DANIELA CARVALHO DOS SANTOS

**ESTABELECIMENTO DE MÉTODOS MOLECULARES PARA
APLICAÇÃO NO DIAGNÓSTICO RÁPIDO DE VÍRUS
NEUROTROPICOS**

Tese apresentada ao Instituto de Ciências
Biomédicas da Universidade de São Paulo,
para obtenção do Título de Doutor em
Ciências.

Área de concentração: Microbiologia.

Orientadora: Profa. Dra. Charlotte Marianna
Hársi

São Paulo
2009

Resumo

SANTOS, D. C. **Estabelecimento de métodos moleculares para aplicação no diagnóstico rápido de vírus neurotrópicos**. 2009. 165f. Tese (Doutorado em Microbiologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

Os herpesvírus (HHV), os enterovírus humanos (HEV) e os adenovírus (HAdV) são agentes causadores de inúmeras manifestações clínicas respiratórias, entéricas e sistêmicas e muitas vezes, atingem o Sistema Nervoso Central., ocasionando meningites e meningoencefalites. As reações de PCR e PCR em tempo real têm sido largamente utilizadas no diagnóstico molecular de infecções virais, devido à sensibilidade, rapidez no diagnóstico e praticidade. Neste estudo, técnicas moleculares foram utilizadas para detecção de HEV, HHV e HAdV em amostras de líquido. No período de janeiro de 2005 a março de 2007, 295 amostras de líquido foram colhidas de crianças e adultos com suspeita de meningite, meningoencefalite ou quadro de febre sem sinal localizatório. Dos três métodos de extração de ácidos nucleicos testados, o Protocolo C (kit DNA QiaBlood – Qiagen®) se mostrou mais sensível e específico. A reação de nested PCR detectou HEV em 28% das amostras, HSV em 4%, HHV-3 em 1%; HHV-4 em 0,3%, HHV-5 em 0,3%, HHV-6 em 0,7% e HAdV em 13%. Através da reação de PCR em tempo real os HEV foram detectados em 23,3% e HSV em 5,1%. Amostras com HEV detectadas pela reação de nested PCR foram cultivadas em linhagem RD. Das amostras positivas, apenas 50% apresentaram efeito citopático. Por neutralização, somente duas amostras foram claramente identificadas (HU 34- sorotipo Echovirus 6 e HU 102- sorotipo Coxsackievirus B). Os enterovírus detectados foram sequenciados para a determinação do sorotipo, de acordo com o protocolo descrito por Nix et al. (2006). O sorotipo Echovirus 18 foi o mais frequente (53%), seguido pelo sorotipo Coxsackievirus B5 (26%). Os sorotipos menos frequentes foram: Coxsackievirus B3, Echovirus 3, 6, 11, 13, 16 e 20. As técnicas de biologia molecular aplicadas na detecção de HEV, HHV e HAdV no líquido trazem grandes vantagens ao diagnóstico de doenças neurais graças à rapidez no diagnóstico, alta sensibilidade e especificidade. Estes aspectos são de grande importância na definição do diagnóstico e na subsequente escolha da terapêutica adequada.

Palavras-chave: Meningites virais. Enterovírus. Herpesvírus. Adenovírus. Técnicas moleculares. Diagnóstico rápido.

Abstract

SANTOS, D. C. **The integration of molecular methods into the rapid laboratorial diagnostic of neurotropic viruses.** 2009. 165p. Thesis (Microbiology PhD) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

Human herpesviruses (HHV), enteroviruses (HEV), and adenoviruses (HAdV) are causative agents of several respiratory, enteric, and systemic infections including those of the Central Nervous System. PCR and real-time PCR assays have been widely used in molecular diagnosis of viral infections, due to its sensitivity, rapid diagnosis, and practicality. In this study molecular techniques were used to detect HEV, HHV, and HAdV in cerebrospinal fluid samples (CSF). From January 2005 to March 2007, 295 CSF samples were collected from children and adults with suspected meningitis, meningoencephalitis, or unknown fever. Three methods for nucleic acid extraction were tested. Protocol C (DNA Qiablood kit - Qiagen®) was more sensitive and specific; and, therefore was the chosen method for this study. Nested PCR assays detected HEV in 28% of the samples, followed by HAdV (16%), HSV (4%), HHV-3 (1%), HHV-6 (0.7 %), HHV-4 (0.3%), and HHV-5 (0.3%). The real time PCR assay detected HEV in 23.3% of the samples and HSV in 5.1%. HEV positive samples were cultivated in RD cells and only 50% of the samples positive by PCR showed cytopathic effect. A clear serotype was identified for only two samples when a neutralization test was applied (HU 34 – serotype Echovirus 6 and serotype HU 102 - Coxsackievirus B). Detected enteroviruses were sequenced to obtain the serotype. Echovirus 18 was the most frequent serotype identified (53%), followed by serotype Coxsackievirus B5 (26%). The less frequent serotypes were: Coxsackievirus B3, echovirus 3, 6, 11, 13, 16, and 20. Molecular biology techniques applied to the detection of HEV, HHV, and HAdV in CSF bring major benefits to the diagnosis of neural diseases due to their rapidity, high sensitivity, and specificity. These aspects are of great importance for effective diagnostic procedures and appropriate therapy.

Key words: Viral meningitis. Enterovirus. Herpesvirus. Adenovirus. Molecular techniques. Rapid diagnosis.

1 Introdução

1.1 Histórico das meningites

As infecções do Sistema Nervoso Central (SNC) atingem anualmente milhões de pessoas em todo o mundo, sendo esta patologia associada a elevados índices de mortalidade e morbidade (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE - OMS, 2007).

Apesar de existirem barreiras naturais, eventualmente, agentes microbianos invadem o SNC, levando a patologias de grande relevância em saúde pública.

As infecções no SNC podem ocorrer através da passagem de microrganismos pela barreira hematoencefálica, causando encefalites, ou pela invasão através do fluido cerebroespinal., ocasionando as meningites (CHADWICK, 2005).

Conhecida desde a antiguidade, quando alguns médicos importantes da história, como Hipócrates, Galeno e outros, já faziam referência à mesma, foi apenas em meados do século XVII que Thomas Willis fez a primeira descrição detalhada da meningite na sua forma epidêmica (SCHREIBER e MATHYS, 1991). Entretanto, somente dois séculos mais tarde, em 1887, é que o primeiro agente patogênico desta enfermidade, a *Neisseria meningitidis*, foi isolado (SCHREIBER e MATHYS, 1991). A partir de então, os demais agentes etiológicos bacterianos, foram sendo gradualmente identificados.

Apesar dos conhecimentos adquiridos ao longo dos séculos, bem como do desenvolvimento de vacinas e surgimento de medicamentos mais eficazes, as meningites bacterianas continuam preocupando devido à sua, ainda considerável, morbidade e mortalidade.

Décadas mais tarde, em 1925, surgiu o termo meningite asséptica, descrito por Wallgren, para designar aquelas infecções com evolução clínica mais branda. Esta denominação foi modificada mais tarde, incluindo-se todos os casos de meningite com líquido cefalorraquidiano (LCR) claro nos quais nenhum agente tenha sido detectado pelas técnicas rotineiras de laboratório (CAVALCANTI, 1997). Christie, entretanto, preferiu designá-las por meningite linfocitária, uma vez que a principal característica observada neste tipo de meningite é o predomínio de linfócitos no LCR (CAVALCANTI, 1997).

1.2 Epidemiologia

Infecções do Sistema Nervoso Central., com acometimento das meninges, podem ser causadas por múltiplas etiologias e caracterizadas por: febre, cefaléia, vômitos, sinais de irritação meníngea e alterações no líquido cefalorraquidiano. Seu prognóstico depende do diagnóstico precoce e início imediato do tratamento.

Em Saúde Pública, duas etiologias são de especial importância: Meningococo (*Neisseria meningitidis*) e bacilo da tuberculose (*Mycobacterium tuberculosis*). Outras etiologias podem ter importância maior em determinados momentos, devido ao aumento do número de casos ou aumento da letalidade, tal como a meningite por *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* tipo b, e as meningites virais, pela magnitude de sua ocorrência e relevância social (ROOS, 2005).

As meningites têm distribuição mundial e sua expressão epidemiológica varia de região para região, dependendo da existência de aglomerados populacionais, fatores climáticos, grau de virulência dos agentes, falta de acesso à infra-estrutura adequada de serviços de saúde.

As meningites infecciosas são um importante problema de saúde pública mundial e, no Brasil, constituem um grupo de doenças cuja notificação é compulsória (CENTRO DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA - CVE, 2008). As figuras a seguir representam o número de casos (morbidade) de meningites, de todos os tipos, registrados no Brasil e no estado de São Paulo, por faixa etária.

Entre os anos de 2003-2007 foram registrados 81.701 casos de meningites de todos os tipos no Brasil, com uma prevalência de 8 casos a cada 100.000 habitantes de todas as faixas-etárias, por ano. Os casos de meningite bacteriana foram os mais frequentes, representando 46% das internações por meningite. Entretanto, as meningites virais, representaram 35% dos casos (Figura 1) (DEPARTAMENTO DE INFORMÁTICA DO SISTEMA ÚNICO DE SAÚDE - DATASUS, 2009; INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA - IBGE, 2009).

A figura 2 representa o número de casos por meningite de todos os tipos no Brasil, em menores de 15 anos. Os casos de meningite bacteriana perfazem 46% das internações, enquanto que as meningites virais representam 38% dos casos.

Comparando-se os dados representados nas figuras 1 e 2 verifica-se que as porcentagens de meningite bacteriana ou viral., em todas as faixas etárias, são equivalentes,

entretanto, a frequência de meningites de todos os tipos registrados em menores de 15 anos representam 63% de todos os registros de meningite, mostrando a importância destas infecções nesta faixa-etária, em todo o Brasil.

Figura 1. Número de casos de morbidade por meningites de todos os tipos no Brasil, registradas entre os anos de 2003 e 2007, por internação- todas as faixas-etárias.
Fonte: DATASUS, 2008

Figura 2. Número de casos de morbidade por meningites de todos os tipos no Brasil, registradas entre os anos de 2003 e 2007, por internação- menores de 15 anos.
Fonte: DATASUS, 2008

No estado de São Paulo, as meningites bacterianas representaram 46% de todos os casos registrados de morbidade por meningite nos últimos 5 anos, em todas as faixas- etárias. As meningites virais representaram, sob estas mesmas condições, 37%. O total de casos de meningite no estado de São Paulo, no mesmo período, foi de 20.551, o que representa um

índice de prevalência de 10,3 casos a cada 100.000 habitantes por ano (DATASUS, 2009; IBGE, 2009).

Em menores de 15 anos, o Ministério da Saúde registrou nos últimos 5 anos, 14.639 casos de encefalite viral e meningites de todos os tipos, no estado de São Paulo. Destes, as meningites bacterianas correspondem a 42% dos casos, enquanto que as virais a 38% (Ministério da Saúde, DATASUS, 2009).

Nos últimos dois anos observa-se um aumento no número de casos de meningite, com uma especial atenção para as meningites virais em menores de 15 anos que saltou de 915 casos em 2006 para 1619 no ano seguinte, superando a frequência dos casos de meningite bacteriana no estado de São Paulo (Figura 4).

Figura 3. Número de casos de morbidade por meningites de todos os tipos no estado de São Paulo, registradas entre os anos de 2003 e 2007, por internação- todas as faixas-etárias.
Fonte: DATASUS, 2008.

Figura 4. Número de casos de morbidade por meningites de todos os tipos no estado de São Paulo, registradas entre os anos de 2003 e 2007, por internação- em menores de 15 anos.
Fonte: DATASUS, 2008.

De todas as infecções agudas que acometem o SNC, as virais representam a grande maioria, destacando-se, principalmente, as meningites, as quais correspondem a mais de 70% de todas as causas de meningites linfocitárias (CAVALCANTI, 1997).

Desde a identificação dos vírus como agentes das meningites, têm-se observado que, apesar das baixas taxas de mortalidade, estas podem produzir uma elevada morbidade, assim como apresentar um potencial de seqüelas a longo prazo em alguns indivíduos afetados, especialmente crianças, contrariando assim, a noção do denominado “curso benigno”, usado por muito tempo (CAVALCANTI, 1997).

A meningite viral é considerada, em todo o mundo, uma patologia importante no número de internações, com uma incidência aproximada de 5 a 15 casos por 100.000 habitantes por ano no Reino Unido. A incidência do principal patógeno causador de meningites virais, os enterovírus, certamente é subestimada. As demais causas de meningite e infecções do SNC, herpes simples e meningoencefalites causadas por flavivírus, são as mais importantes em termos de mortalidade e morbidade (CHADWICK, 2006).

A maioria dos vírus causadores de meningites é sazonal e com distribuição geográfica específica, sendo assim, torna-se importante a pesquisa de dados relacionados à trajetória do paciente (ROOS, 2005). O quadro 1 apresenta os principais vírus causadores de meningite e alguns dados epidemiológico.

Quadro 1: Etiologia, epidemiologia e manifestações clínicas dos principais agentes virais causadores de meningite.

Agente etiológico	Epidemiologia	Manifestações clínicas
Enterovírus	Comum em crianças. Alta incidência do verão e outono em países de clima temperado.	Com curso freqüentemente benigno, mas com mortalidade significativa em neonatos, imunodeprimidos e em associação com infecções por enterovírus 71.
Vírus da Caxumba	Atinge com freqüência a população não imunizada. Os homens são mais afetados que as mulheres.	Aumento da glândula salivar em 50% dos casos.
Vírus West Nile	Infecção transmitida por um mosquito. Presente em países de clima temperado com incidência marcante no final do verão.	Fatal em 4-13% dos casos. Atinge com maior freqüência idosos, imunodeprimidos e diabéticos. Cinquenta por cento dos casos de encefalite apresentam lesão neurológica ou psíquica.
Vírus da encefalite japonesa tipo B	Transmitida pela picada de um mosquito, é predominante no Sudeste da Ásia. Os porcos são os principais hospedeiros. As infecções são comuns nas estações chuvosas e em áreas rurais. É freqüente em crianças e adultos não imunizados.	Índice de mortalidade em torno de 20-30%, com lesão neurológica a longo prazo.
Vírus da encefalite Tick-borne	Presente principalmente na Europa e Ásia. Comum na primavera e início do verão.	De 1-20% dos casos são fatais. Com maior incidência no extremo leste. Possui progressão prolongada em comparação com outras encefalites virais.
Human immunodeficiency vírus (HIV)	Comum em 5 a 10 % dos pacientes que apresentaram soro conversão ou infecções crônicas	Complicações são raras em infecção precoce por HIV. Infecção crônica está associada à demência. A soroconversão pode também incluir erupção macupapular, febre, mialgia e linfadenopatia.
Herpes simplex vírus (HHV-1 e HHV-2)	Ambos causam infecções esporádicas. HHV-1 é mais associados a encefalites e HHV-2 com meningites	Mortal em 70% das encefalites não tratadas. Encefalites tipicamente afetam o lóbulo temporal. Muitos casos por HHV-2 não estão associados a herpes genital. Podem ser a causa de meningites recorrentes (meningite de Mollaret).
Citomegalovírus	Comum em pacientes imunodeprimidos	Casos de meningite podem ser acompanhados de mononucleose ou retinites.
Vírus da Varicela – zoster	Em raras complicações de catapora ou <i>shingles</i> .	Algumas vezes, os casos de meningite podem não ser acompanhados de vesículas. Pode acompanhar episódio de zoster em idosos ou encefalite crônica difusa em imunodeprimidos.

Adaptado de Roos, 2005.

1.3 Etiologia das meningites virais

1.3.1 Família *Picornaviridae*

A família *Picornaviridae* é composta por nove gêneros: *Enterovirus*, *Aphthovirus*, *Cardiovirus*, *Hepatovirus*, *Parechovirus*, *Rhinovirus*, *Erbovirus*, *Kobovirus* e *Teschovirus*, porém somente os seis primeiros gêneros citados infectam humanos (PALLANSCH e ROOS, 2001).

Os picornavírus são de simetria icosaédrica com diâmetro aproximado de 30nm, não envelopados e com genoma de RNA fita única, polaridade positiva. As partículas são resistentes a solventes orgânicos e pH baixo, com exceção dos *Rhinovirus* e *Aphthovirus*.

O capsídeo dos picornavírus é composto por quatro proteínas estruturais: VP1, VP2, VP3 e VP4, exceto os *Parechovirus* que possuem somente três polipeptídeos: VP1, VP2 e VP0. As proteínas VP1, VP2 e VP3 são parcialmente expostas na superfície do virion, enquanto que a VP4 está voltada para a parte interna (MUIR et al., 1998). Estas proteínas de superfície são os principais antígenos, capazes de induzir a produção de anticorpos neutralizantes.

A estrutura icosaédrica desta família é composta de 20 faces triangulares e 12 vértices. Cada uma das 20 faces é composta por 60 subunidades protéicas.

Figura 5. Esquema de uma partícula de Picornavírus. Região em azul: VP1; verde: VP2; amarelo: VP3.

