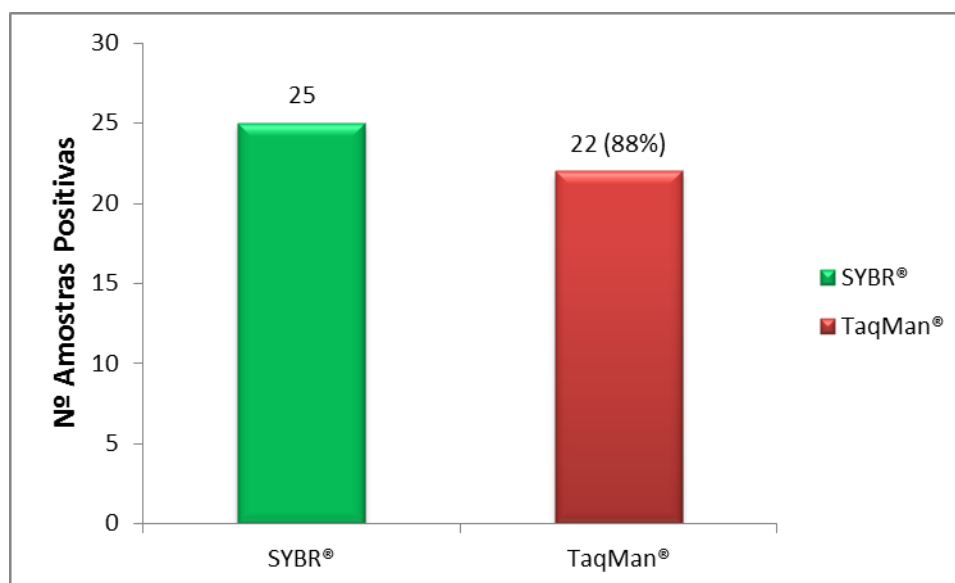


Figura 63: Aplicação do teste TaqMan® para detecção de ENTV. Amostras positivas no sistema SYBR (25) foram testadas novamente no sistema TaqMan.

6.11.6. APLICAÇÃO DA PLATAFORMA EM OUTROS “ESPECIMENS” CLÍNICOS

6.11.6.1 DIAGNÓSTICO DE ENTV – SWAB ORAL E SANGUE

A plataforma qPCR foi utilizada para identificar o agente etiológico de um surto de herpangina (doença exantemática) em Palmeirópolis, Tocantins (FIGURA 64A). Neste surto 37 crianças de uma mesma escola apresentaram lesões na boca (FIGURA 64B), anorexia e vômito. Foram enviados “swabs” das lesões bucais e sangue para nosso laboratório, o teste padronizado para detecção de ENTV no LCR também se mostrou eficaz na detecção destes vírus em outras

amostras clínicas. Após o diagnóstico por qPCR foi feita a amplificação de um fragmento de DNA maior por PCR (250pb), o qual foi sequenciado. A sequência obtida foi utilizada em análises filogenéticas que revelaram que *Enterovirus B* era o agente viral responsável pelo surto (FIGRUA 64C).

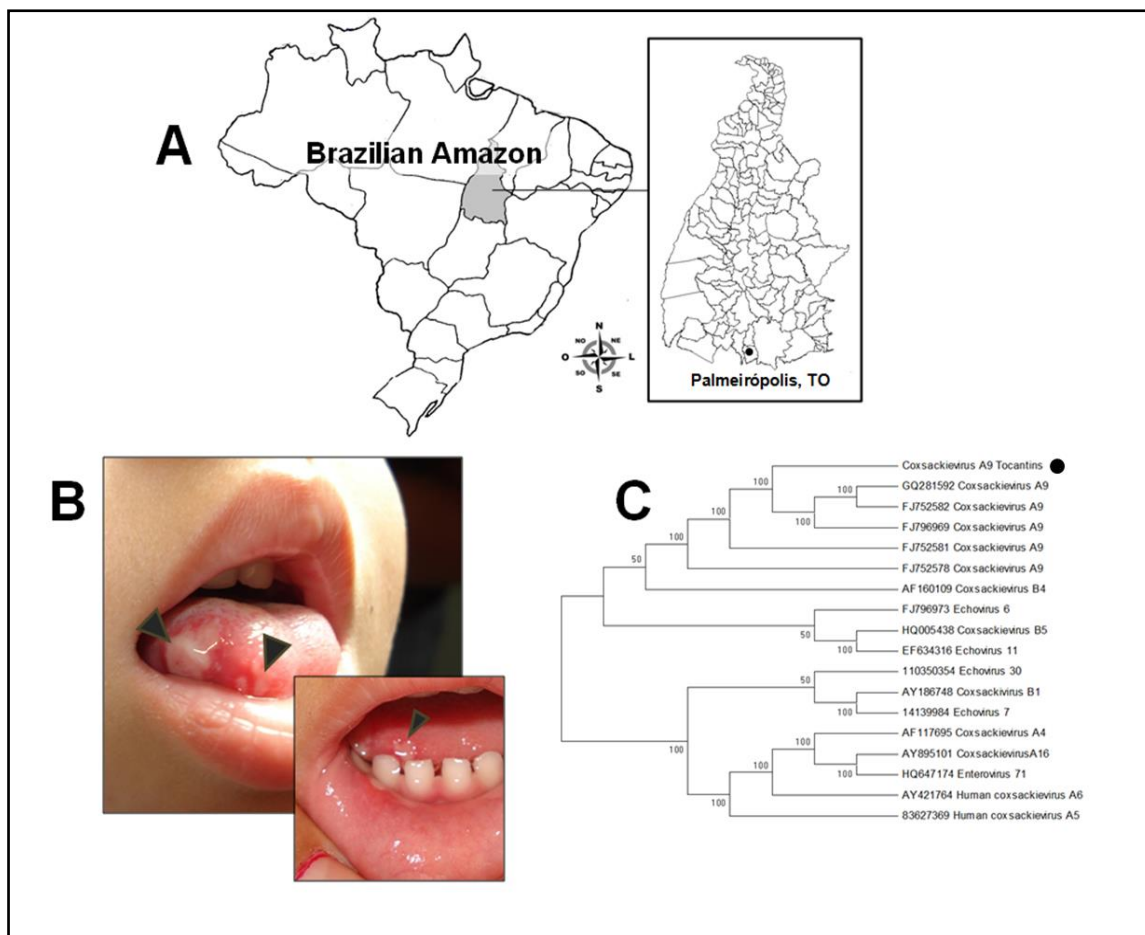


Figura 64: Diagnóstico surto de ENTV B. A) Localização do surto. Surto de herpangina por ENTV B em Palmeirópolis, TOB) Lesão bucal causada por ENTV B. C) Árvore filogenética. Análise filogenética da região 5' não traduzida (5'UTR) de ENTV B (250 pb). Alinhamento realizado com outras sequências depositadas no "GenBank" foi analisado pelo método de "Neighbor joining" utilizando o modelo de substituições de nt de Tamura–2 parâmetros implementado no programa MEGA 4. Valores de "bootstrap" estão representados nos nós.

6.11.6.2 DIAGNÓSTICO DE HERPES ZOSTER – SWAB

Paciente F.G.F., adulto e hígido, no dia 20/11/2014 apresentou lesões exantemáticas na barriga e nas costas, no dermatomo esquerdo. No dia

23/11/2014 apresentou intensificação de dor nevralgica no lado esquerdo do tronco, neste dia foi coletado swab da lesão exantemática. O swab coletado foi eluído em água, que foi utilizada como amostra em nossa plataforma de diagnóstico, o resultado foi positivo para HHV-3 e negativo para HHV-1/2 (FIGURA 65). Em 24/11/2014 o paciente iniciou o tratamento com aciclovir oral, 3 dias depois as lesões não apresentavam mais sinais inflamatórios.

O paciente relatou que 15 dias após o diagnóstico, apesar da melhora das lesões e das dores essas não haviam desaparecido ainda, informou também que no dia 10/12/2014 seu filho de 6 anos foi diagnosticado clinicamente com varicela, as lesões eram na face e costas e perduraram por 7 dias. Esta criança foi vacinada aos 3 anos com a vacina atenuada anti-varicela . A amostra do filho não foi obtida para diagnóstico.

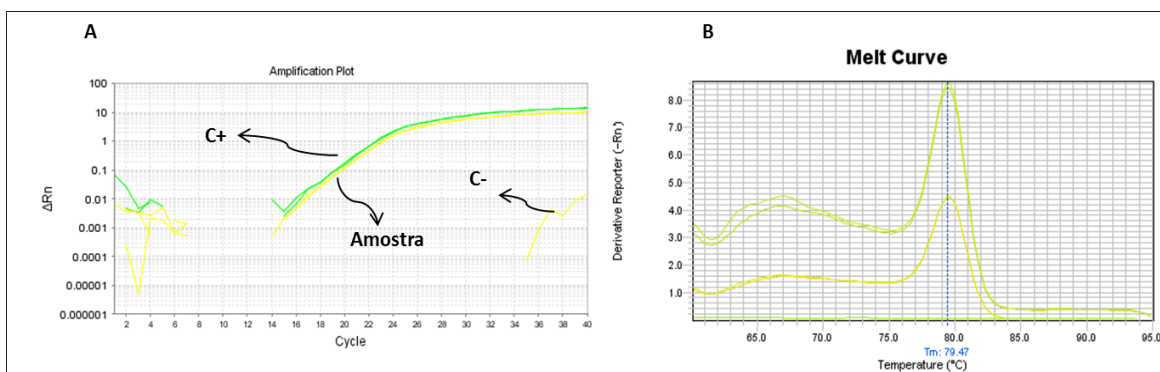


Figura 65: Diagnóstico Herpes zoster empregando a plataforma de qPCR. A) Curvas de amplificação na escala logarítmica para HHV-3 (Amostra), DNA HHV-3 amostra HC05 (C+) e o controle negativo utilizando água (C-). **B)** Curva de dissociação do DNA amplificado. T_m do fragmento da amostra de $79,47^\circ\text{C}$ e o do controle positivo foi de $79,50^\circ\text{C}$

VII. DISCUSSÃO

Infecções no SNC apresentam distribuição mundial e são causa de doenças que acarretam grande morbidade e mortalidade, sendo assim um desafio para os sistemas de saúde em todo o mundo. Vírus são os agentes etiológicos mais frequentes nessas infecções, sendo encefalites e meningoencefalites as duas doenças mais frequentemente associadas por infecções virais no SNC (OMS 2013). Membros de diversas famílias virais apresentam tropismo pelo SNC e são capazes de quebrar a homeostase desse sistema, causando doenças que podem provocar de danos transitórios até sequelas permanentes (SOARES *et al.*, 2011). Como em outras doenças de etiologia viral, a gravidade da doença causada no SNC por um patógeno viral dependerá de fatores de virulência viral e a resposta imune do hospedeiro (TYLER, 2009). Conhecer fatores virais de neurovirulência e fatores do hospedeiro que interferem na neuroinvasão e no dano no SNC é importante para entendimento da infecção, patogênese e doença. Atualmente no Brasil, e em vários outros países, não é feita na rotina do sistema de saúde a identificação de agentes virais que causam doença no SNC. Na maioria dos casos é feito um diagnóstico presuntivo, o que torna desconhecido a verdadeira importância destes agentes nos casos de infecção no SNC (SES-SP, 2006; SINAN 2014).