Fonte: http://www.virology.net/Big_Virology/BVRNAPicorna.html

O tamanho do genoma dos picornavírus varia de 7.209 a 8.450 bases. A região 5'NTR (5' *nontranslated region*) é a maior e altamente estruturada, com 624 a 1.199 nucleotídeos. Esta região contém seqüências que controlam a replicação e transcrição do genoma a partir da

conecção com ribossomos. Muir e colaboradores (1998) mostraram que alterações pontuais nesta região resultam em modificações no fator de virulência, morfologia e sensibilidade a temperatura. A região 5'NTR do genoma é ligada covalentemente a uma proteína denominada VPg (*virion protein, genome linked*). Formada por apenas 22-24 aminoácidos, a proteína Vpg é codificada por um único gene em todos os picornavírus. Sua remoção da fita de RNA não interfere na infectividade. Como está presente no início da replicação do RNA, estudos sugerem que ela possa ter a função de um iniciador para esta síntese (DI MMOCK et al., 2007; PALLANSCH e ROOS, 2001).

A região 3'NTR é menor com cerca de 47 nucleotídeos. Esta região contém uma estrutura secundária que está relacionada ao controle da síntese do RNA viral. Ambas as moléculas de RNA e RNAm possuem uma cauda poli (A) ligada a região 3'NCR. O tamanho da cauda poli (A) varia de 35 a 100 nucleotídeos. Estudos recentes mostram que sua função pode estar relacionada à infectividade viral (PALLANSCH e ROOS, 2001).

1.3.1.1 Ciclo de replicação

A replicação dos picornavírus ocorre no citoplasma das células-alvo. Primeiramente, a partícula liga-se ao receptor celular. O RNA viral é então exposto, através de um processo que envolve mudanças estruturais no capsídeo. Uma vez dentro do citoplasma, a fita positiva de RNA viral é transcrita em proteínas essenciais para a replicação e produção de novas partículas (PALLANSCH e ROOS, 2001).

As proteínas virais são sintetizadas a partir de uma poliproteína precursora, a qual posteriormente é clivada logo no início da replicação. Dentre as proteínas que são sintetizadas temos a RNA polimerase RNA-dependente e proteínas acessórias utilizadas na síntese do genoma viral. O primeiro passo para replicação do genoma é copiar a fita positiva de RNA em fita negativa intermediária. Esta etapa é seguida pela produção de novas fitas positivas. Este evento ocorre em pequenas vesículas que se acumulam no citoplasma da célula hospedeira, sendo estas vesículas o local de síntese de RNAm. Quando há um número suficiente de proteínas estruturais já sintetizadas, inicia-se a montagem do capsídeo. A proteína de superfície precursora da P1 é clivada para formar um promotor imaturo, o qual se organiza em pentâmeros. Esta organização somada à síntese de fitas positivas de RNA, leva a formação da partícula infecciosa (RICANIELLO, 2001).

Figura 6. Organização do genoma dos picornavírus. Regiões codificantes são indicadas pelas setas. Adaptado de PALLANSCH & ROOS, 2001.

O ciclo de replicação de uma única partícula viral pode levar de 5 a 10 horas no entanto, muitas variáveis estão envolvidas, tais como: particularidades da cepa, temperatura, pH e célula hospedeira.

Muitos picornavírus são liberados das células através da lise celular levando-as a morte. Outros, como o vírus da hepatite A, são liberados sem visualização de efeito citopático (PALLANSCH e ROOS, 2001).

Figura 7. Ciclo de replicação dos picornavírus.

Fonte: http://www.nature.com/nrmicro/journal/v2/n6/box/nrmicro906_BX1.html

Os picornavírus utilizam uma ampla variedade de proteínas de superfície como receptores. A natureza destas proteínas era obscura até o final dos anos 80, quando os receptores para poliovírus e rinovírus foram identificados. Muitas espécies de picornavírus compartilham receptores celulares. A proteína de superfície CD55 é o receptor para Coxsackievirus A e B, Echovirus e Enterovirus 70 (PALLANSCH e ROOS, 2001).

Mais recentemente, Bergelson e colaboradores (1997) isolaram um receptor comum para Coxsackievirus B e Adenovírus, nomeada de CAR (Coxsackievirus and Adenovírus Receptor). O CAR é uma proteína de 46 kDa, membro da superfamília das imunoglobulinas. Este é um componente das proteínas de adesão celular (*tight junctions*), localizado, sobretudo nas membranas basolaterais de células epiteliais, mantendo a integridade juncional do epitélio (COHEN, 2001).

O CAR é principalmente expresso em linhagens epiteliais, sendo detectado no fígado, rim, pulmão, cérebro, coração, cólon, testículo, próstata e pâncreas, mas não em músculo esquelético, baço, ovário, timo e placenta. Sua expressão também é detectada em células hematopoiéticas, porém em baixos níveis (PHILIPSON e PETTERSON, 2004).

Para alguns picornavírus, um único tipo de receptor é suficiente para a entrada na célula-alvo, como ocorre com poliovírus e rinovírus. Para outros, é necessário uma segunda molécula ou

um co-receptor para a entrada na célula. O Coxsackievirus 21, por exemplo, utiliza como receptor a proteína celular CD55 juntamente com a proteína de adesão ICAM-1 para a entrada na célula (PALLANSCH e ROOS, 2001).

Entre os membros da família *Picornaviridae*, as quatro proteínas do capsídeo são organizadas de forma similar, porém a arquitetura da superfície varia. Estas diferenças estão relacionadas à antigenicidade e interação com receptores celulares. O capsídeo dos Poliovírus, Rhinovírus e Coxsackievírus possuem cânions na superfície, que têm mostrado estar relacionados aos sítios de interação com os receptores celulares (MUIR, 1997).

1.3.1.2 Gênero *Enterovirus*

1.3.1.2.1 Histórico

Em 1948 Dalldorf e Sickles estudavam a poliomielite em macacos, mas estavam em busca de um animal ideal para a inoculação de seus espécimes. Foi então que inocularam suspensões de fezes de dois casos de suspeita de poliomielite em camundongos recém-nascidos. O animal apresentou paralisia, mas não devido ao poliovírus e sim a um novo grupo de vírus que mais tarde foi nomeado Coxsackievírus fazendo-se referência à cidade natal do paciente infectado (PALLANSCH e OBERSTE, 2004; PALLANSCH e ROOS, 2001).

Muitos outros vírus pertencentes a este grupo foram posteriormente isolados em camundongos. A partir destes isolamentos, os cientistas observaram diferenças na patogenicidade com o desenvolvimento de paralisia flácida ou espástica. Esta diferença em relação à manifestação clínica da doença dividiu tais vírus em grupos A (paralisia flácida) e B (paralisia espástica). A descoberta destes agentes levou os cientistas a concluir que alguns casos de paralisia não paralítica ou meningite foram provocados por estes novos vírus (PALLANSCH E OBERSTE, 2004).

Estudos feitos em cultura de células levaram ao isolamento de outros enterovírus a partir de fezes de pacientes com meningite asséptica ou pacientes assintomáticos. Estes isolados eram capazes de provocar efeito citopático, mas não provocavam a morte de camundongos recém-nascidos quando inoculados. Como estas cepas foram isoladas de fezes e provocavam efeito citopático, mas não estavam relacionadas patologia definida, estes vírus foram nomeados de enteric cythopathic human orphan viruses, os quais posteriormente foram chamados de echovírus. As semelhanças entre coxsackievírus, echovírus e poliovírus os

agruparam no gênero *Enterovirus* da família *Picornaviridae* (PALLANSCH E OBERSTE, 2004; PALLANSCH e ROOS, 2001).

1.3.1.2.2 Classificação

Segundo o Comitê Internacional de Taxonomia dos Vírus, durante os últimos 20 anos, mais de 68 variedades antigênicas distintas de enterovírus foram descritas (INTERNATIONAL COMMITTEE ON TAXONOMY OF VIRUSES- ICTV, 2009a). Os isolados foram numerados seqüencialmente conforme foram sendo identificados, dentro dos três grupos: Coxsackievirus A, Coxsackievirus B ou Echovirus. Posteriormente, descobriu-se que cepas isoladas de um mesmo sorotipo poderiam ter diferentes graus de patogenicidade em camundongos. Usando este esquema de classificação, alguns isolados de um mesmo sorotipo foram classificados como Coxsackievirus e outros como Echovirus. Desde 1967, todos os *Enterovirus* isolados têm sido classificados dentro do novo grupo: Enterovirus e numerados seqüencialmente começando com Enterovirus 68 (KHETSUARIANI et al., 2006; PALLANSCH e ROOS, 2001).

Atualmente, os novos enterovírus não-polio são identificados por técnicas moleculares, e acredita-se que muitos sorotipos ainda podem ser descobertos. O seqüenciamento do genoma dos enterovírus não-polio mostra uma grande similaridade com a organização genética dos poliovírus (PALLANSCH e ROOS, 2001).

A caracterização molecular do echovirus 22 e 23 mostrou que estes dois sorotipos são distintos dos demais *Enterovirus*. Estes achados levaram a classificação destes em um novo gênero de picornavírus, o *Parechovirus*, nomeando-os como *Human Parechovirus* 1 e 2, respectivamente (KHETSUARIANI et al., 2006).

Estas análises moleculares levaram a uma reclassificação dos enterovírus humanos em cinco espécies, de A-D (HEV-A a HEV-D) e *Poliovirus* (PV) (KHETSUARIANI et al., 2006; PALLANSCH e ROOS, 2001). Os sorotipos e sua classificação dentro de cada espécie são mostrados no quadro abaixo:

Quadro 2: Espécies e sorotipos pertencentes ao gênero *Enterovirus*, segundo ICTV, 2008.

<i>Espécies pertencentes ao gênero Enterovirus</i>				
Sorotipos das espécies de <i>Enterovirus</i>	<i>Human enterovirus A</i>	<i>Human Enterovirus B</i>	<i>Human Enterovirus C</i>	<i>Human Enterovirus D</i>
	<i>Human coxsackievirus</i> A 2-8	<i>Human coxsackievirus</i> B 1-B6	<i>Human coxsackievirus</i> A 1	<i>Human enterovirus 68</i>
	<i>Human coxsackievirus</i> A 10	<i>Human coxsackievirus</i> A 9	<i>Human coxsackievirus</i> A 11	<i>Human enterovirus 70</i>
	<i>Human coxsackievirus</i> A 12	<i>Human echovirus</i> 1-7	<i>Human coxsackievirus</i> A 13	
	<i>Human coxsackievirus</i> A 14	<i>Human echovirus</i> 9	<i>Human coxsackievirus</i> A 17	<i>Poliovirus</i>
	<i>Human coxsackievirus</i> A 16	<i>Human echovirus</i> 11-21	<i>Human coxsackievirus</i> A 19-22	<i>Human poliovirus 1</i>
	<i>Human enterovirus</i> 71	<i>Human echovirus</i> 27-27	<i>Human coxsackievirus</i> A 24	<i>Human poliovirus 2</i>
	<i>Human enterovirus</i> 76	<i>Human echovirus</i> 29-33		<i>Human poliovirus 3</i>
	<i>Human enterovirus</i> 89	<i>Human enterovirus</i> 69		
	<i>Human enterovirus</i> 90	<i>Human enterovirus</i> 73-75		
	<i>Human enterovirus</i> 91	<i>Human enterovirus</i> 77-78		
		<i>Human enterovirus</i> 79-88		
		<i>Human enterovirus</i> 100-101		

1.3.1.2.3 Epidemiologia

Devido à tendência à erradicação mundial da poliomielite, o nicho ecológico dos poliovírus tem se tornado extremamente restrito. Contudo, observa-se um aumento significativo na circulação, detecção, identificação e evolução de enterovírus não-pólio e o surgimento de surtos provocados por cepas epidêmicas e emergentes (KHETSURIANI et al., 2006).

Os enterovírus humanos são responsáveis por uma variedade de doenças e manifestações clínicas, tais como: miocardites, exantemas, conjuntivite hemorrágica, meningites, encefalites, diabetes, dentre outras (CHADWICK, 2006).

Um dos fatores mais importantes na determinação da gravidade da doença e no aparecimento de surtos epidêmicos é a idade do hospedeiro. Grupos de faixas-etárias diferentes apresentam distinta susceptibilidade à infecção, severidade da doença e prognóstico (PALLANSCH e ROOS, 2001).

Os enterovírus podem apresentar-se na forma epidêmica, ou em casos esporádicos. Nas regiões temperadas, apresenta maior incidência no verão e início da primavera, porém em países tropicais, que não apresentam estações bem definidas, não se evidenciou ainda qualquer padrão sazonal. Dados do *Centers for Diseases Control and Prevention* (CDC) dos Estados Unidos da América, mostram que por ano, são estimados cerca de 10-15 milhões de casos de infecções sintomáticas naquele país (KHETSURIANI et al., 2006).

Os enterovírus podem ser isolados, com altos títulos, de fezes e secreções respiratórias. Os modos de transmissão destes vírus variam de acordo com a espécie e meio ambiente embora a transmissão fecal-oral e o contato com secreções respiratórias sejam consideradas as formas mais importantes (PALLANSCH e OBERSTE, 2004).

A epidemiologia dos enterovírus está diretamente relacionada a variações do sorotipo, tempo, localização geográfica e doença. O monitoramento de infecções mostra que estas possuem diferentes manifestações clínicas e distribuição temporal. Através da vigilância de infecções é possível monitorar o grupo ou sorotipo em circulação, bem como suas manifestações clínicas (KHETSURIANI et al., 2006; CHAMBON et al., 2001).

Para muitos sorotipos, o aumento da atividade está relacionado ao surgimento de novas linhagens, que muitas vezes substituem aquela que estava anteriormente em evidência. A análise de dados epidemiológicos e de manifestações clínicas relacionados aos sorotipos mostra que muitas das mortes estão associadas aos sorotipos Coxsackievirus B4 e *Parechovirus 1*, por outro lado, infecções por echovirus 9 têm baixos índices de mortalidade (KHETSURIANI et al., 2006).

As meningites virais causadas por *Enterovirus* são relatadas, com grande frequência, em diversos países do mundo, atingindo principalmente a faixa etária mais jovem e de classe socioeconômica baixa, estando diretamente relacionadas às condições sanitárias precárias e às grandes aglomerações populacionais, que favorecem a transmissão por via fecal-oral. Dados epidemiológicos mostram que os *Enterovirus* são responsáveis por cerca de 85% de todos os

casos de meningite asséptica nos quais um agente etiológico é identificado (CINQUE et al., 2003; MENDONZA et al., 2006; AKIYOSHI et al., 2007; IWAI et al., 2006; STELLRECHT et al., 2002).

Muitos sorotipos de enterovírus foram descritos como responsáveis por surtos ou casos esporádicos de meningites assépticas. Dentre os agentes etiológicos mais comuns estão os Coxsackievirus B dos sorotipos 1 a 6, Coxsackievirus A sorotipos 7, 9 e 24 e os Echovirus pertencentes aos sorotipos 4, 6, 9, 16 e 30 (CASAS et al., 1997; HOSOYA et al., 1998; CHAMBON et al., 2001).

Gomes et al., em estudos realizados no estado do Pará nos anos de 1995 e 1996, detectaram enterovírus em 60% dos casos de desordens neurológicas dos quais 33% desenvolveram meningite asséptica. Mais recentemente, em um estudo epidemiológico sobre infecções no Sistema Nervoso realizado em Salvador-Bahia, Silva et al. (2002) verificaram que 37,7% dos casos de meningite asséptica tiveram como agente etiológico os enterovírus, sendo identificado Echovírus 4 em 27,2% das infecções.

Com o advento da vacinação antipoliomielítica, a participação dos *Poliovirus* na gênese das meningites assépticas passou a ser pouco freqüente, sendo verificado em 1 a 2% dos casos. Contudo, os enterovírus não-polio vêm adquirindo importância crescente como agentes das meningites virais (CHERRY, 1994; ROTBART, 1995).

1.3.2 Herpesvírus

Os herpesvírus são largamente distribuídos na natureza, sendo a maioria das espécies animais hospedeira de algum destes agentes.

Poucos herpesvírus infectam naturalmente mais do que uma espécie animal., sendo que, o número de herpesvírus identificados até o momento ultrapassa 130 (ICTV, 2009b).

1.3.2.1 Estrutura viral

O genoma dos herpesvírus é composto de DNA de fita dupla, circundado pelo capsídeo icosaédrico contendo 162 capsômeros. Os herpesvírus são dotados de envoltório derivado da membrana nuclear. A presença dos lipídios de membrana torna estes agentes sensíveis à solventes de lipídeos e detergentes (ROIZMAN e PELLETT, 2001).

Entre o capsídeo e a membrana há uma região chamada de tegumento. Estudos realizados com microscopia eletrônica mostram que o tegumento é uma estrutura organizada de aparência fibrosa que algumas vezes se distribui assimetricamente. Evidências sugerem que o tegumento é originário do próprio vírus e não do hospedeiro (ROIZMAN e PELLETT, 2001).

O tamanho do capsídeo dos herpesvírus varia de 120 a 300 nm. Esta variação está relacionada à espessura do tegumento e às características do envelope. Envelopes intactos são impermeáveis e geralmente mantêm o formato esférico do virion (ROIZMAN e PELLETT, 2001).

Figura 8. Partícula de herpesvírus. A: Eletro micrografia da partícula viral e seu envelope. B: Desenho esquemático da partícula viral e núcleo.

Fonte: www.virology.net

O DNA é do tipo linear, dupla fita. O tamanho do genoma varia de 120 a 250 K pb. A variação de tamanho encontrada nas diferentes espécies está relacionada com a presença de seqüências repetitivas que variam muito quanto ao número de cópias (ROIZMAN e PELLETT, 2001).

Baseado nas propriedades biológicas das cepas, os membros da família *Herpesviridae* foram classificados em três subfamílias: *Alphaherpesvirinae*, *Betaherpesvirinae* e *Gammaherpesvirinae*.

- Subfamília *Alphaherpesvirinae*

Os seus membros foram classificados com base na grande variedade de hospedeiros, ciclo reprodutivo relativamente pequeno, rápida proliferação em cultura de células, eficiente destruição das células infectadas e capacidade de estabelecer infecção primária latente não exclusivamente em gânglios sensoriais. A Subfamília *Alphaherpesvirinae* é composta pelos

gêneros *Simplexvirus*, *Varicellovirus*, *Mardivirus*, *Iltovirus*. Os dois primeiros infectam seres humanos e animais, os demais são patógenos de aves (ROIZMAN e PELLETT, 2001).

- Subfamília *Betaherpesvirinae*

Os membros desta subfamília possuem pouca diversidade de hospedeiros. O ciclo reprodutivo é longo e o processo de infecção em cultura de células é lento. Células infectadas se apresentam maiores que as normais, característica que recebe o nome de citomegalia. Os vírus podem se manter sob a forma latente em glândulas secretoras, linfócitos, rins e outros tecidos. A subfamília *Betaherpesvirinae* é composta pelos gêneros: *Cytomegalovirus*, *Muromegalovirus*, *Roseolovirus*, onde os *Muromegalovirus* infetam apenas ratos e camundongos, os *Cytomegalovirus* são patógenos de humanos e animais e *Roseolovirus* infectam apenas humanos (ROIZMAN e PELLETT, 2001).

- Subfamília *Gammaherpesvirinae*

Possuem pouca variedade de hospedeiros. *In vitro*, os membros desta subfamília replicam em células linfoblásticas, podendo causar infecção lítica em alguns tipos celulares do epitélio e em células fibroblásticas. Os vírus desta subfamília são específicos de linfócitos T ou B. Vírus latente pode ser encontrado em tecido linfóide. Os gêneros *Lymphocryptovirus* e *Rhadinovirus* pertencentes a esta subfamília e infetam animais e seres humanos (ROIZMAN e PELLETT, 2001).

1.3.2.2 Replicação

A replicação dos herpesvírus é iniciada pela interação de glicoproteínas virais com receptores de superfície celular. O tropismo de alguns herpesvírus é restrito devido à expressão de receptores tecido-específicos. O núcleo capsídeo é liberado no citoplasma através da fusão do envoltório com a membrana plasmática. Enzimas e fatores de transcrição são transportados para o interior da célula. O núcleo capsídeo fixa-se à membrana nuclear e libera o genoma no núcleo, onde é transcrito e replicado (WAGNER e HEWLETT, 2004).

A transcrição do genoma viral e a síntese de proteínas virais ocorrem de maneira coordenada e regulada em três fases: em primeiro lugar, síntese de proteínas precoces imediatas (Alfa) que consistem em proteínas de ligação do DNA, importantes para a regulação da transcrição gênica. Em seguida, é realizada a síntese de proteínas precoces

(Beta), que consistem em fatores de transcrição e enzimas, incluindo a DNA polimerase. Por fim, ocorre a síntese de proteínas tardias (Gama), constituída principalmente de proteínas estruturais (ROIZMAN e PELLETT, 2001).

O genoma viral é transcrito por RNA-polimerase celular DNA-dependente, e regulado por fatores nucleares da célula hospedeira. A inter-relação destes fatores determina se a infecção será lítica, persistente ou latente. As células que promovem infecção latente restringem a transcrição a genes específicos, sem replicação do genoma.

A replicação é realizada pela DNA polimerase codificada pelo vírus. A progressão para genes precoces e tardios resulta em morte celular e infecção lítica (ROIZMAN e PELLETT, 2001).

Os pró-capsídeos vazios organizam-se no núcleo onde são preenchidos com DNA. As glicoproteínas são sintetizadas e em seguida, difundem-se para a membrana nuclear. Os capsídeos contendo DNA brotam a partir de porções da membrana nuclear modificadas pelas glicoproteínas virais. O vírus brota do retículo endoplasmático e é transferido em uma vesícula para o aparelho de Golgi, onde as glicoproteínas são processadas. O vírus abandona a célula por exocitose ou lise celular (ROIZMAN e PELLETT, 2001).

Figura 9. Reprodução esquemática do ciclo de replicação dos herpesvírus. NM: membrana nuclear; N: núcleo celular, transcrição e replicação do genoma viral; ER: retículo endoplasmático, processamento de proteínas; G: complexo de Golgi; TE: vesículas exocíticas.
Fonte: www.virology.net.

1.3.2.3 *Human herpesvirus 1 e 2 (HHV-1 e HHV-2)*

Pertencentes ao subgênero *Simplexvirus*, as espécies HHV-1 e HHV-2 também são conhecidas como herpes simples tipo 1 e 2 (HSV-1 e HSV-2).

O HSV foi o primeiro herpesvirus humano a ser descoberto e ainda hoje é a espécie viral mais estudada. O interesse pelo estudo desta espécie está relacionado com suas propriedades biológicas, principalmente com a capacidade de causar uma variedade de infecções que perduram por toda a vida do hospedeiro e podem ser reativadas causando lesões próximas ao local da infecção inicial. Eles servem como modelo e ferramentas para o estudo de translocações de proteínas, conexões sinápticas, estrutura de membrana, regulação gênica, terapia gênica e uma infinidade de outros temas (WHITLEY, 2001).

O genoma dos HSV codifica aproximadamente 80 proteínas, porém somente metade delas é necessária para replicação do vírus, as demais têm a função de facilitar a interação com diferentes células hospedeiras e a resposta imune. O genoma codifica enzimas que incluem: a DNA-polimerase DNA-dependente, desoxirribonuclease, timidina-quinase, proteases, dentre outras. A função da ribonucleotídeo redutase está relacionada com a conversão de ribonucleotídeos em desoxirribonucleotídeos, enquanto que a timidina-quinase tem função de fosforilar os desoxirribonucleotídeos para fornecer substratos para replicação do genoma viral. O substrato destas enzimas difere significativamente de seus análogos celulares sendo estes utilizados como alvos na quimioterapia antiviral (ROIZMAN e KNIPE, 2001).

O HSV codifica ao menos 11 glicoproteínas que atuam como fixadoras da partícula viral (gB, gC, gD, gH), fusão (gB), proteínas estruturais, de escape imunológico (gC, gE, gI), dentre outras funções (ROIZMAN e KNIPE, 2001).

1.3.2.3.1 Patogênese

Os mecanismos envolvidos na patogenia dos herpes simples são muito semelhantes. De início os vírus infectam as células mucoepiteliais onde se replicam. Em seguida, migram através dos microtúbulos dos axônios até atingirem o núcleo da célula nervosa onde permanecem latente com DNA episomal. O local de infecção e a natureza da doença subsequente dependem predominantemente da forma pela qual o vírus foi adquirido (FINT, 1999; ROIZMAN e KNIPE, 2001; ROO, 2005).

O HHV-1 é transmitido principalmente pela saliva. A replicação ocorre na mucosa

bucal. O gânglio trigêmeo é local de latência desta espécie (WHITLEY, 2001).

A infecção por HHV-2 é normalmente adquirida através do contato genital. Nestes casos, a replicação ocorre no epitélio perigenital., genital ou anal., sendo o gânglio sacral o local de latência do agente viral (WHITLEY, 2001).

O HSV pode causar infecções líticas na maioria das células, infecções persistentes nos linfócitos e macrófagos e latente em neurônios. Em geral., a lise celular ocorre devido à inibição da síntese de macromoléculas celulares pelo vírus, ou devido à degradação do DNA da célula hospedeira, alteração da permeabilidade da membrana, ruptura do citoesqueleto e morte celular. Muitas cepas de HSV iniciam também a formação de sincícios por fusão das membranas celulares das células infectadas com outras células vizinhas (WHITLEY, 2001).

O vírus inicia a infecção penetrando na pele ou mucosa através de microfissuras. O patógeno sofre a primeira replicação nas células epiteliais localizadas próximas a lesão. Em seguida, o vírus se dissemina através da via neural ou hematogênica.

O princípio fundamental da patogenia da doença está relacionada com a capacidade do vírus replicar em células superficiais da mucosa e ser transportado até a raiz do gânglio dorsal., onde se torna latente. Após o estabelecimento da latência, um estímulo causado por estresse pode levar a reativação da doença com o aparecimento de vesículas e úlceras na mucosa. Na infecção primária, com baixa frequência o vírus pode se espalhar além do gânglio dorsal., levando a uma infecção sistêmica. Tais circunstâncias incluem infecção disseminada por HSV em neonatos, doença sistêmica em grávidas e pacientes imunodeprimidos (WHITLEY, 2001; TYLER e GONZALES-SCARANO, 1997).

1.3.2.3.2 Epidemiologia

O HSV é responsável por inúmeras doenças, desde casos esporádicos severos, com risco de vida em crianças, bebês e adultos até sintomatologia branda. Estima-se que no mundo ocorram anualmente 2 a 20 milhões de novos casos (CHADWICK, 2006).

O HSV é distribuído por todos o mundo, de países desenvolvidos até aqueles em desenvolvimento. A transmissão ocorre de indivíduos infectados para os susceptíveis durante o contato. Não há variação sazonal da incidência. Como a infecção é raramente fatal., o vírus torna-se latente. Mais da metade da população mundial tem com frequência infecções recorrentes e, portanto a capacidade de transmitir HSV durante episódios de infecção produtiva (WHITLEY, 2001).

A infecção primária ocorre normalmente em menores de cinco anos e com frequência é assintomática. A boca e os lábios são os locais mais comuns para ocorrer a infecção primária, entretanto qualquer órgão pode ser infectado por estes patógenos (KIMBERLING, 2004).

A manifestação clínica inicial costuma ser a estomatite gengival., embora casos de faringite e síndrome da mononucleose tenham sido associada à infecção primária em crianças jovens.

Estudos mostram que a localização geográfica, a classe econômica e a idade são fatores que influenciam na aquisição do HSV (WHITLEY, 2001).

Em países em desenvolvimento, a soroconversão ocorre mais cedo. Indivíduos de classe média que vivem em países industrializados adquirem anticorpos mais tardiamente. A soroconversão em crianças menores de cinco anos é de 20%, seguido por um pequeno aumento até a segunda década de vida, posteriormente este índice sobe para 40-60% da população jovem (WHITLEY, 2001).

1.3.2.3.3 Infecções no SNC causadas por HSV

Os HSV são importantes nos casos de encefalites em adultos e crianças com menos de seis anos de idade. Estima-se que nos Estados Unidos ocorram 40-50 casos por ano (CHADWICK, 2006).

As infecções do SNC causadas por este patógeno incluem: meningites, encefalites, mielites e com baixa frequência, a radiculite. Entretanto, a mais grave delas é a encefalite, que leva a morte 70% dos pacientes não tratados. As encefalites são predominantemente causadas pelo HHV-1 enquanto que o HHV-2 é responsável por casos de meningite. Recentemente, o HHV-2 tem sido associado a casos de meningite de Mollaret, síndrome caracterizada por episódios sucessivos de meningite viral., de caráter benigno, que tinha até então causa desconhecida (BACHMEYER et al., 1996; ROSS, 2005).

A meningite por HSV é similar aos demais tipos de meningite, nas quais os pacientes reportam dores de cabeça, rigidez na nuca e febre. A encefalite é mais localizada que difusa e leva a alteração do nível de consciência (CHADWICK, 2006).

Meningite por HHV-2 tem maior índice de complicações neurológicas que as demais meningites virais. Estudos mostram que em média 35% dos pacientes desenvolvem estes tipos de complicações (WHITLEY, 2001; KIMBERLIN, 2005).

1.3.2.4 Human herpesvirus 3 (HHV-3)

Também conhecido como vírus da Varicella-Zoster (VZV), este patógeno pertence à subfamília *Alphaherpesvirinae* devido às características em comum que possuem com os HSV.

A infecção primária em crianças causa principalmente febre e o aparecimento de vesículas em todo o corpo conhecidas como catapora. Esta infecção primária é altamente contagiosa produzindo epidemias anuais durante o inverno e a primavera em países de clima temperado (ROSS, 2005).

O VZV possui distribuição mundial. A incidência anual de varicela nos EUA tem sido de 4 milhões de casos por ano (ARVIN, 2001).

Sem imunização, o pico de incidência ocorre na primeira infância. Por volta dos 20-29 anos somente 5% dos indivíduos são susceptíveis nos Estados Unidos e em outros países de clima temperado. Em países tropicais, aproximadamente metade dos indivíduos menores de 24 anos já tiveram varicela (ARVIN, 2001).

O VZV possui tropismo por linfócito T, disseminando destas células para a pele. O vírus estabelece latência em células da raiz do gânglio dorsal durante a infecção primária. A reativação da latência produz herpes zoster, observada em idosos e em paciente imunodeprimidos (TIRABIASSI et al., 1998).

O herpes zoster consiste no aparecimento de vesículas na região dermatomal. Reativações agudas provocam dor que podem levar a síndrome chamada de nevralgia pós-herpética (ARVIN, 2001).

Dada a alta incidência de varicela, muitos adultos correm risco de ter reativação do VZV. Estudos recentes mostram que a incidência de herpes zoster no Reino Unido está em torno de 3,4 casos a cada 1.000 pessoas. Herpes zoster é muito raro em crianças menores de 10 anos, ocorrendo em média, 0,74 casos a cada 10.000 pessoas por ano (ARVIN, 2001).

O VZV pode ser isolado de lesões cutâneas ou outros tecidos infectados, utilizando células primárias, diplóides ou transformadas. Culturas de células humanas são mais sensíveis, porém este vírus pode ser propagado em células primárias de rim de macaco verde africano (células Vero), fibroblastos de embriões de cobaias (ARVIN, 2001).

Muitos dos estágios da infecção por VZV ainda não são conhecidos apesar disso, estudos mostram que, após a inoculação na mucosa, este patógeno, se direciona para a região dos linfonodos onde se replica. Este evento é seguido por uma viremia primária onde é

transportado para o fígado e células do sistema reticuloendotelial. Este estágio ocorre durante o período de incubação de 10 a 21 dias. A viremia secundária ocorre 4 ou 5 dias depois com a disseminação do vírus através das células epiteliais cutâneas (ARVIN, 2001).

O VZV possui tropismo por diferentes tecidos, principalmente quando a doença toma aspecto de viremia e o hospedeiro não consegue uma resposta primária adequada. Nestes casos, o VZV produz infecção disseminada que envolve pulmões, fígado, sistema nervoso central e outros órgãos (ARVIN, 2001). Este agente viral tem capacidade de invadir e replicar no tecido cerebral. A patogênese do sistema nervoso central envolve casos de meningoencefalite, ou ataxia cerebral (TAVAZZI et al., 2008; ARVIN, 2001).

Encefalite por varicela é observada em paciente imunodeprimidos que possuem persistência do vírus. Cortes histológicos de casos de encefalite mostram perda de mielina, infiltração perivascular com células mononucleares e degeneração neural (TAVAZZI et al., 2008).

1.3.2.5 Human herpesvirus 4 (HHV-4)

O HHV-4, classicamente chamado de vírus Epstein–Barr (EBV), pertence à subfamília *Gammapherpesvirinae*, gênero *Lymphocryptovirus*.

O vírus EBV infecta aproximadamente 95% da população adulta mundial. Este patógeno infecta linfócitos B circulantes e, na maior parte das vezes leva à infecção subclínica, podendo estar associado a doenças malignas e benignas (FAULKNER, 2000).

O EBV foi primeiramente descrito em 1964 em cultura de linfomas de Burkitt de pacientes africanos. Desde então, o vírus tem sido isolado de outras neoplasias, em muitas das quais seu papel etiológico já foi bem estabelecido (RICKINSON e KIEFF, 2001).

Em pacientes imunocompetentes portadores de EBV, pode haver o estabelecimento de uma infecção persistente de longa duração, nestes casos ocorre a liberação constante ou intermitente do vírus através da saliva, infectando outros indivíduos através do contato oral (FAULKNER, 2000; RICKINSON e KIEFF, 2001).

A infecção primária normalmente ocorre na adolescência. Em aproximadamente 30-50% dos casos causam a mononucleose infecciosa. Essa associação de idade e desenvolvimento da mononucleose infecciosa não está muito clara, sendo sugerido como principal fator a carga viral de contágio. O EBV já foi também detectado em secreções do

trato genital feminino e masculino, justificando a possibilidade de infecção pelo contato sexual (RICKINSON e KIEFF, 2001).