Desta forma no presente trabalho uma plataforma de diagnóstico baseada em qPCR com novos testes de diagnóstico moleculares que possibilitam a detecção no LCR de vários agentes virais que causadores de meningoencefalite (HHV-1, HHV-2, HHV-3, HHV-5, enterovírus, DENV 1-4, WNV, SLEV, YFV, JEV) foi desenvolvida. Os testes unificados em um único sistema de diagnóstico, torna mais eficiente, econômico e abrangente a identificação de agentes virais (LUTFALLA & UZE, 2006). A escolha dos alvos foi feita de forma racional, pois: (i) foram selecionados os agentes que classicamente causam infecções no SNC no mundo, como HHVs e enterovírus, e que também já foi demonstrado sua importância epidemiológica para os casos de infecção viral no SNC no Brasil (SOARES *et al.*, 2011; BASTOS *et al.*, 2014; OLSEN *et al.*, 2015;); (ii) também foram selecionados agentes neutrópicos emergentes, como DENVs que são endêmicos em vários países do mundo e constantemente causam epidemias (ARAÚJO *et al.*, 2012;

SOARES *et al.*, 2011; BASTOS *et al.*, 2014); (iii) por fim foram incorporados à nossa plataforma testes para detecção de agentes que são conhecidos por causar graves infecções no SNC em outras partes do mundo mas suas infecções são emergentes no Brasil ou apresentam potencial emergente (WNV, SLEV, YFV e JEV) (BASTOS *et al.*, 2014; SILVA *et al.*, 2013; PAUVOLID-CORRÊA *et al.*, 2013; ROSA *et al.*, 2013)

Os testes dos iniciadores selecionados para detecção dos vírus alvo da plataforma foram capazes de detectar a região alvo dos genomas virais (FIGURAS 14, 15, 16, 17 e 18) e os fragmentos de DNA amplificado foram de tamanho molecular conforme projetado (FIGURA 19). Nestes testes também foi possível determinar, nas condições da plataforma, a temperatura de “melt” de cada amplificado, o que é importante para análise das amostras a serem testadas conforme LUTFALLA & UZE, 2006. Não houve amplificação inespecífica no controle negativo comprovando que os iniciadores selecionados não formaram dímeros (ESPY *et al.*, 2006).

A eficiência dos iniciadores da plataforma do presente estudo foi mensurada apresentando valores de HHV-1/2 114%; HHV-3 113%; HHV-5 106%; FLAV 92%; ENTV 110%; WNV 98%; SLEV 94%; YFV 96%; JEV 97%; (FIGURAS 21, 22, 23 e 24) (TABELA 4). Ensaios baseados em qPCR necessitam apresentar uma eficiência, variando de 85% à 115%, para garantir que a robustez das reações seja insatisfatória ao testar amostras clínicas, reduzindo a probabilidade de resultados falso negativos segundo ESPY *et al.*, 2006. Os iniciadores para detecção de DENVs não tiveram sua eficiência testada neste trabalho pois eles foram obtidos da literatura e sua eficiência era conhecida já antes do uso nesta plataforma (SANTIAGO *et al.*, 2013).

Além de eficientes, a maioria dos ensaios (FLAV, ENTV, HHVs, WNV, SLEV e DENVs) apresentaram sensibilidade capaz de detectar cargas virais em LCR mimético iguais ou inferiores 10^3 cópias/mL (FIGURAS 28,29 e 30) (TABELAS 6 e 7) (SANTIAGO *et al.*, 2013; KESSLER *et al.*, 2005). Esse valores foram iguais ou superiores à outros ensaios para estes mesmos alvos na literatura (SANTIAGO *et al.*, 2013; PANG *et al.*, 2014), ressaltando que no presente

trabalho há uma vantagem para o diagnósticos dos referidos alvos, pois todos estão em um mesmo sistema, a plataforma de diagnóstico. Os testes para detecção de YFV e JEV apresentaram sensibilidade inferior aos outros ensaios da plataforma, com limite de detecção de 10^4 cópias/mL o que não inviabiliza seu uso em nossa plataforma, pois esta sensibilidade é superior ou igual de outros testes descritos (PANG *et al.*, 2014). Todos os testes foram específicos, porque detectaram apenas o alvo em reações com a presença de todos patógenos da plataforma e também amostra do genoma humano (FIGURA 31). Os ensaios desta plataforma foram reproduzíveis apresentando coeficientes de variação inferiores aos 5% preconizados pela ANVISA para testes diagnósticos, os ensaios foram realizados em diferentes dias, em diferentes aparelhos e por diferentes analistas (FARMACOPÉIA 2010).

Testes baseados em detecção molecular apresentam etapas pré-analíticas que são extremamente importantes para o desempenho dos ensaios, assim neste estudo foi desenvolvido um fluxograma para o processamento das amostras na plataforma de diagnóstico (FIGURA 27) (LUTFALLA & UZE, 2006; ESPY *et al.*, 2006). Baseado nos testes realizados a forma mais eficiente de processamento para detecção dos vírus de DNA é a diluição em água (10x) e para o vírus com genoma de RNA a extração do material genético com o kit QIAamp viral®. Para controlar a eficiência do processamento das amostras, foram desenvolvidos testes para detecção de controles internos endógenos (B-actina humana) e exógenos (GFP), e ambos apresentaram eficiência satisfatória (93% e 107%, respectivamente).

A plataforma de diagnóstico do presente estudo foi desenvolvida inicialmente apenas com a utilização de testes baseados na emissão de fluorescência por SYBR (HHV-1/2, HHV-3, HHV-5 ENTV e FLAV), um fluoróforo intercalante de bases de DNA, que confere ao teste grande sensibilidade, mas pode também, em algumas condições, gerar emissão de fluorescência inespecífica. Objetivando uma comparação com outros métodos de detecção foram desenvolvidos testes para ENTV e HHV-1/2 utilizando sondas de hidrólise (TaqMan) (LUTFALLA & UZE, 2006). Quando os testes para um mesmo alvo,

mas como sistema de detecção diferente, foram comparados, foi avaliado que tanto para HHV-1/2 quanto ENTV a emissão de fluorescência utilizando SYBR foi superior ao sistema TaqMan, em média 5 vezes maior (FIGURAS 43, 44, 45 e 46). Assim o sistema SYBR apresenta um potencial superior para nossa plataforma, pois além da maior emissão de fluorescência os testes baseados em SYBR são menos susceptíveis a resultados falso-negativos devido a mutações no genoma alvo, o que se torna relevante quando se faz testes para detecção de grupos virais como é o teste para ENTV (DIERSSEN *et al.*, 2007).

Para avaliar a plataforma de diagnóstico para meningoencefalites virais do presente estudo, esta foi aplicada em uma coleção de amostras de LCR do Hospital infantil João Paulo II, hospital de referência do estado de Minas Gerais onde os casos de suspeita de infecção no SNC não tem a identificação do agente etiológico viral. As amostras de LCR foram coletadas no período entre os anos de 2010 e 2013, de pacientes com: (i) diagnóstico de meningite/meningoencefalite viral; (ii) suspeita de infecção viral no SNC mas diagnóstico descartado após análise clínica e laboratorial; (iii) pacientes com meningite bacteriana. Nossa plataforma foi capaz de detectar agentes virais em 62% das amostras analisadas (44/70) dentre o grupo dos pacientes com diagnóstico presuntivo de infecção no SNC (FIGURA 50). Neste grupo a média de idade é de 3,6 anos e 71% do sexo masculino, essa maior incidência de infecções virais no SNC em crianças do sexo masculino é corroborada por outros estudos, como o realizado na Finlândia por RANTAKALLIO e colaboradores onde 64% das crianças com infecção no SNC também eram do sexo masculino (FIGURA 47) (RANTAKALLIO *et al.*, 2007).

Outros estudos de investigação molecular de vírus em LCR de pacientes com suspeita de infecção no SNC já foram desenvolvidos no Brasil e apresentaram uma taxa de detecção inferior em relação à plataforma desenvolvida (vírus detectados em 29% das amostras), sendo que os principais fatores que explicam a maior frequência de detecção da referida plataforma são os testes serem baseados em qPCR e o rigor na padronização das etapas analíticas e pré-analíticas (BASTOS *et al.*, 2014). Testes baseados em PCR, como utilizados por BASTOS, apresentam menor sensibilidade na detecção viral

quando comparados com qPCR. Essa diferença ocorre principalmente devido ao sistema automatizado de detecção utilizado (LUTFALLA & UZE, 2006).