O EBV tem dois tipos celulares como alvo: linfócitos B e células epiteliais. A capacidade do EBV em infectar linfócitos é vista na detecção frequente do vírus em linfomas de Burkitt e também em sua capacidade em transformar linfócitos B periféricos em uma linhagem celular linfoblastóide de crescimento contínuo (RICKINSON e KIEFF, 2001).

A invasão do SNC por células infectadas pelo EBV está envolvidas na patogênese de algumas formas de doença neural. Estudos mostram que células infectadas com EBV têm sido isoladas de LCR de pacientes com meningoencefalite (FUJIMOTO et al., 2003).

O DNA de EBV tem sido também detectado através da hibridização *in situ* em células inflamatórias de biópsias do cérebro de pacientes com encefalite. A infiltração de células infectadas por EBV no tecido neural pode estimular uma resposta inflamatória, prejudicando as funções neurais. O EBV pode invadir o SNC via linfócitos B e T infectados. Em linfoma de Burkitt o SNC é o terceiro local mais afetado (JUNKER, 1994).

Alternativamente, os danos podem ser imunologicamente mediada por infiltração de linfócitos CD8 citotóxicos em tecido neural ou deposição de complexos antígeno-anticorpo (VOLPI, 2004)

Este patógeno tem sido associado com várias doenças, incluindo meningite, encefalite e desordem linfoproliferativa pós-transplante. A patogênese da EBV associada à desordens do SNC não está completamente entendida, mas pode ser devido a invasão direta do SNC contínuo (RICKINSON e KIEFF, 2001).

Em um levantamento de casos realizado no Japão, no período de 1989-1991, foram observados 0,05 casos de encefalite por EBV a cada 1.000.000 de habitantes (KAMEI et al., 2000). Outro estudo realizado também no Japão entre casos de doenças neurológicas estimou que o EBV era responsável por 0,56 casos a cada 1.000.000 de habitantes (FUGIMOTO et al., 2003).

1.3.2.6 Human herpesvirus 5 (HHV-5)

O HHV-5 pertence à Subfamília *Bethaherpesvirinae*, gênero *Cytomegalovirus*, sendo a espécie também conhecida por Citomegalovírus (CMV) (PASS, 2001).

A história da descoberta do CMV começa por volta do início do século 20, com estudos da patologia de fetos e recém-nascidos que morriam de doença sistêmica

caracterizada por complicações no SNC, hepáticas e anormalidades hematológicas. Em 1904, Jesionek descreveu células anormais no pulmão rins e fígado de um feto prematuro (PASS, 2001).

Três anos após a descrição destes estudos mudanças celulares foram descritas em glândulas salivares de crianças. Notou-se então uma semelhança entre a citopatologia das lesões e àquelas provocadas por HSV e VZV. Goodpasture e Talbot, em 1921, utilizaram o termo citomegalia para nomear este aspecto celular alterado.

Os estudos da doença citomegálica e da patologia da glândula salivar em crianças, sugeriram que a doença fetal era provocada por um vírus. Em 1954 o vírus pôde ser isolado em cultura celular de camundongos e posteriormente em células da glândula salivar humana (PASS, 2001).

Apesar de ser permissivo a uma variedade de células em cultura, o CMV humano se propaga melhor em fibroblastos. O crescimento é caracterizado por um ciclo de replicação relativamente longo, e efeito citopático caracterizado por células largas, arredondadas e inclusões citoplasmáticas podem ser observadas após 5 horas da infecção. Após 48-72 horas, o efeito citopático (ECP) está bem desenvolvido (PASS, 2001).

A progênie viral acumula-se no núcleo após 96-120 horas da infecção. A disseminação viral através da monocamada de fibroblasto ocorre através do contato célula-a-célula (PASS, 2001).

Evidências epidemiológicas sugerem que a infecção ocorre através do contato entre o vírus e a superfície da mucosa. Os locais de entrada do CMV parecem ser o epitélio do trato geniturinário, trato alimentar superior, ou trato respiratório. Apesar do vírus ter sido encontrado em células epiteliais destes locais, a infecção inicial da mucosa epitelial não é necessária (ROSS, 2005).

A infecção por CMV também pode ocorrer através da transfusão de sangue e transplante de órgãos. No caso da infecção fetal., o vírus utiliza a rota hematogênica. Estudos mostram que as células do citotrofoblasto, que formam uma barreira entre a circulação da mãe e do feto, podem ser infectadas *in vitro* (RAFAILIDIS et al., 2008; PASS, 2001). Estudos soropidemiológicos mostram que o CMV possui distribuição mundial entre a população de países desenvolvidos, sociedades industrializadas e até grupos aborígenes (PASS, 2001).

A prevalência da infecção e a idade de aquisição do vírus variam de acordo com o meio em que vivem. Em geral a prevalência é maior em países em desenvolvimento em

pessoas de baixa classe econômica de países desenvolvidos. Não há variação sazonal da incidência de infecção por CMV e epidemias não são descritas (CHAKRAVART et al., 2009).

A transmissão é feita por contato de indivíduos susceptíveis com fluídos corpóreos de pessoas que estão excretando o vírus. O CMV não é altamente contagioso e a transmissão requer contato direto com o material infeccioso. Após a aquisição do vírus, a partícula infecciosa pode ser encontrada na urina, saliva, sêmen, lágrima, secreções cervicais, por meses ou anos (PASS, 2001).

Citomegalovírus é o único entre os herpesvírus humanos em que ocorre a transmissão da mãe para o feto ou recém-nascido sendo este um importante caminho para a manutenção da infecção na população (PASS, 2001). O CMV se espalha da mãe para o bebê por três rotas: transplacentar., durante o parto ou através do leite. A infecção transplacentar ocorre em mulheres que foram infectadas antes da concepção e naquelas que tiveram a infecção primária durante a gestação (CHAKRAVART et al., 2009).

Desordens do SNC constituem a segunda manifestação mais freqüente de CMV em pacientes imunocompetentes. Pacientes que apresentam comprometimento do SNC devido ao CMV apresentam diferentes sinais e sintomas: febre, fadiga, calafrios, mialgia, fraqueza, desorientação, confusão, retenção urinária ou coma (FALAGES et al., 2008).

O CMV tem neurotropismo significativo também em pacientes imunocompetentes. Bebês e crianças também não são poupados de doenças por CMV que acometem o SNC. Em embriões, as infecções no SNC podem ter graves conseqüências. A meningite, porém é uma patologia rara em adultos imunologicamente saudáveis (FALANGES et al., 2007).

1.3.2.7 Human herpesvirus 6 (HHV-6)

O herpesvírus humano tipo 6 (HHV-6) pertence a Subfamília *Bethaherpesvirinae*, gênero *Roseolovirus* . Foi primeiramente isolado por Salahuddin et al., (1986) em cultura de linfócitos de sangue periférico de pacientes portadores de distúrbios linfoproliferativos e síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS).

No início, o vírus foi denominado de HBLV (vírus humano linfotrópico B) pelo fato de acreditarem que o mesmo apresentava tropismo pelos linfócitos B. Trabalhos posteriores comprovaram que esse tropismo se dava para linfócitos T (ABLASHI et al., 1987), mas

especificamente para linfócitos T CD4+, além de poder infectar uma variedade de outras células da linhagem T e B (CAMPADELLI-FIUME et al., 1999).

O HHV-6 apresenta duas variantes: A e B, sendo suas diferenças baseadas principalmente em características de crescimento “*in vitro*”, imunorreatividade e sequência de DNA (PELLETTE et al., 1992). A variante B é considerada a principal causa do exantema súbito, enquanto a variante A apresenta-se mais citolítica além de ser mais virulenta (SCHIEMER et al., 1991; DEWHURT et al., 1993).

O HHV-6 assemelha-se a outros vírus herpéticos da Subfamília *Bethaherpesvirinae* devido a sua permanência, quando em latência, nas glândulas salivares e células mononucleares do sangue (FOX et al., 1990; ROIZMAN et al., 1992; LUPPI et al., 1993). Esta característica pode explicar a alta incidência do vírus na saliva de adultos saudáveis, bem como a alta taxa de infecção em crianças (JARRET et al., 1990; HARNETT et al., 1990; LEVY et al., 1990; CONE et al., 1993; DI LUCA et al., 1995; ABERLE et al., 1996).

A prevalência do vírus HHV-6 na população adulta saudável pode variar de 50 a 90% (PELLETT et al., 1992). A infecção primária se dá geralmente nos dois primeiros anos de vida. A saliva tem sido considerada um meio de transmissão viral importante (PIERTROBONI et al., 1988). No Japão a frequência de exantema súbito em crianças infectadas pelo HHV-6 é de cerca de 60%. Nos Estados Unidos, 70% dos casos de infecção primária não apresentam manifestações clínicas ou resultam apenas em febre ou “*rash* cutâneo” (NIEDERMAN et al., 1988; SOBUE et al., 1991; AKASHI et al., 1993; DRAGO et al., 1999).

Após a infecção primária, o HHV-6 geralmente permanece em latência e pode ser isolado da saliva de indivíduos infectados que não apresentem quaisquer alterações clínicas (CONE et al., 1993). Os locais de latência viral ainda não foram totalmente esclarecidos, porém o HHV-6 pode ser identificado em células mononucleares de sangue periférico de 17 a 90% dos adultos saudáveis, além das glândulas salivares e no sistema nervoso central (GOPAL et al., 1990; CUENDE et al., 1994; YOSHIKAWA, 2004). Isto leva a crer que os linfócitos e provavelmente os monócitos são dois candidatos a local de latência do vírus, enquanto que as glândulas salivares podem representar os sítios de replicação e o reservatório viral (CAMPADELLI-FIUME et al., 1999).

Em exame histológico de cultura de linfócitos infectados é possível observar o efeito citopático do HHV-6, caracterizado pela presença de células largas e arredondadas, com formação de sincícios (SALLAHUDDIN et al., 1986; LUSSO et al., 1989). O HHV-6 pode

infectar os linfócitos TCD3+, TCD4+, TCD8+, células *natural killer* (NK), fagócitos mononucleares além de células do sistema nervoso central (LUSSO et al., 1989; YOSHIKAWA, 2004).

Em indivíduos imunocompetentes, a infecção pelo HHV-6 está relacionada a doenças inflamatórias como o exantema súbito, febre infantil, hepatite, síndrome da fadiga crônica, doenças auto-imunes, histiocitose, mononucleose infecciosa e ainda estar relacionado a casos de esclerose múltipla. Também são encontrados indícios dessa infecção herpética em pacientes com distúrbios linfoproliferativos malignos como linfomas e leucemias linfoblásticas (NIEDERMAN *et al.*, 1988; SOBUE *et al.*, 1991; AKASHI *et al.*, 1993; DRAGO E REBORA, 1999).

Em pacientes imunodeprimidos, o HHV-6 pode tornar-se ativo ou infectá-los de forma primária. Pacientes portadores sintomáticos do vírus HIV podem manifestar infecções disseminadas nos pulmões, fígado, rins, baço e linfonodos além de doenças no Sistema Nervoso Central como perda de mielina (CAMPADELLI-FIUME et al., 1999).

HHV-6 é o principal agente responsável por casos de exantema súbito e febre na qual a causa não é identificada. O sintoma mais severo associado ao exantema súbito é a convulsão febril. As infecções por HHV-6 ocorrem em um terço de todas as febres associadas à convulsão em crianças acima de dois anos de idade (CAMPADELLI-FIUME, et al., 1999).

Em um estudo realizado por Hall e colaboradores sobre convulsões febris, 24% dos LCR analisados foram positivos para HHV-6 por PCR (HALL et al., 1994). A detecção de DNA de HHV-6 em LCR foi também relatada em pacientes com manifestações neurológicas em infecção primária por HHV-6. Este patógeno pode persistir no SNC, aumentando o risco de ataques de convulsão febril recorrentes (KONDO et al., 1993; CASERTA et al., 1994).

HHV-6 é provavelmente o vírus mais neurotrópico conhecido. A neuroinvasão tem sido relatada durante a infecção primária em crianças, em casos de encefalite em pacientes com AIDS, transplantados, bem como em adultos e crianças imunocompetentes (Campadelli-Fiume, et al., 1999).

1.3.3 Adenovírus

1.3.3.1 Histórico e Classificação

Os adenovírus foram primeiramente isolados e caracterizados como agentes virais por dois grupos de pesquisadores que estudavam a etiologia de infecções respiratórias agudas. Em 1953, Rowe e colaboradores, observaram a degeneração de culturas de células primárias de adenóides humanas, resultante da replicação de um vírus desconhecido presente no tecido. No ano seguinte, Hilleman e Werner, estudando a epidemia de uma doença respiratória em recrutas americanos, isolaram de secreções respiratórias um agente que induzia alterações citoplasmáticas em culturas de células humanas (HORWITZ, 2001).

Esses agentes virais isolados foram logo relacionados e inicialmente chamados de agentes da degeneração da adenóide, da infecção respiratória, da doença da adenóide-faringe-conjuntiva ou da doença respiratória aguda. Apenas em 1956 foram denominados adenovírus, originário do tecido no qual foram descobertos (HORWITZ, 2001)

Os adenovírus pertencem à Família *Adenoviridae*, a qual pode ser filogeneticamente dividida em quatro gêneros: *Mastadenovirus*, constituído por vírus que infectam mamíferos; *Aviadenovirus*, que infetam aves; *Siadenovirus* que infectam aves, anfíbios e peixes; *Atadenovirus* que infectam ruminantes, aves e marsupiais. Atualmente os pesquisadores discutem sobre a criação de um novo gênero, *Fishadenovirus*, devido à identificação de um adenovírus isolado de esturjão cujas características não se enquadram em nenhum dos gêneros existentes (DANISON et al., 2003).

Os adenovírus humanos pertencem ao gênero *Mastadenovirus*. São conhecidos até o momento, 51 sorotipos, distribuídos em seis espécies (A-F), de acordo com as características antigênicas, morfológicas e moleculares (TIEMESSEN e KIDD, 1995).

1.3.3.2 Características gerais

Os adenovírus possuem de 70 a 90 nm de diâmetro, simetria icosaédrica, não envelopados. O capsídeo contém 252 subunidades chamadas capsômeros, das quais 240 são constituídas pela proteína *Hexon*, compondo as faces do icosaédrico. Os 12 capsômeros restantes são compostos pelas proteínas penton-base e fibra que formam os vértices (HORWITZ, 2001).

Os adenovírus possuem genoma de DNA fita dupla linear, com tamanho entre 34-36 Kb (HORWITZ, 2001).

Figura 10. Microscopia eletrônica de partículas de Adenovírus. Representação esquemática de uma partícula de Adenovírus. Fontes: www.ncbi.nlm.nih.gov; www.cst.cmich.edu/

Estudos realizados com o protótipo HAdV-2 (espécie C) mostraram que as proteínas envolvidas no reconhecimento da célula hospedeira são a fibra e a penton-base (HORWITZ, 2001).

Os HAdVs tem a habilidade de infectar uma vasta gama de tecidos, sendo identificados como agentes etiológicos de diversas patologias, tais como: síndromes respiratórias, ceratoconjuntivites, infecções entéricas, renais e do sistema nervoso (WADELL, 2000).

A biossíntese viral ocorre no núcleo celular e é dividida em duas fases, separadas pelo início da replicação do DNA. Os eventos iniciais compreendem as etapas de adsorção, penetração, transporte até o núcleo e início da multiplicação viral com a transcrição e tradução dos genes precoces. Concomitantemente com o início da replicação do DNA, ocorre o início da fase tardia do ciclo com a expressão de um grupo de genes virais que expressam proteínas estruturais (HORWITZ, 2001).

Os polipeptídios recém sintetizados são transportados para o núcleo onde ocorre a formação dos capsômeros. Após a formação das faces do icosaédrico, através do agrupamento de proteínas, o DNA genômico é inserido dentro do capsídeo e por fim este é fechado com a

colocação dos pentons nos vértices. A liberação da progênie viral ocorre por exocitose ou por lise celular (HORWITZ, 2001; ALLARD et al., 1992).

1.3.3.3 Patogênese

Os estudos filogenéticos dos diversos sorotipos dividem os adenovírus em dois grupos: aqueles relacionados a infecções gastrintestinais (A e F) e os respiratórios (B,C e E) (TIEMESSEN e KIDD, 1995).

As bases moleculares do tropismo e da patogenicidade desses vírus são pouco conhecidas. A permissividade celular e o tropismo viral dependem, dentre outros fatores, da expressão dos receptores na membrana celular e da sua interação com proteínas virais (BERGELSON et al., 1997; ROELVINK et al., 1998).

Os padrões patogênicos dos adenovírus podem ser agrupados em 5 tipos: infecções assintomáticas (espécies A e D), infecções respiratórias agudas (espécies C, B1 e E), infecções gastrintestinais (espécie A e F), infecções do trato urinário (espécie B2) e infecções oculares (espécie D) (WADELL, 1984; ALLARD et al., 1992).

As infecções do SNC por adenovírus não são frequentes, sendo a encefalite aguda a manifestação neurológica mais importante. O sorotipo 7 (espécie B1) é o mais comumente isolado de LCR ou do tecido cerebral. Outros sorotipos também são detectados, porém com menor frequência: sorotipo 3 (espécie B1), sorotipos 1,2,5,6 (espécie C) e sorotipo 12 (espécie A) (LEMA et al., 2005).

Os adenovírus infectam indivíduos susceptíveis através da boca, nasofaringe e conjuntiva. O receptor para todas as espécies de adenovírus é o CAR, com exceção da espécie B que tem como receptor a proteína CD46 (SIRENA et al., 2004) .

Os sorotipos Ad1, Ad2, Ad5, Ad6 são mais frequentes, endêmicos e infectam principalmente em crianças jovens, podendo ser excretados por meses, principalmente nas fezes que são provavelmente os responsáveis pela disseminação do vírus via fecal-oral (HORWITZ, 2001).

Uma das formas epidêmicas de adenovírus é a ceratoconjuntivite que tem se espalhado através de ambientes aquáticos como piscinas e instrumentos médicos contaminados (LEMA et al., 2005; HORWITZ, 2001).

1.3.3.4 Epidemiologia

As infecções por adenovírus ocorrem em humanos por todo o mundo. Com poucas exceções, os sorotipos de adenovírus humanos não são patogênicos para animais e adenovírus de animais são somente patogênicos dentro da própria espécie (HORWITZ, 2001).

As transmissões de infecções por adenovírus variam de esporádicas a epidêmicas. A transmissão fecal-oral ocorre na maioria das infecções de crianças jovens (HORWITZ, 2001). A disseminação do vírus pode ocorrer através do sistema respiratório, mas o transporte longo até o intestino faz das fezes uma fonte importante de infecção, tanto na fase aguda como durante os episódios de recorrência (LEMA et al., 2005; HORWITZ, 2001).

Estudos sorológicos têm mapeado algumas estimativas da prevalência de infecções por adenovírus nas populações. Anticorpos contra Ad1, Ad2 e Ad5 são os mais comuns, sendo encontrados em 40-60% das crianças. A incidência de anticorpos para Ad3, Ad4 e Ad7 é baixa em crianças. Estes estudos podem explicar porque adultos são raramente infectados com Ad1, Ad2 e Ad5, mas são mais susceptíveis a infecções por Ad3, Ad4 e Ad7 (HORWITZ, 2001; WADELL, 1984; ALLARD et al., 1992).

1.4 Patogênese dos vírus neurotrópicos

Para produzir doença neurológica, os vírus se espalham do seu local de entrada até o sistema nervoso. Esta invasão pode ocorrer através da corrente sanguínea ou através das fibras nervosas. O vírus da Varicela zoster, por exemplo, se espalha pela pele através da corrente sanguínea produzindo o clássico exantema da catapora. Este sofre então um transporte retrógrado pelos axônios dos neurônios sensoriais e em seguida para o nervo trigêmeo e até a raiz dorsal do gânglio, onde torna-se latente. A reativação da latência é associada com o transporte do vírus, via axônio, dos gânglios para as células da pele (TYLER e GONZALEZ-SCARANO, 1997).

Cepas diferentes de uma mesma espécie viral podem apresentar diferenças na capacidade de invasão através dos nervos ou corrente sanguínea. A entrada na corrente sanguínea pode ser resultante da inoculação do agente viral através da picada de um inseto, a mordida de um animal., por uso de agulhas ou transfusão de sangue contaminado. A típica sequência de fatos que envolvem a disseminação da viremia foi inicialmente descrita por Fenner em seu estudo sobre ectomelia, doença provocada pelo vírus da família *Poxviridae*,

gênero *Orthopoxvírus*, responsável pela mousepox, em ratos. Com baixo título inicial., a viremia primária é gerada graças à replicação precoce do vírus próximo a região de entrada. Locais de replicação primária incluem: tecido muscular esquelético, tecido adiposo e tecidos conectores (ROOS, 2005; TYLER e GONZALEZ-SCARANO, 1997).

A viremia primária espalha o vírus através do sistema reticuloendotelial e outros órgãos onde replicam, levando a uma viremia secundária de alto título, o que facilita a disseminação do agente. Esta disseminação precoce do lugar de entrada para a região linfática do tecido tais como os associados ao intestino e brônquios, proporciona o acesso aos vasos linfáticos. Vasos linfáticos eferentes drenam para o ducto torácico, permitindo que o vírus entre no sistema circulatório. Esta sequência de eventos é muito importante na patogênese de picornavírus e alguns togavírus (TYLER e GONZALEZ-SCARANO, 1997; McKENDALL e STROOP, 1994).

A magnitude e duração da viremia representa um balanço entre a entrada do vírus na circulação e a capacidade de hospedeiro em conter este patógeno. A contenção da viremia é mediada primeiramente por células fagocitárias dentro do sistema endotelial. A capacidade de eliminar o vírus está totalmente relacionada à presença de fatores tais como anticorpos opsonizantes e proteínas do sistema complemento, tamanho do virion, mudanças e natureza das proteínas de superfície, patogenicidade e neurotropismo, carga viral., resposta imune do hospedeiro (ROOS, 2005; TYLER e GONZALEZ-SCARANO, 1997).

Vírus neurotrópicos são capazes de replicar em células fagocitárias. Estas células podem então contribuir para a continuidade da viremia ao invés de eliminar o patógeno. Replicação em macrófagos ocorre com togavírus, lentivírus, coronavírus, herpes simplex vírus, citomegalovírus, arenavírus e reovírus. Diferenças na capacidade do macrófago de animais recém-nascidos e adultos em lidar com a infecção viral com eficiência pode também determinar a relação idade-susceptibilidade a certos vírus neurotrópicos (TYLER e GONZALEZ-SCARANO, 1997).

1.4.1 Disseminação neural

A possibilidade do vírus se espalhar através do sistema nervoso foi primeiramente demonstrado por Pasteur para o vírus da raiva. Desde então, a disseminação neural tem sido demonstrada para um grande número de vírus neurotrópicos, incluindo HSV, poliovírus, alguns togavírus, coronavírus, reovírus, pseudorabies. Esta lista inclui vírus envelopados e

não envelopados, com genoma de DNA e RNA, indicando que o espalhamento neural é realizado por vírus com abrangente propriedade estrutural e estratégias replicativas (TYLER e GONZALEZ-SCARANO, 1997).

Estudos mostram que existem inúmeros fatores comuns para a disseminação neural pelos vírus. A primeira replicação em tecido não neural não é essencial para o subsequente início da invasão neural., como mostram estudos como vírus da raiva e poliovírus. A infecção de células periféricas, como as células de Schwann, pode promover a disseminação neural., um mecanismo patogenicamente importante parece ser o transporte através dos axônios. Dependendo do local de inoculação, a cepa pode utilizar fibras nervosas motoras, sensoriais ou autônomas do intestino para alcançar o cérebro. Os poliovírus por exemplo, se espalham através das fibras motoras para alcançar os neurônios da medula espinhal (BARNETT et al., 1993).

Os neurônios transportam macromoléculas por meio de estruturas, moléculas e distintos mecanismos de transporte via axônio. Estudos cinéticos e farmacológicos indicam que os vírus são dependentes dos microtúbulos associados ao sistema de transporte axonal rápido. Este tipo de transporte resulta no transporte de substâncias de 100 a 400 mM/dia. Já o índice de transporte lento movimenta, em média, 20 mM/dia (TYLER e NATHANSON, 2001; TYLER e GONZALEZ-SCARANO, 1997).

Estudos farmacológicos são importantes para demonstrar a importância dos microtúbulos no transporte dos vírus. Agentes que dificultam a estrutura do transporte axonal tais como: colchicina, taxol, nacodazol mostraram inibir o transporte viral tanto *in vitro* como *in vivo* (TYLER e NATHANSON, 2001).

As terminações sinápticas contêm uma alta densidade de receptores que servem para promover a entrada dos vírus nestes pontos. A exocitose de neurotransmissores também pode facilitar a liberação dos vírus pelos neurônios (TYLER e NATHANSON, 2001).

Genes responsáveis pela capacidade do HSV se espalhar pelo SNC após inoculação periférica tem sido estudados através do mapeamento das regiões que codificam as proteínas: DNA polimerase, timidina quinase, nucleoproteína p40 e a proteína de envelope gB. Mutações nas proteínas gB e gD demonstraram ser importantes no mecanismo de neuro invasão (METTENLEITER, 2003).

A capacidade dos vírus invadirem o SNC depende, em partes, da rota de invasão. Alguns neurônios, como os motores da medula espinhal., têm o corpo celular dentro do SNC, mas enviam seus axônios para fora do SNC. A invasão viral originária da periferia para o

neurônio motor pode ser o necessário para o início da invasão do SNC. Infecções de células como aquelas da raiz do gânglio dorsal ou gânglio trigêmeo dá acesso direto ao SNC. Este mecanismo de invasão têm sido demonstrado em modelos experimentais de infecção com HSV de murinos (TYLER e GONZALEZ-SCARANO, 1997) .

Os neurônios olfatórios também podem servir como rota de entrada e invasão devido à exposição dos receptores neurais no epitélio da mucosa nasal. Estes receptores fazem sinapse direta com neurônios do bulbo olfatório, o que leva a invasão do SNC. O mecanismo descrito nunca foi demonstrado em infecções humanas, mas muitos estudos mostram este tipo de invasão em modelos experimentais para os poliovírus, coronavírus e HSV (METTENLEITER, 2003).

Para enterovírus neurotrópicos, um modelo experimental mostrou que após inoculação oral, este agente infecta os neurônios do plexus adjacente mientérico intestinal e posteriormente as placas de Peyer e então se espalham para neurônios motores da região dorsal (TYLER e GONZALEZ-SCARANO, 1997).

Vírus que invadem o sistema nervoso através da corrente sanguínea, na maioria dos casos, atravessam a barreira hematoencefálica. Existem regiões dentro do SNC onde a barreira hematoencefálica é incompleta ou não desenvolvida. Estas áreas incluem: plexo coróide, glândula pituitária posterior e órgãos circunventriculares. Nestas regiões a capilaridade do endotélio é fenestrada e a membrana basal é esparsa. O transporte do vírus através das células epiteliais do plexo coróide leva o vírus diretamente até o líquido cerebroespinal (LCR). Uma vez no LCR, o vírus pode se espalhar e infectar as células do epidídimo dos ventrículos e então o parênquima cerebral. Para vírus que não invadem o SNC por áreas onde a barreira hematoencefálica é incompleta, uma estratégia utilizada para invasão ou para ser transportado através do SNC seria o uso das células endoteliais dos capilares (TYLER e GONZALEZ-SCARANO, 1997).

A capacidade de replicação dentro do SNC tem sido associada a regiões não codificantes do genoma viral. Estudos que comparam seqüências genômica do poliovírus sorotipo 3, cepa vacinal Sabin, com outra cepa do mesmo sorotipo mas não atenuada mostram que mutações na região 5' não codificante (5'NCR) estão associadas a neurovirulência (THORLEY et al., 2009).

1.5 Composição do Líquido cefalorraquidiano

O número de células brancas no LCR varia com a idade, entretanto, a presença de mais que cinco células/ mM3 é anormal em indivíduos com 8 semanas ou mais. Em recém nascidos, com liquor normal., aproximadamente 60% das células são polimorfonucleares e 40% são células mononucleares. Em crianças e adultos a contagem normal de células brancas é de 0 a 5 células mononucleares por milímetro cúbico (ROOS, 2005).

A concentração de glicose no LCR depende da concentração de glicose no sangue, da facilidade da membrana em transferir glicose do sangue para o LCR e o metabolismo da glicose pelas células do líquido (McKENDALL e STROOP, 1994).

O nível normal de concentração de glicose no LCR está entre 45 e 80 mg/dl quando a concentração de glicose no soro está entre 70-120mg/dl, ou seja, aproximadamente 65% da glicose sanguínea. Concentração de glicose abaixo de 45 mg/dl não é considerada normal (ROOS, 2005).

O diagnóstico diferencial baseado na diminuição da taxa de glicose no CSF inclui meningite bacteriana, encefalite por HSV, meningite fúngica, meningite por micobactérias, carcinoma meníngeo, dentre outros. Em recém nascidos a termo e prematuros, a relação entre o índice de glicose no LCR e na corrente sangüínea fica em torno de 0,81 devido à imaturidade do organismo e a alta permeabilidade da barreira hematoencefálica (FISHBACH e DUNNING, 2008; ROOS, 2005).

A concentração de proteínas no LCR fica em torno de 50mg/dl em adultos, 45 mg/dl em crianças e 150mg/dl em neonatos. A alta concentração de proteínas em LCR de neonatos ocorre devido, mais uma vez, à imaturidade da barreira hematoencefálica (ROOS, 2005).

O aumento da concentração de proteína no LCR é uma anormalidade não específica causada por qualquer processo em que ocorra o aumento de permeabilidade na barreira hematoencefálica (ROOS, 2005).

1.6 Manifestações clínicas das meningites

As manifestações clínicas mais importantes nas meningites agudas e que aparecem com maior frequência incluem: febre, vômito, e rigidez na nuca, entretanto, a apresentação clínica pode variar com a ausência de alguns destes ou o acréscimo de outros sinais e

sintomas, quais sejam a cefaléia, fotofobia, alterações da consciência, convulsões, dentre outros (CHADWICK, 2006).

O início da meningite aguda pode variar em dependência do agente etiológico envolvido. Assim, é possível observar manifestações progressivas de choque, púrpura grave e redução do nível de consciência, levando a um quadro clínico dramático como em alguns casos de meningite meningocócica, ou ter uma evolução mais lenta sem achados sistêmicos significativos e precedida por vários dias de uma leve sintomatologia generalizada, como sintomas respiratórios superiores ou gastrintestinais, como acontece na maioria das meningites virais (ROOS, 2005).

Os denominados sinais meníngeos, secundários a compressão dos nervos raquidianos, manifestam-se na exploração clínica, em 3 sinais: a rigidez na nuca e os sinais de Kerning e Brudzinsk, assim como todas as suas variantes. Destes sinais, o que é evidenciado é a rigidez na nuca, sendo encontrado em 82% dos casos de meningite bacteriana (SIGUDARDOTTIR et al., 1994).

O aumento da pressão intracraniana manifesta-se por alterações da consciência, cefaléia holocraniana, vômitos, fotofobia, sinais neurológicos, localizados e, dependendo da gravidade, descerebração, coma ou sinais de herniação (ROOS, 2005).

Em algumas meningites pode-se encontrar manifestações clínicas não relacionadas diretamente com o SNC, é o caso das lesões exantêmicas petequial-purpura encontradas em 10% dos casos de meningite bacteriana. Outros sinais cutâneos também podem ser observados dependendo do agente etiológico envolvido, como exantemas maculosos ou máculo-papulosos, nas infecções por enterovirus, ou lesões vesiculares como nos casos de infecções por HSV ou VZV (McKENDALL e STROOP, 1994).

As convulsões focais ou generalizadas, causadas por lesões no cérebro, anormalidades eletrolíticas ou infarto, são observadas em muitas meningites bacterianas e em casos de meningite viral; estas podem apresentar-se nos primeiros dias da doença ou mais tardiamente (ROOS, 2005).

A meningite pode se apresentar de modo bastante diverso em neonatos, crianças até um ano de idade e em idosos, podendo ser bastante inespecífica. Em crianças menores de um ano, os sinais clássicos de meningite podem estar ausentes, podendo ocorrer instabilidade térmica, choro agudo ou gemido, irritabilidade, recusa alimentar e fontanela abaulada; vômito e diarreia são raros e nos casos mais graves observa-se manifestações neurológicas (DADOUD et al., 1996).

Um percentual de pacientes com meningites apresentam déficit neurológicos focais, ocasionados por comprometimento dos tecidos nervosos. Além disso, outras áreas do SNC podem também estar comprometida durante o transcurso da infecção, devido à propagação desta, expressando-se através de outros sinais neurológicos (CHADWICK, 2006; ROOS, 2005).

1.7 Diagnóstico Laboratorial

1.7.1 Características do LCR nas meningites

O LCR das meningites virais geralmente tem aspecto claro e, na maioria das vezes, tem um número de células inferior a 1.000 células/ mM^3 com predomínio de células mononucleares (MN), apesar de poder exibir um percentual mais elevado de polimorfonucleares (PMN) logo no início da doença. A proteína é normal ou ligeiramente elevada, enquanto que a glicose se mantém dentro dos níveis de normalidade (CHERRY, 1994). Este quadro, porém é passível de variações. Nas infecções por HSV a predominância se dá em torno de 50 a 800 células/ mm^3 , podendo, entretanto variar de 0 a 2.500. A proteína geralmente é um pouco elevada até 100 mg/dl, e a glicose, normal no início, pode sofrer uma posterior diminuição (ROOS, 2005).

Nas meningites bacterianas, geralmente o LCR apresenta uma pleocitose elevada, acima de 1.000 células/ mM^3 com predomínio de PMN, podendo apresentar no início da doença, predomínio de monócitos. Exceções a esta regra são as meningites bacterianas que fazem parte do grupo de meningites com liquor claro, como as tuberculosas e leptospiróticas. O número de leucócitos também pode estar reduzido em, aproximadamente, 20% dos casos com número inferior a 250 células/ mm^3 . Quando o número de células é muito baixo, o prognóstico tende a ser nebuloso. O nível de proteína geralmente está elevado e o de glicose, baixo (ROOS, 2005; McKENDALL e STROOP, 1994).