Dentre as 44 amostras, de pacientes com diagnóstico presuntivo de meningite/meningoencefalite viral no SNC, em que houve detecção viral os agentes mais detectados foram enterovírus, em 70% das amostras (31/44) (FIGURA 51). Um estudo realizado em crianças por BERLIN, este ano, apresentou características similares na frequência de detecção de ENTV, 62%, corroborando os nossos achados. É importante salientar que a incidência desses vírus nos casos de infecção do SNC varia amplamente de acordo com a região do mundo em que foi realizada, a estação do ano e a situação epidemiológica (Ex: surtos e epidemias) de outros agentes virais neurotrópicos (SOARES *et al.*, 2011; BASTOS *et al.*, 2014; BERLIN *et al.*, 2014). Nas amostras positivas para ENTV a carga viral foi quantificada e não houve correlação positiva com o tempo de internação dos pacientes.

O segundo vírus mais frequentemente detectado no grupo de pacientes com diagnóstico presuntivo de meningite/meningoencefalite viral foi o HHV-3, 13%. Este dado é de grande relevância, pois essa frequência de HHV-3 em casos de meningite/meningoencefalite é superior a outros estudos em crianças (FIGURA 51) (BERLIN *et al.*, 1993). Corroborando com nossos dados foi detectado HHV-3 em 20% das amostras positivas para agentes virais, amostras coletadas entre 2010 e 2012 na região norte do Brasil (BASTOS *et al.*, 2014). A vigilância de infecções no SNC por HHV-3 torna-se extremamente importante no Brasil, pois na última década é crescente o número de pessoas vacinadas com uma vacina de HHV-3 atenuada, visto que infecção no SNC é um potencial efeito adverso.

DENV são emergentes agentes neurotrópicos que estão distribuídos em grande parte do globo. Em 2013 foram notificados mais 350.000 casos de dengue no estado de Minas Gerais (SOARES *et al.* 2011; MONDINI *et al.* 2007; ARAÚJO *et al.*, 2012; OPAS 2013). Ainda pouco se sabe sobre o impacto das infecções por DENV no SNC para a saúde pública em países onde

a febre do dengue é uma doença endêmica e, em algumas ocasiões, epidêmica. Neste trabalho foi detectado DENV em 5 amostras (11%) de LCR de pacientes com suspeita de meningite/meningoencefalite viral, sendo que 4 casos foram por DENV-2 e uma coinfeção por DENV-2 e DENV-3 (FIGURA 51). SOARES detectou DENVs em 10% dos casos analisados em um estudo em 2011 no estado do Rio de Janeiro (SOARES *et al.* 2011). A identificação dos sorotipos e genótipos envolvidos em infecções no SNC é importante para traçar o perfil genético destas amostras, isso irá contribuir para o entendimento das infecções por DENV no SNC.

Os vírus HHV-1/2 e HHV-5 foram detectados em uma amostra cada (2,3%) no grupo de pacientes com suspeita de meningite/meningoencefalite viral. Essa incidência neste grupo amostral foi condizente com outros estudos já realizados em população infantil, como o realizado por LE no Vietnã onde estes vírus foram detectados 1,3% das amostras de LCR de crianças com suspeita de infecção viral no SNC (FIGURA 51) (LE *et al.* 2010). A criança no qual o presente estudo no qual foi detectado HHV-5 apresentou diagnóstico sorológico negativo para HIV e o sistema imune não apresentava supressão. Esse fato é de grande importância, pois é crescente o número de relatos e infecções no SNC por HHV-5 em indivíduos imunocompetentes, o que porém é negligenciado na rotina clínica (RAFALIDIS *et al.* 2008; PRÖSCH *et al.* 1998). Infecções por HHV-1/2 no SNC de crianças são altamente letais, superior a 70%, e quando há sobrevivência essa é usualmente acompanhada de sequelas. O paciente com infecção por HHV-1/2 diagnosticado no presente estudo, apresentou cegueira, o que é condizente com outros relatos da literatura de infecção por HHV -1/2 no SNC na infância, comprovando assim a importância do diagnóstico precoce deste patógeno para o correto tratamento da infecção (CHADWICK *et al.* 2006).

Identificando os agentes virais no LCR dos pacientes com meningite/meningoencefalite foi possível analisar fatores cito-químicos nas amostras de LCR correlacionando-os com os grupos virais detectados: (i) enterovírus; (ii) herpes vírus; (iii) dengue vírus (FIGURA 52). Foi analisado

celularidade, glicose, proteínas e proporção entre PMN e MN. A celularidade foi abaixo de 500 células/mL de LCR em todas as amostras, o que é condizente com meningites/meningoencefalites virais. As amostras com detecção de enterovírus apresentaram uma celularidade média superior aos outros grupos porém sem relevância estatística (FIGURA 52 A) (CHADWICK *et al.* 2006). A quantidade de glicose no LCR também não foi estatisticamente diferente entre as amostras de LCR das diagnosticadas com os diferentes grupos virais, sendo que duas amostras apresentaram valores menores que 40mg/dL o que normalmente acontece em meningites bacterianas (FIGURA 52 B). A análise dos valores de proteína total no LCR demonstrou que os mesmos dois pacientes que apresentaram um decréscimo nos níveis de glicose apresentaram um aumento nos níveis proteicos, acima de 80 mg/dL. O número amostral dessa variação de padrão destes marcadores é pequeno, mas é uma demonstração que estes marcadores podem não ser fidedignos no diagnóstico das meningites/meningoencefalites (FIGURA 52 C) (CHADWICK *et al.* 2006; MICHOS *et al.* 2007). Outro parâmetro analisado nas amostras de LCR foi o balanço entre PMN e MN: foi observado que o grupo de pacientes com infecção por herpes vírus apresentou PMN acima de 50% das células do LCR, todos esses pacientes foram erroneamente tratados com antibiótico como terapia inicial para infecção no SNC. Esse dado reforça a fragilidade de parâmetros cito-químicos para o diagnóstico de alguns casos de infecção no SNC (FIGURA 52D).

O presente estudo contribui também na emergência de relatos das doenças geradas por coinfeção microbianas. Para isto foram analisadas 22 amostras de LCR de pacientes com meningite bacteriana com o auxílio da plataforma de diagnóstico desenvolvida (GIRI *et al.* 2013). Agentes virais foram detectados em 22% destas amostras, sendo que foram detectados ENTV (2), HHV-3 (2) e HHV-5 (1). Estes dados reforçam a emergência e importância de testes de diagnóstico focados na detecção de múltiplos patógenos (FIGURA 54). Detecção de coinfeções entre vírus e bactérias é um paradigma microbiológico e imunológico, pois ainda é desconhecido a importância de cada patógeno para a doença e a participação de cada um dos agentes na neuroinvasão, isto é: um agente facilita a entrada do outro no SNC? Qual é o

primeiro à quebrar o equilíbrio fisiológico da barreira hematoencefálica? Ainda não existem respostas claras para estas indagações, sendo que o diagnóstico dos agentes envolvidos em coinfeções é o “primeiro passo” para o estudo da fisiopatologia da doença.

A plataforma desenvolvida neste trabalho também foi utilizada para analisar amostras de LCR (n= 36) coletadas de pacientes que foram admitidos no HIJPII com suspeita clínica de meningite/meningoencefalite, porém esta hipótese foi descartada posteriormente com os exames cito-químicos do LCR. Estas amostras foram analisadas em nossa plataforma e vírus foram detectados em 52%, demonstrando assim que nessas amostras a suspeita inicial de infecção no SNC foi confirmada, estes pacientes tiveram diagnóstico desde doenças locais como otite até infecções sistêmicas (septicemia) (TABELA 12). Nestes quadros é difícil avaliar o impacto da infecção no SNC na morbidade apresentada pelo paciente, essa dificuldade é acentuada por não conter na literatura estudos que analisem amostras semelhantes. Atualmente é ascendente a importância do sistema imune residente no SNC na regulação de eixos hormonais centrais, por consequência sistêmico, o que leva à alteração no sistema imune. Assim o estudo de infecções no SNC em conjunto com doenças em outros sistemas pode ser de grande importância para o paciente e para o entendimento das alterações fisiopatológicas, sejam estas sistêmicas ou locais (HAROON *et al.* 2011).

Alguns dos resultados da nossa plataforma foram confirmados por sequenciamento de nucleotídeos dos fragmentos amplificados por qPCR. Foram sequenciados 20% das amostras positivas, demonstrando assim que as amplificações da plataforma de diagnóstico são específicas para os alvos (FIGURA 55). O sequenciamento de fragmentos de HHV-3 e HHV-1/2 confirmou o resultados do qPCR. As sequências obtidas das amostras positivas para ENTV foram utilizadas em análises filogenéticas para identificação das espécies virais, pois iniciadores para de detecção de ENTV não identificam a espécie. A árvore filogenética construída com as sequencias obtidas e sequências depositadas no “GenBank”, demonstrou que nove das

amostras se agrupavam com amostras da espécie *Enterovirus B* e uma amostra no ramo da espécie *Enterovirus A*. A prevalência destas duas espécies em meningites/meningoencefalites por ETNV em crianças é corroborado por estudos prévios descritos na literatura (BERLIN *et al.*, 1993; KUMAR *et al.*, 2013). A identificação dos ENTV contribui para a epidemiologia molecular destes vírus no Brasil, e principalmente em Minas Gerais, pois ainda é pouco conhecida a epidemiologia dos agentes mais prevalentes nos casos de infecção viral no SNC (SES-2005; BASTOS *et al.*, 2014). Em nossas análises não foi possível identificar os sorotipos dos ENTV pois a região sequenciada sofre recombinação genética intra-espécie, porém através de análises de identidade genética foi possível identificar os sorotipos que apresentam maior identidade com as amostras sequenciadas (TABELA 13)

Além das amostras do HIJPII, a plataforma desenvolvida foi utilizada para detecção viral em dois casos graves de infecção no SNC, sendo que em um foi identificado infecção por *Enterovirus A*. Em um caso onde o desfecho foi óbito do paciente, no outro caso foi detectado DENV-3 genótipo I na amostra de uma paciente que apresentou sequelas após a infecção (FIGURAS 61 e 62). Esses achados reforçam a participação de agentes virais em casos graves de infecção no SNC, e contribui na desmistificação de que infecções virais no SNC sempre apresentam um curso benigno. A nossa plataforma foi eficiente e também “versátil” ao ser utilizada no diagnóstico de doenças exantemáticas. Conforme apresentado, através de coleta de swab das lesões, foi diagnosticado um caso de herpes zoster e um surto de herpangina em crianças. O diagnóstico destes casos demonstra e reforça o potencial da plataforma desenvolvida para o sistema de saúde.