1.7.2 Métodos de diagnóstico

Infecções virais do Sistema Nervoso Central são, com frequência, de difícil diagnóstico. Isto ocorre porque os métodos laboratoriais convencionais como cultura viral e sorologia, são laboriosos e pouco sensíveis (CHADWICK, 2006).

Para o diagnóstico de infecções causadas por enterovírus, o isolamento em cultura de células ainda é considerada como método padrão ouro para identificação destes agentes, apesar das limitações da técnica (ALMEIDA et al., 2007; CHONMAITREE et al., 1989).

A sensibilidade do isolamento em cultura celular é altamente dependente do sorotipo, da carga viral, do cuidado com o acondicionamento da amostra até a chegada ao laboratório. A escolha do tipo celular utilizado no isolamento de enterovírus é de suma importância para a viabilidade do isolamento. De acordo com dados da literatura, desconhece-se uma única linhagem celular em que todos os sorotipos de enterovírus são capazes de se multiplicar. Muitos enterovírus possuem ótimo desempenho em células primárias de rim de macaco, entretanto, o suprimento deste tipo celular é limitado (KOK et al., 1998; MUIR et al., 1998).

O sorotipo Coxsackievirus A é de difícil crescimento em cultura de células. Grande parte das cepas propagam em linhagem RD (rabdiosarcoma), mas o isolamento a partir de amostras clínicas tem mostrado poucos resultados positivos. O uso de camundongos recém-nascidos para isolamento de Coxsackievirus A tem sido realizados com sucesso, mas devido à dificuldade da técnica esta modalidade é raramente utilizada (MUIR et al., 1998).

Para o isolamento de HSV a partir de amostras clínicas são utilizadas as linhagens VERO (rim de macaco verde) e PF (fibroblasto de prepúcio humano), adequadas para a visualização do efeito citopático característico da replicação de HSV. O diagnóstico de HSV através do uso cultura celular é concluído após 24 a 48 horas da inoculação, sendo este método inadequado na necessidade de um diagnóstico rápido (WHITLEY 2001).

Estudos epidemiológicos indicam que a maioria dos casos de meningite asséptica resulta de infecção viral; entretanto, um estudo realizado por Hosoya et al. (1998) mostrou que o patógeno específico é identificado em menos de 60% dos casos quando utilizado métodos convencionais de diagnóstico.

A maioria dos testes de diagnóstico utilizados na investigação das meningites virais envolve a análise do LCR, entretanto muitos outros testes são também utilizados. A análise microscópica do LCR não é utilizada no diagnóstico rotineiro das meningites virais, porém tal técnica permite realizar a contagem diferencial de células brancas, ou determinar a causa bacteriana ou fúngica de uma meningite (FISHBACH e DUNNING, 2008).

A análise do LCR é o teste laboratorial mais importante no diagnóstico das meningites virais. As características típicas encontradas são: aumento no número de linfócitos, taxa normal ou leve diminuição da concentração de glicose e taxa normal ou leve alteração na concentração de proteínas (CHADWICK, 2006).

A pleocitose linfocítica é citada como uma característica das meningites virais, entretanto raramente células polimorfonucleares podem predominar nas primeiras 48 horas da infecção, especialmente em casos de infecção por enterovírus. A presença de polimorfonucleares requer uma terapia empírica para meningite bacteriana até que este diagnóstico seja excluído (ALMEIDA et al., 2007; NORVIC et al., 2002).

A taxa de glicose no LCR é tipicamente normal nas meningites virais, embora esse quadro possa ser alterado em casos de meningite por enterovirus, HSV-2, VZV e vírus da coriomeningite linfocítica. Como regra, em casos de pleocitose acompanhada da diminuição da concentração de glicose deve ser investigada a presença de fungos, *Listeria*, micobactérias, ou desordens não infecciosas como carcinoma meníngeo (ROOS, 2005; SIMKO et al., 2002).

A possibilidade de um diagnóstico de meningite viral cresce quando a cultura do LCR é negativa para bactérias, entretanto outras causas ainda devem ser investigadas, principalmente quando tratar-se de pacientes imunocomprometidos (SIMKO et al., 2002; McKENDALL e STROOP, 1994).

Quando a obtenção do LCR é difícil, a cultura de swab de orofaringe ou fezes pode auxiliar no diagnóstico de infecções por enterovírus, entretanto, muitas vezes não existe a correlação entre cultura positiva e um possível diagnóstico de meningite viral, já que o vírus pode ser isolado por semanas na fezes, sendo este muitas vezes diferente do patógeno causador da meningite (KUPILA et al., 2005; ROOS, 2005; HOSOYA et al., 1998).

Métodos de imunoensaio são com frequência utilizados no diagnóstico de vírus causadores de meningites. Estes testes podem ser negativos durante os primeiros estágios da infecção sendo necessária uma segunda análise em amostras colhidas na fase de convalescença (ROOS, 2005).

O uso de marcadores inflamatórios é de grande utilidade para distinguir meningites virais das bacterianas. Muitos estudos sugerem que resultados com proteína C-Reativa mais baixa que 50mg pode ser indicativo de meningite viral. A dosagem de procalcitonina no soro também é utilizada para o diagnóstico diferencial, onde a sua elevada contração é muito específica e sensível para meningite bacteriana (ROOS, 2005).

Diagnóstico por imagem tal como a tomografia computadorizada, ou a ressonância magnética podem ser úteis para determinar a etiologia de encefalites, particularmente de herpesvirus (NAITO et al., 2007; SIMKO et al., 2002).

A técnica de PCR tem sido largamente utilizada, sendo considerada uma técnica de diagnóstico rápido, sensível e específica. Muitos laboratórios de referência oferecem a PCR

no LCR para diagnosticar meningites causadas por enterovírus e herpesvírus (ARCHIMBAUD et al., 2009; GUNEY et al., 2003; DEBIASI et al., 2002; VERSTREPEN et al., 2001; ELNIFRO et al., 2000).

A técnica de PCR Multiplex tem sido utilizada na detecção de diferentes patógenos na amostra clínica através de uma única reação, permitindo uma economia de reagentes e uma rápida conclusão do diagnóstico. Recentemente, com a introdução da técnica de PCR em tempo real o diagnóstico pode ser obtido em poucas horas, permitindo também a quantificação do agente viral presente na amostra clínica. Com esta análise é possível ainda o estudo da relação vírus-hospedeiro e a resposta a terapias antivirais, bem como o monitoramento de uma possível reativação viral ou persistência, permitindo também correlacionar a severidade da doença à carga viral. (MACKAY et al., 2002; VERSPETREN al., 2002, NICOLL, 2001).

A PCR em tempo real quantitativa foi desenvolvida com o objetivo de estimar o número de cópias de um gene de interesse e tornou-se amplamente utilizada também no diagnóstico de infecções causadas pelos mais diferentes patógenos. Como vantagem, a técnica tem se destacado por não requerer a detecção de fragmentos de DNA em gel de agarose, uma vez que a detecção do amplicon é feita durante a reação, minimizando a possibilidade de contaminação da amostra. Também apresenta flexibilidade de reação para PCR multiplex com uso de diferentes fluoróforos associados aos iniciadores ou sondas, além de se mostrar extremamente sensível e capaz de fornecer os resultados com grande rapidez (HYMAS et al., 2008; MACKAY et al., 2002; NICOLL et al., 2001).

O sistema de detecção Taq-Man é amplamente utilizado. Neste método, uma sonda de oligonucleotídeos é marcada duplamente com uma molécula “repórter” R na porção 5’ e outra molécula “quencher” (Q) na extremidade 3’. Quando em proximidade, a molécula Q, que atua como um silenciador, absorve a fluorescência emitida pela molécula R, uma vez excitada. Durante a PCR, a sonda se liga à sequência do DNA a ser amplificado. Quando a Taq polimerase encontra essa sonda durante a síntese da nova fita de DNA, a enzima, que possui atividade exonuclease 5’-3’, remove a molécula R que emitirá fluorescência livremente. Nesta situação, as moléculas R e Q são separadas fisicamente e um detector mede a fluorescência acumulada da molécula R durante a PCR por meio de uma fibra ótica presente no tubo de reação. A fluorescência é então relacionada com a quantidade de produto formado em tempo real durante a amplificação, quando a PCR é considerada quantitativa (MACKAY, 2007; MACKAY, 2002).

Figura 11. Representação do mecanismo utilizado pela sistema Taq-Man durante a reação de PCR em tempo real.

Fonte: www.bio.davidson.edu

Um outro sistema de detecção utilizado na PCR em tempo real é o fluoróforo Sybr Green. Diferentemente do sistema Taq-Man, o Sybr Green não está ligado aos oligos da reação. Este fluoróforo se liga de maneira inespecífica a molécula de DNA em dupla fita. O princípio deste sistema está baseado na detecção de fluorescência a medida que o DNA de dupla fita é gerado, em virtude da concentração do fluoróforo entre as novas cadeias de DNA. Por ser um agente inespecífico, o Sybr Green revela qualquer dupla fita gerada na reação de amplificação, como por exemplo dímeros de *primers* e *hairpins* (MACKAY, 2007).

Figura 12. Representação esquemática da dupla hélice de DNA, intercalada com a molécula de SybrGreen.
Fonte: www.fleury.com.br.

Por meio da PCR em tempo real quantitativa é possível obter quantificação relativa ou absoluta para as amostras em análise. A quantificação relativa é a abordagem mais simples e indica variações quantitativas em uma sequência alvo quando comparadas a um gene de referência. A quantificação absoluta expressa a quantidade exata de ácidos nucleicos alvo presentes em uma amostra em relação a uma unidade específica (por exemplo: ng/reação ou células/mL), sendo mais fácil a comparação de dados provenientes de diferentes ensaios ou laboratórios (MACKAY, 2002; KESSLER et al., 2000).

O estabelecimento de uma curva de calibração é a abordagem mais comum para uma quantificação relativa, e pode ser obtida entre a fluorescência acumulada nos produtos de PCR *versus* o número de ciclos. A quantificação absoluta também pode ser realizada por este método e requer que quantidades absolutas de uma amostra padrão sejam obtidas por métodos independentes (MACKAY, 2007).

O parâmetro mais importante para a quantificação é o valor do limiar de fluorescência do método. Esse limiar refere-se ao ciclo no qual a reação atinge o início da fase exponencial, ou seja, quando há aumento de sinal associado à formação exponencial do produto de PCR, e é denominado *Cycle Threshold* (Ct). A fluorescência emitida abaixo desse valor é considerada ruído de fundo (*background*). O valor de Ct sempre é calculado durante a fase exponencial da reação de amplificação e é fundamental para a construção da curva de calibração, na qual o eixo x corresponde ao *log* da concentração de DNA/RNA e o eixo y aos valores de Ct (MACKAY, 2007).

No Brasil, somente alguns laboratórios de pesquisa e centros de vigilância epidemiológica realizam diagnóstico laboratorial de meningites, com identificação do agente etiológico (MINISTÉRIO DA SAÚDE - BRASIL, 2008). No entanto, a maioria dos diagnósticos de meningites virais feitos são ainda realizados baseados apenas no diagnóstico clínico ou, em alguns casos, associados à análise físico-química do fluído cerebrospinal. Deste modo, o agente etiológico não é identificado e a doença é subnotificada, visto que, em se tratando de diagnóstico clínico, é verificado um número significativo de casos onde os sintomas se manifestam de forma incompleta ou atípica.

6 Conclusões

O Protocolo C de extração de ácidos nucleicos (kit DNA Qiablood) se mostrou mais sensível e específico quando comparado a outras técnicas de extração que utilizam fenol/clorofórmio ou tiocianato de guanidina;

A reação de PCR em tempo real foi mais sensível e específica na detecção de HSV nas amostras de líquido, porém a nested PCR se mostrou mais eficiente na detecção de enterovírus;

Cultivo viral e teste de neutralização não mostraram satisfatórios na detecção e sorotipagem de enterovírus;

Enterovírus foram os principais agentes etiológicos das meningites asséptica detectados nas amostras provenientes do Hospital Universitário da USP e do Laboratório Senne Líquor. Herpesvírus simples, vírus da varicela Zoster, vírus Epstein-Barr, HHV-6 e Adenovírus também foram detectados nas amostras de LCR;

A faixa-etária mais atingida pelos agentes etiológicos pesquisados foi aquela de 1 a 5 anos de idade, onde se concentraram 75% dos casos;

Com relação a sazonalidade, não observou-se meses ou estação de prevalência, já que os casos de meningite viral se distribuíram por todo o ano;

Echovirus 18 foi o sorotipo de enterovírus mais freqüente, seguido pelo sorotipo Coxsackievirus B5.

Referências Bibliográficas

Referências Bibliográficas

ABERLE, S. W.; MANDL, C. W.; KUNZ, C.; POPOW-KRAUPP, T. Presence of human herpesvirus 6 variants A and B in saliva and peripheral blood mononuclear cells of healthy adults. **J. Clin. Microbiol.**, v. 34, n.12, p. 3223-5, 1996.

ABERLE, S. W.; MANDL, C. W.; KUNZ, C.; POPOW-KRAUPP, T. Presence of human herpesvirus 6 variants A and B in saliva and peripheral blood mononuclear cells of healthy adults. **J. Clin. Microbiol.**, v. 34, n.12, p. 3223-5, 1996.

ABLASHI, D. V.; SALAHUDDIN, S. Z.; JOSEPHS, S. F.; IMAM, F.; LUSSO, P.; GALLO, R. C.; HUNG, C.; LEMP, J.; MARKHAM, P. D. HBLV (or HHV-6) in human cell lines. **Nature**, v. 329, n. 207, p. 17-23, 1987.

AHLFORS, K.; IVARSSON, S. A. Cytomegalovirus in breast milk Swedish milk donors. **Scand. J. Infect. Dis.**, v. 17, n. 1, p. 11-13, 1985.

AKASHI, K.; EIZURU, Y.; SUMIYOSHI, Y.; MINEMATSU, T.; HARA, S.; HARADA, M.; KIKUCHI, M.; NIHO, Y.; MINAMISHIMA, Y. Brief report: severe infectious mononucleosis-like syndrome and primary human herpesvirus 6 infection in an adult. **N. Engl. J. Med.**, v. 15, n. 329, p. 168-71, 1993.

AKIYOSHI, K.; NAKAGAWA, N.; SUGA, T. An outbreak of aseptic meningitis in a nursery school caused by echovirus type 30 in Kobe, Japan. **Jpn. J. Infect. Dis.**, v.1, n. 60, p. 66-68, 2007.

ALLARD, A.; ALBINSSON, B.; WADELL, G. Detection of adenoviruses in stools from healthy persons and patients with diarrhea by two-step polymerase chain reaction. **J. Med. Virol.**, v. 37, p. 149-157, 1992.

ALMEIDA, S. M.; NOGUEIRA, M. B.; RABONI, S. M.; VIDAL, L. R. Laboratorial diagnosis of lymphocytic meningitis. **Braz. Infect. Dis.**, v. 11, n. 5, p. 489-495, 2007.

De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS

NBR 6023: Informação e documentação – Referências – Elaboração. Rio de Janeiro – RJ: ABNT, 2000,22p.

ARCHIMBAUD, C.; CHAMBON, M.; BAILLY, J. L.; PETIT, I.; HENQUELL, C.; MIRAND, A.; AUBLET-CUVELIER, B.; UGHETTO, S.; BEYTOUT, J.; CLAVELOU, P.; LABBE, A.; PHILIPPE, P.; SCHMIDT, J.; REGAGNON, C.; TRAORE, O.; PEIGUE-LAFEUILLE, H. Impact of rapid enterovirus molecular diagnosis on the management of infants, children and adults with aseptic meningitis. **J. Med. Virol.**, v. 81, n. 1, p.42-48, 2009.

ARVIN, A. M. Varicella-zoster virus: molecular virology and virus-host interactions. **Curr. Opin. Microbiol.**, v. 4, p. 442-9, Review, 2001.

AVELLÓN, A.; RUBIO, G.; PALACIOS, G.; CASAS, I.; RABELLA, N.; REINA, G.; PÉREZ, C.; LIPKIN, W. I.; TRALLERO, G. Enterovirus 75 and aseptic meningitis, Spain, 2005. **Emerg. Infect. Dis.**, v. 12, n. 10, p.1609-11. 2006.

BACHMEYER, C.; DE LA BLANCHARDIÈRE, A.; LEPERCQ, J.; DHÔTE, R.; GRATEAU, G.; DETILLEUX, M.; TOURNAIRE, M.; CHRISTOFOROV, B. Recurring episodes of meningitis (Mollaret's meningitis) with one showing an association with herpes simplex virus type 2. **J. Infect.**, v. 32, p. 247-8, 1996.

BARNETT, E. M.; CASSELL, M. D.; PERLMAN, S. Two neurotropic viruses, herpes viruses, herpes simplex virus type 1 and mouse hepatitis, spread along different neural pathways from the main olfactory bulb. **Neuroscience**, v. 57, n. 4, p. 1007-25, 1993.

BERGELSON, J. M., CUNNINGHAM, J. A., DROGUETT, G., KURT-JONES, E. A., KRITHIVAS, A., HONG, J. S., HORWITZ, M. S., CROWELL, R. L., FINBERG, R. W. Isolation of a common receptor for coxsackie B viruses and adenoviruses 2 and 5. **Science**, v. 275, p. 1320-1323, 1997.

CABEÇAL, H. L. S.; GOMES, H. R.; MACHADO, L. R.; LIVRAMENTO, J. A. Dosage of lactate in the cerebrospinal fluid in infectious diseases of the central nervous system. **Arq. Neuropsiquiatr.**, v. 59, n. 4, p. 843-848, 2001.

CAVALVATI, G. T. Epidemiologia das meningites bacterianas e virais agudas ocorridas no instituto estadual de Infectologia São Sebastião- Rio de Janeiro. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública). Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 1997.

CALVARIO, A.; BOZZI, A.; SCARASCIULLI, M.; VENTOLA, C.; SECCIA, R.; STOMATI, D.; BRANCASI, B. Herpes consensus PCR test: a useful diagnostic approach to the screening of viral diseases of the central nervous system. **J. Clin. Virol.**, v. 1, n. 25, p. 71-78, 2002.

CAMPADELLI-FIUME, G.; MIRANDOLA, P.; MENOTTI, L. Human Herpesvirus 6: An emerging pathogen. **Emerg. Infect. Dis.** v. 5, n. 3, p. 353-366, 1999.

CASAS, I.; POZO, F.; TRALLERO, G.; ECHEVARRÍA, J. M.; TENORIO, A. Viral diagnosis of neurological infection by RT multiplex PCR: a search for entero- and herpesviruses in a prospective study. **J. Med. Virol.**, v. 57, n. 2, p. 145-51, 1999.

CASAS, I.; TENORIO, A.; ECHEVARRIA, J. M.; KLAPER, P. E.; CLEATOR, G. M. Detection of enteroviral RNA and specific DNA of herpesviruses by multiplex genome amplification. **J. Virol. Methods**, v. 66 p. 39-50, 1997.

CASERTA, M. T.; HALL, C. B.; SCHNABEL, K.; MCINTYRE, K.; LONG, C.; COSTANZO, M.; DEWHURST, S.; INSEL, R.; EPSTEIN, L. G. Neuroinvasion and persistence of human herpesvirus 6 in children. **J. Infect. Dis.**, v. 170, n. 6, p. 1586-9, 1994.

CENTRO DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLOGICA (SÃO PAULO). Disponível em: <<http://www.cev.saude.sp.gov.Br>>. Acesso em: 16 mar. 2007.

CHADWICK, D. R. Viral meningitis. **Br. Med. Bull.**, v. 10, n. 75-76, p.1-14, 2006, Review.
CHAKRAVARTI, A.; KASHYAP, B; MATLANI, M. Cytomeglovirus infection: an Indian perspective. **Indian. J. Med. Microbiol.**, v. 27, n. 1, p. 3-11, 2009.

CHAMBON, M.; ARCHIMBAUD, C.; BAILLY, J. L.; HENQUELL, C.; REGAGNON, C.; CHARBONNÉ, F.; PEIGUE-LAFEUILLE, H. Circulation of enteroviruses and persistence of meningitis cases in the winter of 1999-2000. **J. Med. Virol.**, v. 65, n. 2, p. 340-347, 2001.

CHESKY, M.; SCALCO, R.; FAILACE, L.; READ S.; JOBIM, L. F. Polymerase chain reaction for the laboratory diagnosis of aseptic meningitis and encephalitis. **Arq. Neuropsiquiatr.**, v. 58 n. 3B, p. 836-842, 2000.

CHOMCZYNSKI, P.; SACCHI, N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. **Anal. Biochem.**, n. 162, p. 158, 1987.

CHONMAITREE, T.; CONSTANCE, D.; BALDWIN, D.; LUCIA, H. L. Role of the virology laboratory in diagnosis and management of patients with central nervous system disease. **Clin. Microbiol.**, v. 2, n. 1, p. 1-14, 1989. Review.

CINQUE, P.; BOSSOLASCO, S.; LUNDKYSY, A. Molecular analysis of cerebrospinal fluid in viral diseases of the central nervous system. **J. Clin. Virol.**, v. 26, n. 1; p. 1-28, 2003, Review.

COHEN, C. J.; SHIEH, J. T.; PICKLES, R. J.; OKEGAWA, T.; HSIEH, J. T.; BERGELSON, J. M. The coxsackievirus and adenovirus receptor is a transmembrane component of the tight junction. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 18, n. 26, p. 15191-6, 2001.

COLIMON, R. Introduction to the virological diagnosis of the most frequent infections of the central nervous system. **J. Clin. Virol.**, v. 25, 2002.

CONE, R. W.; HUANG, M. L.; ASHLEY, R.; COREY, L. Human herpesvirus 6 DNA in peripheral blood cells and saliva from immunocompetent individuals. **J. Clin. Microbiol.**, v. 31, n. 5, p. 1262-7, 1993.

CRAWFORD-MIKSZA L, SCHNURR DP. Analysis of 15 adenovirus hexon proteins reveals the location and structure of seven hypervariable regions containing serotype-specific residues. **J. Virol.**, v. 70, p. 1836-1844, 1996.

CUENDE, J. I.; RUIZ, J.; CIVEIRA, M. P.; PRIETO, J. High prevalence of HHV-6 DNA in peripheral blood mononuclear cells of healthy individuals detected by nested-PCR. **J. Med. Virol.**, v.43, n. 2, p. 115-8, 1994.

DAGAN, R.; MENEGUS, M. A. A combination of four cell types for rapid detection of enteroviruses in clinical specimens. **J. Med. Virol.**, v. 19, n. 3, p. :219-28, 1986.

DALLDORF, G.; SICKLES, G. M. An unidentified, filterable agent isolated from the feces of children with paralysis. **Science.**, v. 16, n. 108, p. 61-62, 1948.

DAOUD, A. S.; AL-SHEYYAB, M.; BATCHOUN, R. G.; RAWASHDEH, M.O.; NUSSAIR, M.M.; PUGH, R. N. Bacterial meningitis still a cause of high mortality and severe neurological morbidity in childhood. **Trop. Pediatr.**, v. 41, n. 5, p.308-10, 1995.

DE MORAES, J. C.; BARATA, R. B. Meningococcal disease in São Paulo, Brazil, in the 20th century: epidemiological characteristics. **Cad. Saude Publica**, v. 21, n. 5, p. 1458-71, 2005.

DEBIASI, R. L.; KLEINSCHMIDT-DEMASTER, B. K.; WINBERG, A.; TYLER, K. L. Use of PCR for the diagnosis of herpesvirus infections of the central nervous system. **J. Clin. Virol.**, v. 25, n. 1, p. 5-11, 2002, Review.

DEPARTAMENTO DE INFORMÁTICA DO SISTEMA ÚNICO DE SAÚDE. Informações de saúde. Disponível em: <<http://www.datasus.gov.br>>. Acesso em 20 fev. 2008.

DI LUCA, D.; MIRANDOLA, P.; RAVAIOLI, T.; DOLCETTI, R.; FRIGATTI, A.; BOVENZI, P.; SIGHINOLFI, L.; MONINI, P.; CASSAI, E. Human herpesvirus 6 and 7 in salivary glands and shedding in saliva of healthy and human immunodeficiency virus positive individuals. **J. Med. Virol.**, v. 45, n. 4, p. 462-8, 1995.

DRAGO, F.; REBORA, A. The new herpesviruses: emerging pathogens of dermatological interest. **Arch. Dermatol.**, v. 135, n. 1, p. 71-75, 1999, Review.

DRAGO, L.; LOMBARDI, A.; DEVECCHI, E.; GIULIANI, G.; BATOLONI, R.; GISMONDO, M. R. Comparison of nested PCR and real time PCR of herpesvirus infections of central nervous system in HIV patients. **BMC Infect. Dis.**, v. 30, n. 4, p. 55, 2004.

DUBBERKE, E. R.; TU, B.; RIVET, D. J.; APISARNTHANARAK, A.; SCHMIDT, R. E.; WEISS, S.; POLISH, L. B. Acute meningoencephalitis caused by adenovirus serotype 26. **J. Neurovirol.**, v. 12, n. 3, p. 235-240, 2006.

DUELAND, A. N.; DEVLIN, M.; MARTIN, J. R.; MAHALINGAM, R.; COHRS, R.; MANZ, H.; TROMBLEY, I.; GILDEN, D. Fatal varicella-zoster virus meningoradiculitis without skin involvement. **Ann. Neurol.**, v. 29, n. 5, p. 569-72, 1991.

DWORSKY, M.; YOW, M.; STAGNO, S.; PASS, R. F.; ALFORD, C. Cytomegalovirus infection of breast milk and transmission in infancy. **Pediatrics**, v. 72, n. 3, p. 295-299, 1983.

ELNIFRO, E. M.; ASHSHI, A. M.; COOPER, R. J.; KLAPPER, P. E. Multiplex PCR: optimization and application in diagnostic virology. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 13, n. 4, p. 559-70, 2000, Review.

FEIGN, R. D.; SHACKELFORD, P. G. Value of repeated lumbar puncture in the differential diagnosis of meningitis. **N England J. Med.**, n. 289, p. 571, 1973.

FEUER, R.; MENA, I.; PAGARIGAN, R. R.; HARKINS, S.; HASSETT, D. E.; WHITTON, J. L. Coxsackievirus B3 and the neonatal CNS: the roles of stem cells, developing neurons, and apoptosis in infection, viral dissemination, and disease. **Am. J. Pathol.**, v. 163, n. 4, p. 1379-93, 2003.

FLOMENBERG, P.; GUTIERREZ, E.; PIASKOWSKI, V.; CASPER, J. T. Detection of adenovirus DNA in peripheral blood mononuclear cells by polymerase chain reaction assay. **J. Med. Virol.**, v. 51, n. 3, p. 182-8, 1997.

FOX, J. D; BRIGGS, M.; WARD, P. A.; TEDDER, R. S. Human herpesvirus 6 in salivary glands. **Lancet**, v. 8; n. 336, p. 590-3, 1990.

FRANZAN-ROHL, E.; TIVELJUNG-LINDELL, A.; GRILLNER, L.; AURELIUS, E. Increased detection rate in diagnosis of herpes simplex virus type 2 meningitis by real-time PCR using cerebrospinal fluid samples. **J. Clin. Microbiol.**; v. 45, n. 8, p. 2516-2520, 2007.

FUJIMOTO H, ASAOKA K, IMAIZUMI T, AYABE M, SHOJI H, KAJI M. Epstein-Barr virus infections of the central nervous system. **Intern. Med.**, n. 42, n. 1, p. 33-40, 2003.

FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE. Disponível no site: <<http://www.funasa.gov.br>>. Acesso em: 20 fev. 2008.

GARGES, H. P.; MOODY, M. A.; COTTON, C. M.; SMITH, P. B.; TIFFANY, K. F.; LENFESTEY, R.; LI, J. S.; FOWLER, V. G.; BENJAMIN D. K. Neonatal meningitis: what is the correlation among cerebrospinal fluids cultures, blood cultures, and cerebrospinal fluid parameters? **Pediatrics**, v. 117, p. 1094-1100, 2006.

GARNETT, C. T.; ERDMAN, D.; XU, W.; GOODING, L. R. Prevalence and quantitation of species C adenovirus DNA in human mucosal lymphocytes. **J. Virol.**, v. 76, n. 21, p. 10608-16, 2002.

GARNETT, C. T.; TALEKAR, G.; MAHR, J. A.; HUANG, W.; ZHANG, Y.; ORNELLES, D. A.; GOODING, L. R. Latent species C adenoviruses in human tonsil tissues. **J. Virol.**, v. 83, n. 6, p. 2417-28, 2009.

GOMES, M. L.; KOPECK, H.; LINHARES, A. C. Detection of enterovirus in cases of neurological disorders in the state of Pará, Brazil. **Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo.**, v. 43, n. 6, p. 321-324, 2001.

GOPAL, M. R.; THOMSON, B. J.; FOX, J.; TEDDER, R. S.; HONESS, R. W. Detection by PCR of HHV-6 and EBV DNA in blood and oropharynx of healthy adults and HIV-seropositives. **Lancet.**, n. 30, v. 335, p.1598-9, 1990.

GORDIS, L. **Epidemiology**. Updated 3 ed. Philadelphia: W. B. Saunders Company, 2004.

GRAHAM, A. K.; MURDOCH, D. R. Association between cerebrospinal fluid pleocytosis and enteroviral meningitis. **J. Clin. Microbiol.**, v. 43, n. 3, p. 1491, 2005.

GREGOIRE, S. M.; van PESCH, V.; GOFFETTE, S.; PEETERS, A.; SINDIC, C. J. Polymerase chain reaction analysis and oligoclonal antibody in the cerebrospinal fluid from 34 patients with varicella-zoster virus infection of the nervous system. **J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry.**, v. 77, n. 8, p. 938-942, 2006.

GUNEY, C.; OZKAYA, E.; YAPAR, M.; GUMUS, I.; KUBAR, A.; DOGANCI, L. Laboratory diagnosis of enteroviral infections of central nervous system by using a nested RT-polymerase chain reaction (PCR) assay. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 47, n. 4, p.557-62, 2003.

HALL, C. B.; LONG, C. E.; SCHNABEL, K. C.; CASERTA, M. T.; MCINTYRE, K. M.; COSTANZO, M. A; KNOTT, A.; DEWHURST, S.; INSEL, R. A.; EPSTEIN, L. G. Human herpesvirus-6 infection in children. A prospective study of complications and reactivation. **N Engl. J. Med.**, v. 18, n. 331, p. 432-8, 1994.

HARNETT, G. B.; FARR, T. J.; PIETROBONI, G. R.; BUCENS, M. R. Frequent shedding of human herpesvirus 6 in saliva. **J. Med. Virol.**, v. 30; n. 2, p. 128-30, 1990.

HORWITZ, M. S. Adenovirus immunoregulatory genes and their cellular targets. **Virology.**,v. 5, n. 279, p. 1-8, 2001, Review.

HOSOYA, M.; HONZUMI, K.; SATO, M.; KATAYOSE, M.; KATO, K.; SUZUKI, H. Application of PCR for various neurotropic viruses on the diagnosis of viral meningitis. **J. Clin. Virol.**, v. 20, n. 11, p. 117-124, 1998.

HUANG, L. M.; LEE, C. Y.; LEE, P. I.; CHEN, J. M.; WANG, P. J. Meningitis caused by human herpesvirus-6. **Arch. Dis. Child.**, v. 66, n. 12, p.1443-4, 1991.

HUANG, L. M.; KUO, P. F.; LEE, C. Y.; CHEN, J. Y.; LIU, M. Y.; TANG, C. S. Detection of human herpesvirus-6 DNA by polymerase chain reaction in serum or plasma. **J. Med. Virol.**, v. 38, p. 7-10, 1992.

HUKKANEN, V.; VUORINEN, T. Herpesviruses and enteroviruses in infections of the central nervous system: a study using time-resolved fluorometry PCR. **J. Clin. Virol.**, v. 25, n. 1, p. 87-94, 2002.

HYMAS, W. C.; ALDOUS, W. K.; TAGGART, E. W.; STEVENSON, J. B.; HILLYARD, D. R. Description and validation of a novel real-time RT-PCR enterovirus assay. *Clin. Chem.*, v. 54, n. 2, p. 406-13, 2008.

HYMAS, W. C.; ALDOUS, W. K.; TAGGART, E. W.; STEVENSON, J. B.; HILLYARD, D. R. Description and validation of a novel real-time RT-PCR enterovirus assay. **Clin. Chem.**, v. 54, n. 2, p. 406-413, 2007.

INTERNATIONAL COMITEE ON TAXONOMY OF VIROSES. Virus databases. available on line. Disponível no site: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/>>. Acesso em 28 fev. 2008.

IWAI, M.; YOSHIDA, H.; MATSUURA, K.; FUJIMOTO, T.; SHIMIZU, H.; NAGAI, Y. Molecular epidemiology of echoviruses 11 and 13, based on an environmental surveillance conducted in Toyama Prefecture, 2002-2003. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 72, n. 9, p. 6381-6387, 2006.

JEFFERY, K. J.; READ, S. J.; PETO, T. E.; MAYON-WHITE, R. T.; BANGHAM, C. R. Diagnosis of viral infections of the central nervous system: clinical interpretation of PCR results. **Lancet**, v. 1, n. 349, p. 313-7, 1997.

JEFFERY, K. J. M.; READ, S. J.; PETO, T. E. A.; MAYON-WHITE, R. T.; BANGHAM, C. R. M. Diagnosis of viral infections of the central nervous system: clinical interpretation of PCR results. **Lancet**, v. 349, p. 313-317, 1997.

JOHNSTON, S. L.; WELLENS, K.; SIEGAL, C. S. Rapid isolation of herpesvirus simplex virus by using mink lung and rhabdomyosarcoma cell cultures. **J. Clin. Microbiol.**, v. 28, n. 12, p. 2806-2807, 1990.

JOIA, A. E. B.; FIGUEIREDO, M. H.; SKRABA, I.; RIBEIRO, M. F.; RIBEIRETTE, M. R.; TAKEMURA, N. S.; MELO, V. O.; COSTA, E. V.; SILVA, E. E. .A large outbreak of aseptic meningitis caused by Echovirus 30 in Paraná, Brazil. **Virus Ver. Res.**, v. 141, 1999.