VIII. CONCLUSÕES

- ✓ Durante o desenvolvimento e padronização da plataforma de qPCR os testes de avaliação de sensibilidade analítica, especificidade na detecção dos alvos, repetibilidade e reprodutibilidade, nos quais foi demonstrado que os ensaios que compõem a plataforma são úteis no sistema de saúde para diagnóstico de meningoencefalites virais causadas por ENTV, FLAV, HHV-1/2 e HHV-3.
- ✓ Os testes moleculares demonstraram que os ENTV são os agentes etiológicos mais prevalentes nos casos estudados de crianças com suspeita de infecção viral no SNC. Os pacientes diagnosticados com infecção por ENTV foram internados por um tempo médio igual à pacientes onde foi detectado HHVs e FLAV, o que comprova a importância deste agente em relação as infecções virais no SNC em crianças.
- ✓ A detecção de HHV-3 foi superior a 10%, sendo o segundo agente mais detectado nas amostras de LCR, evidenciando assim a importância deste agente viral nos casos de infecção no SNC mesmo sendo este um vírus prevenido no sistema de saúde com vacinação.
- ✓ Pacientes diagnosticados com infecção viral no SNC foram erroneamente tratados com antibióticos, sugerindo que os atuais marcadores utilizados para diagnóstico da meningoencefalites virais são ineficientes

- ✓ Muitos pacientes que apresentam inicialmente a suspeita clínica de infecção no SNC tiveram este diagnóstico de meningite descartado por exames de imagem e análise cito-química do LCR. Porém, no LCR de vários desses pacientes foi detectado a presença de material genético viral. Dessa forma fica evidenciada a importância do diagnóstico virológico molecular em casos de suspeita de infecção no SNC.

- ✓ A detecção viral em LCR de pacientes com meningite bacteriana revelou a importância do diagnóstico microbiológico de doenças no SNC voltado para múltiplos patógenos.

IX. PERSPECTIVAS

- ✓ Houve a detecção de vírus no LCR em quadros de meningite onde bactérias também foram isoladas. Estes resultados abrem uma “caixa de pandora” e demonstram a necessidade do emprego de novas tecnologias no diagnóstico de infecções no SNC.
- ✓ Fazer o isolamento viral de amostras positivas de LCR, para caracterização molecular e biológica das amostras virais dos casos de meningoencefalites;
- ✓ Fazer as análises filogenéticas dos HHV-3 detectados para estudo da origem dessas amostras para identificar a possível relação com a amostra vacinal ou da cobertura vacinal.
- ✓ Caracterizar molecularmente os DENVs detectados para análises filogenéticas em busca de marcadores moleculares de neurovirulência;
- ✓ Caracterizar os padrões de citocinas e quimiocinas presentes nas amostras de LCR onde foram detectados vírus.

X. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALEXANDER, L., H. H. LU, E. WIMMER. Polioviruses containing picornavirus type 1 and/or type 2 internal ribosomal entry site elements: genetic hybrids and the expression of a foreign gene. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994. v.91, n.4, p.1406-10.

ARAUJO, F., R. NOGUEIRA, S. ARAUJO MDE, A. PERDIGAO, L. CAVALCANTI, R. BRILHANTE, M. ROCHA, D. F. VILAR, S. S. HOLANDA, M. BRAGA DDE, J. SIDRIM. Dengue in patients with central nervous system manifestations, Brazil. *Emerg Infect Dis*. 2012. v.18, n.4, p.677-9.

ARCHIMBAUD, C., M. CHAMBON, J. L. BAILLY, I. PETIT, C. HENQUELL, A. MIRAND, B. AUBLET-CUVELIER, S. UGHETTO, J. BEYTOUT, P. CLAVELOU, A. LABBE, P. PHILIPPE, J. SCHMIDT, C. REGAGNON, O. TRAORE, AND H. PEIGUE-LAFEUILLE. Impact of rapid enterovirus molecular diagnosis on the management of infants, children, and adults with aseptic meningitis. *J Med Virol*. 2009. v.81, n.1, p.42-8.

ARDUINO, P. G. & S. R. PORTER. Herpes Simplex Virus Type 1 infection: overview on relevant clinico-pathological features. *J Oral Pathol Med*. 2008. v.37, n.2, p.107-21.

ARRIBAS, J. R., G. A. STORCH, D. B. CLIFFORD, A. C. TSELIS. Cytomegalovirus encephalitis. *Ann Intern Med*. 1996. v.125, n.7, p.577-87.

BAMBERGER, D. M. Diagnosis, initial management, and prevention of meningitis. *Am Fam Physician*. 2010. v.82, n.12, p.1491-8.

BASTOS, M. S., N. LESSA, F. G. NAVECA, R. L. MONTE, W. S. BRAGA, L. T. FIGUEIREDO, R. RAMASAWMY, M. P. MOURAO. Detection of Herpesvirus, Enterovirus, and Arbovirus infection in patients with suspected central nervous

system viral infection in the Western Brazilian Amazon. *J Med Virol*. 2014. v.86, n.9, p.1522-7.

BENJAMIN, M. M., K. L. GUMMELT, R. ZAKI, A. AFZAL, L. SLOAN, S. SHAMIM. Herpes simplex virus meningitis complicated by ascending paralysis. *Proc (Bayl Univ Med Cent)*. 2013. v.26, n.3, p.265-7.

BERLIN, L. E., M. L. RORABAUGH, F. HELDRICH, K. ROBERTS, T. DORAN, AND J. F. MODLIN. Aseptic meningitis in infants < 2 years of age: diagnosis and etiology. *J Infect Dis*. 1993. v.168, n.4, p.888-92.

BHATT, S., P. W. GETHING, O. J. BRADY, J. P. MESSINA, A. W. FARLOW, C. L. MOYES, J. M. DRAKE, J. S. BROWNSTEIN, A. G. HOEN, O. SANKOH, M. F. MYERS, D. B. GEORGE, T. JAENISCH, G. R. WINT, C. P. SIMMONS, T. W. SCOTT, J. J. FARRAR, S. I. HAY. The global distribution and burden of dengue. *Nature* 2013. v.496, n.7446, p.504-7.

BUSTIN, S. A. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J Mol Endocrinol*. 2000. v.25, n.2, p.169-93..

CALVARIO, A., A. BOZZI, M. SCARASCIULLI, C. VENTOLA, R. SECCIA, D. STOMATI, B. BRANCASI. Herpes Consensus PCR test: a useful diagnostic approach to the screening of viral diseases of the central nervous system. *J Clin Virol*. 2002. v.25, n.1, p.71-8.

CAVALCANTI, J.L.S. Meningites virais enfermidades benignas? In: *Neuroinfecção 1994*. São Paulo: Ed. USP, 1994. p. 179-184.

CHADWICK, D.R., Viral meningitis. *Br Med Bull*. 2005. v.75, n.76, p.1-14.

CHANG, L. Y., L. M. HUANG, S. S. GAU, Y. Y. WU, S. H. HSIA, T. Y. FAN, K. L. LIN, Y. C. HUANG, C. Y. LU, T. Y. LIN. Neurodevelopment and cognition in children after enterovirus 71 infection. *N Engl J Med*. 2007. v. 356, n.12, p.1226-34.

CRAIG, C. P. & A. J. NAHMIAS. Different patterns of neurologic involvement with herpes simplex virus types 1 and 2: isolation of herpes simplex virus type 2 from the buffy coat of two adults with meningitis. *J Infect Dis*, 1973. v.127, n.4, p.365-72.

CUNNINGHAM, A. L., R. J. DIEFENBACH, M. MIRANDA-SAKSENA, L. BOSNJAK, M. KIM, C. JONES, M. W. DOUGLAS. The cycle of human herpes simplex virus infection: virus transport and immune control. *J Infect Dis*. 2006. v.194. n. 1. p.11-8.

DE ORY, F., A. AVELLON, J. E. ECHEVARRIA, M. P. SANCHEZ-SECO, G. TRALLERO, M. CABRERIZO, I. CASAS, F. POZO, G. FEDELE, D. VICENTE, M. J. PENA, A. MORENO, J. NIUBO, N. RABELLA, G. RUBIO, M. PEREZ-RUIZ, M. RODRIGUEZ-IGLESIAS, C. GIMENO, J. M. EIROS, S. MELON, M. BLASCO, I. LOPEZ-MIRAGAYA, E. VARELA, A. MARTINEZ-SAPINA, G. RODRIGUEZ, M. A. MARCOS, M. I. GEGUNDEZ, G. CILLA, I. GABILONDO, J. M. NAVARRO, J. TORRES, C. AZNAR, A. CASTELLANOS, M. E. GUIASOLA, A. I. NEGREDO, A. TENORIO, S. VAZQUEZ-MORON. Viral infections of the central nervous system in Spain: a prospective study. *J Med Virol*. 2013. v.85, n.3, p. 554-62

DIERSSEN, U., F. REHREN, C. HENKE-GENDO, G. HARSTE, AND A. HEIM. Rapid routine detection of enterovirus RNA in cerebrospinal fluid by a one-step real-time RT-PCR assay. *J Clin Virol*. 2008. v.42, n.1, p.58-64.

DOMINGUES, R.B. & TEIXEIRA, A.L. Management of acute viral encephalitis in Brazil. *Braz J Infect Dis*. 2009. v.13, n.6, p.433-9.

ECHEVARRIA, J. M., P. MARTINEZ-MARTIN, A. TELLEZ, F. DE ORY, J. L. RAPUN, A. BERNAL, E. ESTEVEZ, R. NAJERA. Aseptic meningitis due to varicella-zoster virus: serum antibody levels and local synthesis of specific IgG, IgM, and IgA. *J Infect Dis*. 1987.v.155, n.5, p.959-67.

ESPY, M. J., J. R. UHL, L. M. SLOAN, S. P. BUCKWALTER, M. F. JONES, E. A. VETTER, J. D. YAO, N. L. WENGENACK, J. E. ROSENBLATT, F. R. COCKERILL, 3RD, T. F. SMITH. Real-time PCR in clinical microbiology: applications for routine laboratory testing. *Clin Microbiol Ver.* 2006. v.19, n.1, p.165-256.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA. 5.ed. São Paulo: Atheneu, 2010. p.102.

GAETA, A., S. VERZARO, L. M. CRISTINA, C. MANCINI, C. NAZZARI. Diagnosis of neurological herpesvirus infections: real time PCR in cerebral spinal fluid analysis. *New Microbiol.* 2009. v.32, n.4, p.333-40.

GORGIEVSKI-HRISOHO, M., J. D. SCHUMACHER, N. VILIMONOVIC, D. GERMANN, L. MATTER. Detection by PCR of enteroviruses in cerebrospinal fluid during a summer outbreak of aseptic meningitis in Switzerland. *J Clin Microbiol.* 1998. v.36, n.9, p.2408-12.

GUBLER, D. J. The global pandemic of dengue/dengue haemorrhagic fever: current status and prospects for the future. *Ann Acad Med Singapore.* 1998. v.27, n.2, p.227-34.

GUBLER, D.J. The continuing spread of West Nile virus in the western hemisphere. *Clin Infect Dis.* 2007. v.45, n.8, p.1039-46.

GUZMAN, M. G. & G. KOURI. Dengue and dengue hemorrhagic fever in the Americas: lessons and challenges. *J Clin Virol.* 2003.v.27, n.1, p.1-13.

HABIB, A. A., D. GILDEN, D. S. SCHMID, J. E. SAFDIEH. Varicella zoster virus meningitis with hypoglycorrhachia in the absence of rash in an immunocompetent woman. *J Neurovirol.* 2009. v.15, n.2, p.206-8.

HAROON, E., C. L. RAISON, A. H. MILLER. Psychoneuroimmunology meets neuropsychopharmacology: translational implications of the impact of

inflammation on behavior. *Neuropsychopharmacology*. 2012 . v.37, n.1, p.137-62.

HORSTMANN, D. M. Enterovirus infections of the central nervous system. The present and future of poliomyelitis. *Med Clin North Am*. 1967. v.51, n.3, p.681-92.

HUFNER, K., T. DERFUSS, S. HERBERGER, K. SUNAMI, S. RUSSELL, I. SINICINA, V. ARBUSOW, M. STRUPP, T. BRANDT, D. THEIL. Latency of alpha-herpes viruses is accompanied by a chronic inflammation in human trigeminal ganglia but not in dorsal root ganglia. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2006.v.65, n.10, p.1022-30.

JANG, S., S. I. SUH, S. M. HA, J. H. BYEON, B. L. EUN, Y. H. LEE, H. S. SEO, S. H. EUN, H. Y. SEOL. Enterovirus 71-related encephalomyelitis: usual and unusual magnetic resonance imaging findings. *Neuroradiology*. 2012. v.54, n.3, p.239-45.

KESSLER, H. H., G. MUHLBAUER, B. RINNER, E. STELZL, A. BERGER, H. W. DORR, B. SANTNER, E. MARTH, AND H. RABENAU. Detection of Herpes simplex virus DNA by real-time PCR. *J Clin Microbiol*. 2000. v.38, n.7, p.2638-42.

KING, A.M.Q., ADAMS, M.J., *et al.* (Eds). *Virus taxonomy: classification and nomenclature of viruses: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. San Diego: Elsevier Academic Press. 2013.

KOYUNCU, O. O., I. B. HOGUE, L. W. ENQUIST. Virus infections in the nervous system. *Cell Host Microbe*. 2013. v.13, n.4, p.379-93.

KUBISTA, M., J. M. ANDRADE, M. BENGTSSON, A. FOROOTAN, J. JONAK, K. LIND, R. SINDELKA, R. SJOBACK, B. SJOGREEN, L. STROMBOM, A. STAHLBERG, N. ZORIC. The real-time polymerase chain reaction. *Mol Aspects Med*. 2006. v.27, n.2-3, p.95-125.

KUMAR, A., D. SHUKLA, S. SRIVASTAVA, M. Z. IDRIS, T. N. DHOLE. High frequency of enterovirus serotype circulation in a densely populated area of India. *J Infect Dev Ctries.* 2013. v.7, n.6, p.475-83.

LANCIOTTI, R. S., C. H. CALISHER, D. J. GUBLER, G. J. CHANG, A. V. VORNDAM. Rapid detection and typing of dengue viruses from clinical samples by using reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol.* 1992. v.30, n.3, p.545-51.

LAVAIL, J. H., A. N. TAUSCHER, E. AGHAIAN, O. HARRABI, S. S. SIDHU. Axonal transport and sorting of herpes simplex virus components in a mature mouse visual system. *J Virol.* 2003.v.77, p.6117-26.

LE, V. T., T. Q. PHAN, Q. H. DO, B. H. NGUYEN, Q. B. LAM, V. BACH, H. TRUONG, T. H. TRAN, V. NGUYEN, T. TRAN, M. VO, V. T. TRAN, C. SCHULTSZ, J. FARRAR, H. R. VAN DOORN, M. D. DE JONG. Viral etiology of encephalitis in children in southern Vietnam: results of a one-year prospective descriptive study. *PLoS Negl Trop Dis.* 2010. v. 4, n.10, p.854.

LEE, Y. F., A. NOMOTO, B. M. DETJEN, E. WIMMER. A protein covalently linked to poliovirus genome RNA. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1977.v.74, n.1, p.59-63.

LIMA, G.K.. Tlr2 e tlr9: receptores essenciais para o controle da infecção por vírus herpes simplex do tipo 1. 2010. 135f. Tese (doutorado em microbiologia)- Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

LIN, A.L., & SAFDIEH, J.E. The evaluation and management of bacterial meningitis: current practice and emerging developments. *Neurologist.* 2010. v.16, n.3, p.143-51.

MACKENZIE, J. S., D. J. GUBLER, L. R. PETERSEN. Emerging flaviviruses: the spread and resurgence of Japanese encephalitis, West Nile and dengue viruses. *Nat Med*, 2004. v.10, n.12, p.S98-109.

MARTINEZ-MARTIN, P., A. GARCIA-SAIZ, J. L. RAPUN, J. M. ECHEVARRIA. Intrathecal synthesis of IgG antibodies to varicella-zoster virus in two cases of acute aseptic meningitis syndrome with no cutaneous lesions. *J Med Virol*, 1985.v.16, n.2, p.201-9.

MCMINN, P., I. STRATOV, L. NAGARAJAN, S. DAVIS. Neurological manifestations of enterovirus 71 infection in children during an outbreak of hand, foot, and mouth disease in Western Australia. *Clin Infect Dis*. 2001. v.32, n.2, p.236-42.

MELANDRI, V., A. E. GUIMARAES, N. KOMAR, M. L. NOGUEIRA, A. MONDINI, A. FERNANDEZ-SESMA, J. ALENCAR, I. BOSCH. Serological detection of West Nile virus in horses and hicken from Pantanal, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2012. v.107, n.8,p.1073-5.

MICHOS, A. G., V. P. SYRIOPOULOU, C. HADJICHRISTODOULOU, G. L. DAIKOS, E. LAGONA, P. DOURIDAS, G. MOSTROU, M. THEODORIDOU. Aseptic meningitis in children: analysis of 506 cases. *PLoS One*. 2007. v.2, n.7, p.e674.

MITSUHASHI, M. Technical report: Part 2. Basic requirements for designing optimal PCR primers. *J Clin Lab Anal*.1996.v.10, n.5, p.285-93.

MONDINI, A., I. L. CARDEAL, E. LAZARO, S. H. NUNES, C. C. MOREIRA, P. RAHAL, I. L. MAIA, C. FRANCO, D. V. GONGORA, F. GONGORA-RUBIO, E. M. CABRERA, L. T. FIGUEIREDO, F. G. DA FONSECA, R. V. BRONZONI, F. CHIARAVALLLOTI-NETO, M. L. NOGUEIRA. Saint Louis encephalitis virus, Brazil. *Emerg Infect Dis*. 2007. v.13, n.1, p.176-8.

MOCARSKI, J.R. & SHENK, T. Herpes Simplex Viruses. In: Knipe D.M., Howley P.M., Griffin D.E (Eds), Fields Virology. Lippincot Williams and Williams, Philadelphia, PA. 2007. p.2503-2600.

MUKHOPADHYAY, S., R. J. KUHN, M. G. ROSSMANN. A structural perspective of the flavivirus life cycle. *Nat Rev Microbiol.* 2005.v.3, n.1, p.13-22.

NIGROVIC, L. E., A. M. FINE, M. C. MONUTEAUX, S. S. SHAH, M. I. Neuman. Trends in the management of viral meningitis at United States children's hospitals. *Pediatrics.* 2013. v.131, n.4, p.670-6.

NIX, W. A., M. S. OBERSTE, M. A. PALLANSCH. Sensitive, seminested PCR amplification of VP1 sequences for direct identification of all enterovirus serotypes from original clinical specimens. *J Clin Microbiol.* 2006. v.44, n.8, p.2698-704.

OIE. Validation and quality control of polymerase chain reaction methods used For the diagnosis of infectious diseases. *Terrestrial Manual.* 2010. Chapter 1.1.5.

OLSEN, S.J., CAMPBELL, A.P., KRONGKAEW, S., SAHAS, L., TAWEE, C., SOMSAK, L., AKRAVUDH, V., TASANEE, T., SUPOCH, T., ANANNIT, V., PUNNEE, V., SUPACHAI, J., PAIROJ, B., KIATSAK, R., VEERACHAI, W., NINO, K., SCOTT, F. D., THAILAND ENCEPHALITIS SURVEILLANCE TEAM. Infectious causes of encephalitis and meningoencephalitis in Thailand, 2003–2005. *Emerg Infect Dis.* 2015 .

PANG, Z., A. LI, J. LI, J. QU, C. HE, S. ZHANG, C. LI, Q. ZHANG, M. LIANG, D. LI. Comprehensive multiplex one-step real-time TaqMan qRT-PCR assays for detection and quantification of hemorrhagic fever viruses. *PLoS One.* 2014. V.9, n.4, p.e95635.

PAUVOLID-CORREA, A., J. L. KENNEY, D. COUTO-LIMA, Z. M. CAMPOS, H. G. SCHATZMAYR, R. M. NOGUEIRA, A. C. BRAULT, N. KOMAR. Ilheus virus isolation in the pantanal, west-central Brazil. *PLoS Negl Trop Dis*. 2013. v.7, n.7, p.e2318.

PROSCH, S., E. SCHIELKE, A. REIP, H. MEISEL, H. D. VOLK, K. M. EINHAUPL, D. H. KRUGER. Human cytomegalovirus (HCMV) encephalitis in an immunocompetent young person and diagnostic reliability of HCMV DNA PCR using cerebrospinal fluid of nonimmunosuppressed patients. *J Clin Microbiol*. 1998. v.36, n.12, p.3636-40.

PUGACHEV, K. V., F. GUIRAKHOO, D. W. TRENT, T. P. MONATH. Traditional and novel approaches to flavivirus vaccines. *Int J Parasitol*. 2003.v.33, n.5-6, p.567-82.

RAFAILIDIS, P. I., E. G. MOURTZOUKOU, I. C. VARBOBITIS, M. E. FALAGAS. Severe cytomegalovirus infection in apparently immunocompetent patients: a systematic review. *Virology*. 2008. v.5, n.47.

RANTAKALLIO, P., M. LESKINEN, L. VON WENDT. Incidence and prognosis of central nervous system infections in a birth cohort of 12,000 children. *Scand J Infect Dis*. 1986. v.18, n.4, p.287-94.

RATNAMOHAN, V. M., A. L. CUNNINGHAM, W. D. RAWLINSON. Removal of inhibitors of CSF-PCR to improve diagnosis of herpesviral encephalitis. *J Virol Methods*. 1998. v.72, n.1, p.59-65.

RAYMAEKERS, M., R. SMETS, B. MAES, R. CARTUYVELS. Checklist for optimization and validation of real-time PCR assays. *J Clin Lab Anal*. 2009. v.23, n.3, p.145-51.

RHOADES, R. E., J. M. TABOR-GODWIN, G. TSUENG, R. FEUER. Enterovirus infections of the central nervous system. *Virology*. 2011. v.411, n.2, p.288-305.

ROIZMAN B. & KNIPE D.M. Herpes Simplex Viruses. In: Knipe D.M., Howley P.M., Griffin D.E (Eds), *Fields Virology*. Lippincot Williams and Williams, Philadelphia, PA. 2007. p.2503-2600.

ROIZMAN, B. & B. TADDEO. The strategy of herpes simplex virus replication and takeover of the host cell. In : Arvin A, Campadelli-Fiume G, Mocarski E, *et al.*, (Eds). Cambridge: Cambridge University Press. 2007.

RORABAUGH, M. L., L. E. BERLIN, F. HELDRICH, K. ROBERTS, L. A. ROSENBERG, T. DORAN, J. F. MODLIN. Aseptic meningitis in infants younger than 2 years of age: acute illness and neurologic complications. *Pediatrics*. 1993. v.92, n.2, p.206-11.

ROSA, R., E. A. COSTA, R. E. MARQUES, T. S. OLIVEIRA, R. FURTINI, M. R. BOMFIM, M. M. TEIXEIRA, T. A. PAIXAO, R. L. SANTOS. Isolation of saint louis encephalitis virus from a horse with neurological disease in Brazil. *PLoS Negl Trop Dis*. 2013.v.7, n.11, p.e2537.

ROTBART, H. A. Enteroviral infections of the central nervous system. *Clin Infect Dis*, v.20, n.4, Apr, p.971-81. 1995.

ROTBART, H. A., P. J. BRENNAN, K. H. FIFE, J. R. ROMERO, J. A. GRIFFIN, M. A. MCKINLAY, F. G. HAYDEN. Enterovirus meningitis in adults. *Clin Infect Dis*.1998. v.27, n.4, p.896-8.

SANTIAGO, G. A., E. VERGNE, Y. QUILES, J. COSME, J. VAZQUEZ, J. F. MEDINA, F. MEDINA, C. COLON, H. MARGOLIS, J. L. MUNOZ-JORDAN. Analytical and clinical performance of the CDC real time RT-PCR assay for

detection and typing of dengue virus. PLoS Negl Trop Dis. 2013. v.7, n.7, p.e2311.

SCHMUTZHARD, E. Viral infections of the CNS with special emphasis on herpes simplex infections. J Neurol. 2001.v.248, n.6, p.469-77.

SES-SP. Meningites Virais. Rev Saúde Pública. 2006. v. 40, n.1, p.65-70.

SES-SP. Introdução da PCR convencional e em tempo real para o diagnóstico laboratorial das meningites bacterianas no Instituto Adolfo Lutz . Publicação Mensal sobre Agravos à Saúde Pública. 2007. V.40, n.4.

SILVA, J. R., L. C. MEDEIROS, V. P. REIS, J. H. CHAVEZ, T. D. MUNHOZ, G. P. BORGES, O. A. SOARES, C. H. CAMPOS, R. Z. MACHADO, C. D. BALDANI, M. L. SILVA, J. L. FARIA, E. E. SILVA, L. T. FIGUEIREDO. Serologic survey of West Nile virus in horses from Central-West, Northeast and Southeast Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2013. v.108, n.7, p.921-3.

SINAN 2014. Sistema de Informação de Agravos de Notificação. Acessado em 21 de Novembro de 2014. Disponível em: <http://dtr2004.saude.gov.br/sinanweb/>

SHU, P. Y. & J. H. HUANG. Current advances in dengue diagnosis. Clin Diagn Lab Immunol. 2004.v.11, n.4, p.642-50.

SOARES, C. N., M. J. CABRAL-CASTRO, J. M. PERALTA, M. R. DE FREITAS, M. ZALIS, M. PUCCIONI-SOHLER. Review of the etiologies of viral meningitis and encephalitis in a dengue endemic region. J Neurol Sci. 2011. v.303, n.1-2, p.75-9.

STRIKAS, R. A., L. J. ANDERSON, R. A. Parker. Temporal and geographic patterns of isolates of nonpolio enterovirus in the United States, 1970-1983. J Infect Dis. 1986.v.153, n.2, p.346-51.

STUDAHL, M., A. RICKSTEN, T. SANDBERG, S. ELOWSON, S. HERNER, C. SALL, T. BERGSTROM. Cytomegalovirus infection of the CNS in non-compromised patients. *Acta Neurol Scand.* 1994. v.89, n.6, p.451-7.

TYLER, K. L. Herpes simplex virus infections of the central nervous system: encephalitis and meningitis, including Mollaret's. *Herpes.* 2004.v.11 Suppl 2, , p.57A-64A.

TYLER, K.L. Emerging viral infections of the central nervous system: part 1. *Arch Neurol.* 2009. v.66, n.8, p.939-48.

TYLER, K.L. Emerging viral infections of the central nervous system: part 2. *Arch Neurol.* 2009. v.66, n.9, p.1065-74.

WANG, E., H. NI, R. XU, A. D. BARRETT, S. J. WATOWICH, D. J. GUBLER, S. C. WEAVER. Evolutionary relationships of endemic/epidemic and sylvatic dengue viruses. *J Virol.* 2000. v.74, n.7, p.3227-34.

WHITLEY, R. J. & R. L. MILLER. Immunologic approach to herpes simplex virus. *Viral Immunol.* 2001.v.14, n.2, p.111-8.

YUAN, J. S., A. REED, F. CHEN, C. N. STEWART, JR. Statistical analysis of real-time PCR data. *BMC Bioinformatics.* 2006.v.7, p.85.

ZIAI, W.C. & LEWIN, J.J.. Update in the Diagnosis and Management of Central Nervous System Infections. *Neurol Clin.* 2008.v.26, p. 427–468.

XI. ANEXOS

ANEXO I – RESULTADOS qPCR HIPII

Diagnóstico HIPII	Amostra	β -ACTINA	nterovirus SYBR	Replicas	Ct	TM(°C)	HHV-1/2 SYBR	HHV3	HHV5	DENVs
Meningoencefalite viral	10	Positivo	Positivo	●●	32,6/ 32,7	83,2/ 83,3	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
Meningoencefalite viral	17	Positivo	Positivo				Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
Meningoencefalite viral	18	Positivo	Negativo				Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
Meningoencefalite viral	19	Positivo	Positivos	●●	27,9 / 27,7	82,6 / 82,6	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
Meningoencefalite viral	20	Positivo	Positivo	●●	31,8 / 32,3	82,6 / 82,6	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
Meningoencefalite viral	21	Positivo	Negativo				Negativo	Negativo	Negativo	Dengue 2
Meningoencefalite viral	30	Positivo	Negativo				Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
Meningoencefalite viral	34	Positivo	Negativo				Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
Meningoencefalite viral	49	Positivo	Positivo	●●	28 / 28	83,3 / 83,3	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
Meningoencefalite viral	55	Positivo	Positivo	●●	29 / 29,2	84,4 / 84,2	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
Meningoencefalite viral	65	Positivo	Positivo	●●	26,9 / 27,3	82,7 / 82,6	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
Meningoencefalite viral	68	Positivo	Negativo				Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
Meningoencefalite viral	69	Positivo	Negativo				Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
Meningoencefalite viral	73	Positivo	Negativo				Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
Meningoencefalite viral	78	Positivo	Negativo				Negativo	Negativo	Negativo	Dengue 2 e 3
Meningoencefalite viral	83	Positivo	Positivo	●●	31	82	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
Meningoencefalite viral	84	Positivo	Positivo	●●	30,1	83,8	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
Meningoencefalite viral	96	Positivo	Negativo				Negativo	Negativo	Negativo	Dengue 2
Meningoencefalite viral	97	Positivo	Negativo				Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
Meningoencefalite viral	109	Positivo	Negativo				Negativo	Negativo	Negativo	Dengue 2
Meningoencefalite viral	114	Positivo	Negativo				Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
Meningoencefalite viral	127	Positivo	Negativo				Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
Meningoencefalite viral	129	Positivo	Positivo	●●	24,6 / 25,3	82,6 / 82,7	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
Meningoencefalite viral	143	Positivo	Negativo				Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
Meningoencefalite viral	152	Positivo	Positivo	●○	30,2	82,5	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
Meningoencefalite viral	155	Positivo	Positivo	●●	27,7/ 27,8	82,6/82,7	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
Meningoencefalite viral	155	Positivo	Positivo	●●	24,3 / 25,2	82,6 / 82,7	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
Meningoencefalite viral	161	Positivo	Positivo	●●	27,5/ 26,3	83,6 / 83,8	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
Meningoencefalite viral	163	Positivo	Positivo	●●	28,2 / 27,4	83,5/ 83,5	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
Meningoencefalite viral	164	Positivo	Positivo	●●	25,8 / 26	82,7/ 82,6	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
Meningoencefalite viral	165	Positivo	Negativo				Negativo	Negativo	Negativo	Dengue 2
Meningoencefalite viral	169	Positivo	Positivo	●●	30 / 30	82,7/ 82,7	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
Meningoencefalite viral	171	Positivo	Positivo	●●	29,2/ 28,4		Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
Meningoencefalite viral	172	Positivo	Positivo	●●	28,8 / 28,4	83,6 / 83,6	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
Meningoencefalite viral	173	Positivo	Negativo				Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
Meningoencefalite viral	178	Positivo	Positivo		26 / 25,5	83,8 / 83,9	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
Meningoencefalite viral	180	Positivo	Positivo	●●	30,1/ 32,8	83,5/83,6	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
Meningoencefalite viral	181	Positivo	Negativo				Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
Meningoencefalite viral	182	Positivo	Negativo				Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
Meningoencefalite viral	186	Positivo	Positivo	●●	21,2/ 20,7	83,6 / 83,8	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
Meningoencefalite viral	191	Positivo	Positivo	●●	30, 8/ 29,9	83,1/ 83,2	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo

ANEXO I – RESULTADOS qPCR HIPII

Diagnóstico HIPII	Amostra	β-ACTINA	nterovirus SYB	Replicas	Ct	TM(°C)	HV-1/2 SYB	Replicas	Ct	TM(°C)	HHV3	Réplicas	Ct	TM(°C)	HHV5	Réplicas	Ct	TM(°C)	DENVs
Meningoencefalite viral	192	Positivo	Negativo				Negativo				Negativo				Negativo				Negativo
Meningoencefalite viral	194	Positivo	Positivo	●●	27,8/28,1	82,2/82,3	Negativo				Negativo				Negativo				Negativo
Meningoencefalite viral	241	Positivo	Positivo	●●	29,8/29,6	82,8/82,7	Negativo				Negativo				Negativo				Negativo
Meningoencefalite viral	254	Positivo	Positivo	●○	31,3	83	Negativo				Negativo				Negativo				Negativo
Meningoencefalite viral	261	Positivo	Negativo				Negativo				Negativo				Negativo				Negativo
Meningoencefalite viral	265	Positivo	Negativo				Negativo				Negativo				Negativo				Negativo
Meningoencefalite viral	269	Positivo	Negativo				Negativo				Negativo				Negativo				Negativo
Meningoencefalite viral	281	Positivo	Positivo	●●	30,3/30,2	82,6/82,7	Negativo				Negativo				Negativo				Negativo
Meningoencefalite viral	303	Positivo	Positivo	●●	27,8/28,0	83,2/83,3	Negativo				Negativo				Negativo				Negativo
Meningoencefalite viral	305	Positivo	Negativo				Negativo				Positivo	●○	32,6	79,6	Negativo				Negativo
Meningoencefalite viral	312	Positivo	Negativo				Positivo	●●	30,4/30,2	82,0/82,1	Negativo				Negativo				Negativo
Meningoencefalite viral	318	Positivo	Negativo				Negativo				Negativo				Negativo				Negativo
Meningoencefalite viral	321	Positivo	Negativo				Negativo				Negativo				Negativo				Negativo
Meningoencefalite viral	322	Negativo	Negativo				Negativo				Negativo				Negativo				Negativo
Meningoencefalite viral	323	Negativo	Negativo				Negativo				Positivo	●○	32,4	80,2	Negativo				Negativo
Meningoencefalite viral	329	Positivo	Negativo				Negativo				Negativo				Negativo				Negativo
Meningoencefalite viral	330	Positivo	Positivo	●●	25,6/25,9	83/83	Negativo				Negativo				Negativo				Negativo
Meningoencefalite viral	342	Negativo	Negativo				Negativo				Positivo	●○	32,1	80,1	Negativo				Negativo
Meningoencefalite viral	346	Positivo	Negativo				Negativo				Negativo				Negativo				Negativo
Meningoencefalite viral	348	Positivo	Negativo				Negativo				Negativo				Negativo				Negativo
Meningoencefalite viral	349	Positivo	Positivo	●●	26,1/26,2	83,8/83,9	Negativo				Negativo				Negativo				Negativo
Meningoencefalite viral	358	Positivo	Negativo				Negativo				Negativo				Positivo	●●	35,7/35,3	75,1/74,9	Negativo
Meningoencefalite viral	306	Positivo	Positivo	●○	30	83,6	Negativo				Negativo				Negativo				Negativo
Meningoencefalite viral	307	Positivo	Negativo				Negativo				Positivo	●○	31,8	80,2	Negativo				Negativo
Meningoencefalite viral	316	Positivo	Negativo				Negativo				Positivo	●●	31,3/33,1	79,7/79,9	Negativo				Negativo
Meningoencefalite viral	326	Positivo	Negativo				Negativo				Positivo	●○	31,5	80,2	Negativo				Negativo
Meningoencefalite viral	328	Positivo	Negativo				Negativo				Negativo				Negativo				Negativo
Meningoencefalite viral	344	Positivo	Negativo				Negativo				Negativo				Negativo				Negativo
Meningoencefalite viral	357	Positivo	Negativo				Negativo				Negativo				Negativo				Negativo
Meningite (Pneumococica)	333	Positivo	Negativo				Negativo				Negativo				Positivo	●●	30,7/31,3	74,4/74,4	Negativo
Meningite bacteriana	235	Positivo	Negativo				Negativo				Negativo				Negativo				Negativo
Meningite bacteriana	236	Positivo	Negativo				Negativo				Negativo				Negativo				Negativo
Meningite bacteriana	239	Positivo	Negativo				Negativo				Negativo				Negativo				Negativo
Meningite bacteriana	256	Positivo	Negativo				Negativo				Negativo				Negativo				Negativo
Meningite bacteriana	262	Positivo	Negativo				Negativo				Negativo				Negativo				Negativo
Meningite bacteriana	276	Positivo	Negativo				Negativo				Negativo				Negativo				Negativo
Meningite bacteriana	278	Positivo	Negativo				Negativo				Negativo				Negativo				Negativo
Meningite bacteriana	280	Positivo	Positivo	●○	29	84,1	Negativo				Negativo				Negativo				Negativo
Meningite bacteriana	282	Positivo	Negativo				Negativo				Negativo				Negativo				Negativo
Meningite bacteriana	290	Positivo	Negativo				Negativo				Negativo				Negativo				Negativo
Meningite bacteriana	298	Positivo	Negativo				Negativo				Positivo	●○	35,2	80,3	Negativo				Negativo
Meningite bacteriana	332	Positivo	Negativo				Negativo				Positivo	●○	30,5	80,2	Negativo				Negativo
Meningite bacteriana	336	Positivo	Negativo				Negativo				Negativo				Negativo				Negativo
Meningite bacteriana	339	Positivo	Negativo				Negativo				Negativo				Negativo				Negativo
Meningite bacteriana	343	Positivo	Negativo				Negativo				Negativo				Negativo				Negativo
Meningite bacteriana	345	Positivo	Negativo				Negativo				Negativo				Negativo				Negativo
Meningite bacteriana	347	Positivo	Negativo				Negativo				Negativo				Negativo				Negativo
Meningite bacteriana	359	Positivo	Negativo				Negativo				Negativo				Negativo				Negativo
Meningite bacteriana	360	Positivo	Negativo				Negativo				Negativo				Negativo				Negativo
Meningite bacteriana	226	Positivo	Negativo				Negativo				Negativo				Negativo				Negativo
Meningite bacteriana (Pneumococica)	251	Positivo	Positivo	●●	28,6/29,4	84,0/84,3	Negativo				Negativo				Negativo				Negativo

ANEXO I – RESULTADOS qPCR HIPII

Diagnóstico HIPII	Amostra	β -ACTINA	Enterovirus SYBR	Replicas	Ct	TM(°C)	HV-1/2 SYB	HHV3	Réplicas	Ct	TM(°C)	HHV5	DENVs
Neurossfilis	320	Negativo	Negativo				Negativo	Positivo	●○	31,4	79,9	Negativo	Negativo
Nistígio	327	Positivo	Negativo				Negativo	Positivo	●○	32,5	80,1	Negativo	Negativo
Otite	285	Positivo	Positivo	●●	29,3/29,9	83,4/83,6	Negativo	Positivo	●○	32,9	79,5	Negativo	Negativo
Pneumonia	308	Positivo	Negativo				Negativo	Negativo				Negativo	Negativo
Pneumonia, Insuficiência respiratória, Bronquite	325	Positivo	Positivo	●○	32	83,2	Negativo	Negativo				Negativo	Negativo
Septicemia	311	Positivo	Negativo				Negativo	Negativo				Negativo	Negativo
Septicemia	248	Positivo	Positivo	●●	29,1/27,9	83,9/83,9	Negativo	Negativo				Negativo	Negativo
Septicemia	270	Positivo	Negativo				Negativo	Negativo				Negativo	Negativo
Septicemia	283	Negativo	Negativo				Negativo	Positivo	●○	36,3	79,2	Negativo	Negativo
Septicemia	355	Positivo	Negativo				Negativo	Positivo	●○	30,8	80,1	Negativo	Negativo
Septicemia (Óbito)	299	Positivo	Positivo	●●	29,1/28,8	83,7/83,7	Negativo	Negativo				Negativo	Negativo
Septicemia (Óbito)	292	Positivo	Positivo	●●	29,8/29,3	83,9/83,7	Negativo	Positivo	●○	34,2,2	80,1	Negativo	Negativo
Septisemia	221	Positivo	Positivo	●○	32	84,3	Negativo	Negativo				Negativo	Negativo
Síndrome de ADEM	353	Positivo	Positivo	●○	32	84,2	Negativo	Positivo	●○	31,2	80,1	Negativo	Negativo
Síndrome de Guillain Barré	315	Negativo	Negativo				Negativo	Positivo	●○	31,5	80,1	Negativo	Negativo
Síndrome Pertusis, Crise convulsiva	324	Positivo	Negativo				Negativo	Negativo				Negativo	Negativo
Síndrome Respiratória	224	Negativo	Negativo				Negativo	Negativo				Negativo	Negativo
Síndrome Respiratória	252	Positivo	Positivo	●●	28,4/28,5	83,7/83,9	Negativo	Positivo	●○	33,2	80,9	Negativo	Negativo
Síndrome Respiratória	317	Positivo	Negativo				Negativo	Negativo				Negativo	Negativo
Anemia	240	Negativo	Positivo	●●	28,5 / 28,9	83,9/83,9	Negativo	Negativo				Negativo	Negativo
Ataxia	304	Negativo	Negativo				Negativo	Negativo				Negativo	Negativo
Bronquiolite, infecção respiratória, cardiopatia congênita	310	Negativo	Positivo	●○	32	83,7	Negativo	Positivo	●○	31,9	79,9	Negativo	Negativo
Bronquite	355	Positivo	Positivo	●○	33	83,6	Negativo	Positivo	●●	32,2/31,1	80,2/80,1	Negativo	Negativo
Bronquite	356	Negativo	Positivo	●○	34	82,9	Negativo	Negativo				Negativo	Negativo
Cefaléia	293	Positivo	Positivo	●●	25,6/25	83,7/83,7	Negativo	Negativo				Negativo	Negativo
Celulite da face	286	Positivo	Positivo	●●	32/31	82,8/83,9	Negativo	Negativo				Negativo	Negativo
Consulsão	225	Positivo	Negativo				Negativo	Negativo				Negativo	Negativo
Convulsão	255	Positivo	Positivo	●●	26,7/27,3	83,6/83,6	Negativo	Negativo				Negativo	Negativo
Convulsão	309	Positivo	Negativo				Negativo	Negativo				Negativo	Negativo
Gastroenterite	264	Positivo	Positivo	●●	26,4/26,6	83,6/83,9	Negativo	Negativo				Negativo	Negativo
Febre	222	Negativo	Negativo				Negativo	Negativo				Negativo	Negativo
Febre	350	Positivo	Positivo	●○	31	83,7	Negativo	Negativo				Negativo	Negativo
Gastroenterite	271	Positivo	Positivo	●○	32	83,6	Negativo	Negativo				Negativo	Negativo
Infecção do trato urinário, sepse	313	Positivo	Negativo				Negativo	Negativo				Negativo	Negativo
Infecção nas vias aéreas superiores	228	Negativo	Negativo				Negativo	Negativo				Negativo	Negativo
Tuberculose	230	Negativo	Negativo				Negativo	Negativo				Negativo	Negativo

Artigos Submetidos:**1-Fatal case of CNS infection caused by *Enterovirus A* in Brazil Brazil**

Danilo Bretas de Oliveira.¹, Guilherme Machado.²; Gabriel Magno de Freitas Almeida ¹, Paulo César Peregrino Ferreira.¹, Cláudio Antônio Bonjardim.¹, Giliane de Souza Trindade¹, Jônatas Santos Abrahão¹, Erna Geessien Kroon¹

2- Dengue virus 3 genotype I CNS infection with neurological manifestations in Brazil

Danilo Bretas de Oliveira.¹, Guilherme Machado.²; Gabriel Magno de Freitas Almeida ¹, Paulo César Peregrino Ferreira.¹, Cláudio Antônio Bonjardim.¹, Giliane de Souza Trindade¹, Jônatas Santos Abrahão¹, Erna Geessien Kroon¹

Artigos Publicados:**1- Outbreak of herpangina in the Brazilian Amazon in 2009 caused by Enterovirus B**

D. B. Oliveira • R. K. Campos • M. S. Soares • R. B. Barros • T. C. A. Batista
P. C. P. Ferreira • C. A. Bonjardim • G. S. Trindade • J. S. Abrahão •
Erna Geessien Kroon

2- Short Report: Group 1 Vaccinia virus Zoonotic Outbreak in Maranhão State, Brazil

Danilo Bretas Oliveira, Felipe Lopes Assis, Paulo Cesar Peregrino Ferreira, Cláudio Antônio Bonjardim, Giliane de Souza Trindade, Erna Geessien Kroon, and Jônatas Santos Abrahão*

3- Characterization of a New Vaccinia virus Isolate Reveals the C23L Gene as a Putative Genetic Marker for Autochthonous Group 1 Brazilian Vaccinia virus

Felipe L. Assis¹., Gabriel M. F. Almeida¹., **Danilo B. Oliveira**¹ , Ana P. M. Franco-Luiz¹ , Rafael K. Campos¹, Maria I. M. Guedes², Flávio G. Fonseca¹, Giliane S. Trindade¹., Betânia P. Drumond³, Erna G. Kroon¹, Jônatas S. Abrahão¹

ANEXO II –ARTIGOS

4- Protective Immunity and Safety of a Genetically Modified Influenza Virus Vaccine

Rafael Polidoro Alves Barbosa^{1,2}, Ana Paula Carneiro Salgado¹, Cristiana Couto Garcia^{3,4}, Bruno Galvão Filho¹, Ana Paula de Faria Gonçalves¹, Braulio Henrique Freire Lima^{3,4}, Gabriel Augusto Oliveira Lopes^{3,4}, Milene Alvarenga Rachid⁵, Andiara Cristina Cardoso Peixoto^{3,4}, **Danilo Bretas de Oliveira⁶**, Marco Antônio Ataíde², Carla Aparecida Zirke¹, Tatiane Marques Cotrim¹, Érica Azevedo Costa¹, Gabriel Magno de Freitas Almeida⁶, Remo Castro Russo^{3,4}, Ricardo Tostes Gazzinelli^{1,2,7}, Alexandre de Magalhães Vieira Machado¹

5- Fluconazole Alters the Polysaccharide Capsule of Cryptococcus gattii and Leads to Distinct Behaviors in Murine Cryptococcosis

Julliana Ribeiro Alves Santos¹, Rodrigo Assunção Holanda¹, Susana Frases^{2,3}, Mayara Bravim², Glauber de S. Araujo^{2,3}, Patrícia Campi Santos¹, Marliete Carvalho Costa¹, Maira Juliana Andrade Ribeiro¹, Gabriella Freitas Ferreira¹, Ludmila Matos Baltazar¹, Aline Silva Miranda⁴, **Danilo Bretas Oliveira¹**, Carolina Maria Araújo Santos¹, Alide Caroline Lima Fontes¹, Ludmila Ferreira Gouveia¹, Maria Aparecida Resende-Stoianoff¹, Jonatas Santos Abrahão¹, Antônio Luís Teixeira⁴, Tatiane Alves Paixão⁵, Danielle G. Souza¹, Daniel Assis Santos¹

6- A resourceful giant: APMV is able to interfere with the human type I interferon system

Lorena C.F. Silva^a, Gabriel M.F. Almeida^a, **Danilo B. Oliveira^a**, Fábio P. Dornas^a, Rafael K. Campos^a, Bernard La Scola^b, Paulo C.P. Ferreira^a, Erna G. Kroon^a Joñatas S. Abrahão^a,

7- Spread of Vaccinia Virus to Cattle Herds, Argentina, 2011

Ana Paula Moreira Franco-Luiz, Alexandre Fagundes-Pereira, Galileu Barbosa Costa, Pedro Augusto Alves, **Danilo Bretas Oliveira**, Cláudio Antônio Bonjardim, Paulo César Peregrino Ferreira, Giliane de Souza Trindade, Carlos Javier Panei, Cecilia Mónica Galosi, Jônatas Santos Abrahão, and Erna Geessien Kroon

8-Differential upregulation of human 2'5'OAS genes on systemic sclerosis:Detection of increased basal levels of OASL and OAS2 genes through a qPCR based assay

Gabriel Magno de Freitas Almeida¹ *, **Danilo Bretas de Oliveira¹** *, Lucas Moreira Botelho¹, Ludmila Karen dos Santos Silva¹ , Antônio Carlos Martins Guedes² , Flávia Patrícia Sena Teixeira Santos², Cláudio Antônio Bonjardim¹ , Paulo César Peregrino Ferreira¹ and Erna Geessien Kroon¹