JUNKER, A. K.; TILLEY, P. Varicella-zoster virus antibody avidity and IgG-subclass patterns in children with recurrent chickenpox. **J. Med. Virol.**, v. 43, n. 2, p. 119-24, 1994.

KAMEI, S.; TAKASU, T. Nationwide survey of the annual prevalence of viral and other neurological infections in Japanese inpatients. **Intern. Med.**, v. 39, n. 11, p. 894-900, 2000.

KESSLER, H. H.; MUHLBAUER, G.; RINNER, B.; STELZL, E.; BERGER, A.; DORR, H. W.; SANTNER, B.; MARTH, E.; RABENAU, H. Detection of herpes simplex virus DNA by real-time PCR. **J. Clin. Microbiol.**, v. 38, n. 7, p. 2638-2642, 2000.

KEW, O. M.; MURLDERS, M. N.; LIPKAYA, G.YU.; da SILVA, E. E.; PALLANCH. Molecular epidemiology of poliovirus. **Semin. Virol.**, v. 6, p. 401-414, 1995.

KHETSURIANI, N.; LAMONTE-FOWLKES, A.; OBERST, S.; PALLANSCH, M. A. Centers for Disease Control and Prevention. Enterovirus surveillance--United States, 1970-2005. **M. M. W. R Surveill. Summ.**, v. 15, n. 55, p. 1-20, 2006.

KIMBERLIN, D. W. Herpes simplex virus infections in neonates and early childhood. **Semin. Pediatr. Infect. Dis.**, v. 16, n. 4, p.271-81, 2005, Review.

KIMBERLIN, D. Herpes simplex virus, meningitis and encephalitis in neonates. **HERPES** 11, 2004. Supplement 2.

KLEINSCHMIDT-DEMASTERS, B. K.; GILDEN, D. H. Varicella-Zoster virus infections of the nervous system: clinical and pathologic correlates. **Arch. Pathol. Lab. Med.**, v. 125, n. 6, p. 770-80, 2001, Review.

KOK, T. W.; PRYOR, T.; PAYNE, L. Comparison of rhabdomyosarcoma, buffalo green monkey kidney epithelial, A549 (human lung epithelial) cells and human embryonic lung fibroblasts for isolation of enteroviruses from clinical samples. **J. Clin. Virol.**, v. 11, n. 1, p. 61-65, 1998.

KONDO, K.; NAGAFUGI, H.; HATA, A.; TOMOMORI, C.; YAMANISHI, K. Association of human herpes virus 6 infection of the central nervous system with recurrence of febrile convulsions. **J. Infect. Dis.**, v. 167, p. 1197-1200, 1993.

KUPILA, L.; VOURINEN, T.; VAINIONPAA, R.; MARTTILA, R. J.; KOTILAINEN, P. Diagnosis of enteroviral meningitis by use of polymerase chain reaction of cerebrospinal fluid stool, and serum specimens. **Clin. Infect. Dis.**, v. 40, n. 7, p. 982-987, 2005.

LAMARÃO, L. M.; GOMES, M. L.; FERREIRA, C. M.; ARAUJO, L. C.; SANTANA, M. B.; TAVARES-NETO, J. Investigation of enterovirus in cases of aseptic meningitis syndrome of Belém, PA. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 38, n. 5, p. 391-395, 2005.

LANDRY, M. L. Frequency of normal cerebrospinal fluid protein level on leucocyte count in enterovirus meningitis. **J. Clin. Virol.**, v. 32, p. 73-74, 2005.

LEE, S. T.; KI, C. S.; LEE, N. Y. Molecular characterization of enteroviruses isolated from patients with aseptic meningitis in Korea, 2005. **Arch. Virol.**, v. 152, n. 5, p. 963-70, 2007.

LEMA, C. L.; CISTERNA, D. M.; FREIRE, M. C. Neurologic disease due to adenovirus infection. **Medicina, Buenos Aires**, v. 65, n. 3, p. 196-200, 2005.

LENNETT, E. H.; SCHIMIDT, N. J. **Diagnostic procedures for viral, rickettsial, and chlamydial infections**. Washington, DC: Editora: American Public Health Association, 1979, p. 229-249.

LEVY, J. A.; FERRO, F.; GREENSPAN, D.; LENNETTE, E. T. Frequent isolation of HHV-6 from saliva and high seroprevalence of the virus in the population. **Lancet**, v. 5, n. 335, p. 1047-50, 1990.

LU, X; ERDMAN, D.D. Molecular typing of human adenoviruses by PCR and sequencing of a partial region of the hexon gene. **Arch. Virol.**, v. 151, p. 1587-1602, 2006.

LUPPI, M.; MARASCA, R.; BAROZZI, P.; FERRARI, S.; CECCHERINI-NELLI, L.; BATONI, G.; MERELLI, E.; TORELLI, G. Three cases of human herpesvirus-6 latent infection: integration of viral genome in peripheral blood mononuclear cell DNA. **J. Med. Virol.**, v.40, n.1, p. 44-52, 1993.

LUSSO, P.; GALLO, R. C.; DEROCOCCO, S. E.; MARKHAM, P. D. CD4 is not the membrane receptor for HHV-6. **Lancet**, v. 1, n. 1, p. 730, 1989.

MACHADO, B. C.; FERREIRA, R. S.; CARMONA, R. C. C.; TIMENETSKY, M. C. S. T. Aseptic meningitis by Echovirus 30 in São Paulo state, Brazil. **Braz. J. Microbiol.**, v. 38, n. 97, p. 102, 2007.

MACKAY, I. M.; ARDEN, K. E.; NISTSHE, A. Real-time PCR in virology. **Nucleic. Acid. Res.**, v.15, n. 30, p. 1292-1305, 2002, Review.

MADHAVAN, H. N.; PRIYA, K.; ANAND, A. R.; THERESE, K. L. Detection of herpes simplex virus (HSV) genome using polymerase chain reaction (PCR) in clinical samples comparison of PCR with standard laboratory methods for the detection of HSV. **J. Clin. Virol.**, v. 14, n. 2, p. 145-51, 1999.

MARKOULATOS, P.; GEORGIOPOLOU, A.; SIAFAKAS, N.; PLAKOKEFALOS, E.; TZANAKI, G.; KOUREA-KREMASTINO, J. Laboratory diagnosis of common Herpesvirus infections of the Central Nervous System by a Multiplex PCR Assay. **J. Clin. Microbiol.**, v. 2001, p. 4426-4432, 2001.

MARY, R.; VEINBERG, F.; COUDERC, R. Acute meningitides acute phase proteins and procalcitonin. **Ann. Biol. Clin.**, v. 61, n. 2, p. 127-137, 2003, Review.

MATEU, M. Antibody recognition of picornaviruses and escape from neutralization: a structural view. **Virus Res.**, v. 38, p. 1-24, 1995.

MAUS, M. V.; POSENCHEG, M. A.; GEDDES, K.; ELKAN, M.; PEÑARANDA, S.; OBERSTE, M. S.; HODINKA, R. L. Detection of echovirus 18 in human breast milk. **J. Clin. Microbiol.**, v. 46, n. 3, p. 1137-40, 2008.

MENDONZA, L. P.; BRONZONI, R. V. M.; TAKAYANAGUI, O. M.; AQUINO, V. H.; FIGUEIREDO, L. T. M. Viral infections of the central nervous system in Brazil. **J. Infect.**, v. 54, p. 589-596, 2007.

METTENLEITER, T. C. Pathogenesis of neurotropic herpesviruses: role of viral glycoproteins in neuroinvasion and transneuronal spread. **Virus Res.**, v. 92, n. 2, p. 197-206, 2003, Review.

MICHELOW, I. C.; NICOL, M.; TIEMESSEN, C.; CHEZZI, C.; PETTIFOR, J. M. Value of cerebrospinal fluid leukocyte aggregation in distinguishing the causes of meningitis in children. **Pediatr. Infect. Dis.**, v. 19, n. 1, p. 66-72, 2000.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Disponível em: <<http://www.saude.gov.br>>. Acesso em 28 fev. de 2008.

MISTCHENKO, A. S.; VIEGAS, M.; LATTA, M. P.; BARRERO, P. R. Molecular and epidemiologic analysis of enterovirus B neurological infection in Argentine children. **J. Clin. Virol.**, v. 37, n.4, p. 293-9, 2006.

MUIR, P.; KÄMMERER, U.; KORN, K.; MULDER, M. N.; PÖYRY, T.; WEISSBRICH, B.; KANDOLF, R.; CLEATOR, G. M.; VAN LOON, A. M. Molecular typing of enteroviruses: current status and future requirements. The European Union Concerted Action on Virus Meningitis and Encephalitis. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 11, n. 1, p. 202-27. 1998, Review.

MUIR, P.; VAN LOON, A. M. Enterovirus infections of the central nervous system. **Intervirology**. 1997; v. 40, n. 2-3, p. 153-66, 1997, Review.

NAITO, K.; HASHIMOTO, T.; SHU-ICHI, I. Herpes simplex vírus type 1 meningoencephalitis showing disseminated cortical lesions. **Intern. Med.**, v. 46, n. 11, p. 761-763, 2007.

NASCIMENTO-CARVALHO, M. N.; MORENO-CARVALHO, A. O. Etiology of bacterial meningitis in a cohort from Salvador, Bahia. **Arq. Neuropsiquiatr.**, v. 56, n. 1, p. 83-87, 1998.

NICOLL, S.; BRASS, A.; CUBIE, H. A. Detection of herpes viruses in clinical samples using real-time PCR. **J. Virol. Methods**, v. 96, n. 1, p. 25-31, 2001.

NIEDERMAN, J. C.; LIU, C. R.; KAPLAN, M. H.; BROWN, N. A. Clinical and serological features of human herpesvirus 6 infection in three adults. **Lancet**, v. 8, n. 2, p. 817-9, 1988.

NIGROVIC, L. E.; KUPPERMANN, N.; MALLEY, R. Development and validation of a multivariable predictive model to distinguish bacterial from aseptic meningitis in children in the post-Haemophilus influenzae era. **Pediatrics**, v. 112, n. 2, p. 447-448, 2003.

NIX, A.; MAHER, K.; JOHANSSON, E.; NIKLASSON, B.; PALLANSCH, M.; OBERSTE, M. Detection of all known Parechovirus by real time PCR. **J. Clin. Microbiol.**, v. 46, n. 8, p. 2519-2524, 2008.

OBERSTE, M. S.; PALLANSCH, M. A. Establishing evidence for enterovirus infection in chronic disease. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, v. 1005, p. 23-31, 2003.

OBERSTE, M. S.; MICHELE, S. M.; MAHER, K.; SCHNURR, D.; CISTERNA, D.; JUNTILA, N.; UDDIN, M.; CHOMEL, J. J.; LAU, C. S.; RIDHA, W.; AL-BUSAIDY, S.; NORDER, H.; MAGNIUS, L. O.; PALLANSCH, M. A. Molecular identification and characterization of two proposed new enterovirus serotypes, EV74 and EV75. **J. Gen. Virol.**, v. 85, n. 11, p. 3205-12, 2004.

OBERSTE, M. S.; MAHER, K.; PALLANSCH. Molecular phylogeny of all human enterovirus serotypes based on comparison of sequences at the 5' end of the region encoding VP2. **Virus Res.**, v. 58, p. 35-43, 1998.

OBERSTE, S. M.; MAHER, K.; FLEMISTER, M.R.; MARCHETTI, G.; KILPATRICK D. R.; PALLANSCH, M. A. Comparison of classical and molecular approaches for the identification of untypeable enterovirus. **J. Clin. Microbiol.**, 1170-1174, 2000.

PALLANSCH, M.; ROOS, R. Enteroviruses: Polioviruses, Coxsackieviruses, Echoviruses, and Newer Enteroviruses. In: FIELDS, BN; KNIP, DM; HOWLEY, PM. **Fields virology**. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins Publishers, 2001. p. 589-631. v 1.

PALLANSCH, M. A.; OBERSTE, M. S. Coxsackievirus, Echovirus, and other enterovirus. In: GORGACH, S. C.; BARTLETT, J. G.; BACKLOW, N. R. **Infectious diseases**. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins Publishers, 2004, p. 2047-2051.

PASS, R.F. Cytomegalovirus. In: FIELDS, BN; KNIP, DM; HOWLEY, PM. **Fields virology**. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins Publishers, 2001. p. 2163-2188-631. v 2.

PELLETT, P. E.; BLACK, J. B.; YAMAMOTO, M. Human herpesvirus 6: the virus and the search for its role as a human pathogen. **Adv. Virus Res.** v. 41, p. 1-52, 1992, Review.

PRUKSANANONDA, P.; HALL, C. B.; INSEL, R. A.; MCINTYRE, K.; PELLETT, P. E.; LONG, C. E.; SCHNABEL, K. C.; PINCUS, P. H.; STAMEY, F. R.; DAMBAUGH, T. R. Primary human herpesvirus 6 infection in young children. **N. Engl. J. Med.**, v. 28, n. 326, p. 1445-50, 1992.

RAFAILIDIS, P. I.; MOURTZOUKOU, E. G.; VARBOBITIS, I. C.; FALAGAS, M. E. Severe cytomegalovirus infection in apparently immunocompetent patients: a systematic review. **Virol. J.**, v. 27, n. 5, p. 47, 2008, Review.

RAFAILIDIS, P. I.; KAPASKELIS, A.; FALAGAS, M. E. Cytomegalovirus meningitis in an immunocompetent patient. **Med. Sci. Monit.**, v. 13, n. 9, p. 107-109, 2009.

READ, S. J.; JEFFERY, J. M. K.; BANGHAM, C. R. M. Aseptic meningitis and encephalitis: the role of PCR in the diagnostic laboratory. **J. Clin. Microbiol.**, v. 35, n. 3, p. 691-696, 1997.

REINA, J.; FERRES, F.; TRALLERO, G. Isolation of enterovirus 75 in a child with a fever syndrome of unknown origin. **An. Pediatr., Barcelona**, v. 68, n. 6, p. 633-4, 2008.

REINA-GONZALÉS, G.; PEREZ-RUIZ, M.; AVELLON, A.; OTERO, A.; NAVARRO-MARI, J. Enterovirus 75, nuevo virus patógeno em nuestro medio. **Enferm. Infect. Microbiol. Clin.**, v. 25, n. 9, p. 566-569, 2007.

RICHTER, J.; KOPTIDES, D.; TRYFONOS, C.; CHRISTODOULOU, C. Molecular typing of enterovirus associated with viral meningitis in Cyprus, 200-2002. **J. Med. Microbiol.**, v. 55, p. 1035-1041, 2006.

ROBART, H. A. Enteroviral Infections of the central nervous system. **Clin. Infect. Dis.**, v. 20, p. 971- 981, 1995.

ROELVINK, P. W.; LIZONOVA, A.; LEE, J. G.; LI, Y.; BERGELSON, J. M.; FINBERG, R. W.; BROUGH, D. E.; KOVESDI, I.; WICKHAM, T. J. The coxsackievirus-adenovirus receptor protein can function as a cellular attachment protein for adenovirus serotypes from subgroups A, C, D, E, and F. **J. Virol.**, v. 72, p. 7909-7915, 1998.

ROIZMAN, B; KNIPE, D. M. Herpes virus simplex and their replication. In: FIELDS, BN; KNIP, DM; HOWLEY, PM. **Fields virology**. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins Publishers, 2001, p. 1940-1989. v. 2.

ROIZMAN, B.; PELLETT, P. E. The family Herpesviridae: a brief introduction. In: FIELDS, BN; KNIP, DM; HOWLEY, PM. **Fields virology**. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins Publishers, 2001, p. 1929-1939. v. 2.

ROOS, K. L. Viral meningitis. In: ROOS, K. L. **Principles of neurologic infectious diseases**. McGraw-Hill Professional, 2005. p. 55-65.

SALAHUDDIN, S. Z.; ABLASHI, D. V.; MARKHAM, P. D.; JOSEPHS, S. F.; STURZENEGGER, S.; KAPLAN, M.; HALLIGAN, G.; BIBERFELD, P.; WONG-STAAAL, F.; KRAMARSKY, B. Isolation of a new virus, HBLV, in patients with lymphoproliferative disorders. **Science**, v. 31, n. 234, p.596-601, 1986.

SANALIOS, R. B. **Análise comparativa das técnicas de imunofluorescência indireta, isolamento em cultura celular e reação em cadeia da polimerase, no diagnóstico de infecções respiratórias por adenovírus e vírus respiratório sincicial**. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2004.

SANTOS, G. P.; SKRABA, I.; OLIVEIRA D.; LIMA, A. A.; de MELO, M. M.; KMETZCH, C. I.; da COSTA, E. V.; da SILVA, E. E. Enterovirus meningitis in Brasil, 1998-2003. **J. Med. Virol.**, v. 78, n. 1, p. 98-104, 2006.

SECRETARIA DO ESTADO DA SAÚDE DE SÃO PAULO. Meningites virais. **Revista Saúde Pública**, v. 40, n. 4, p. 748-50. 2006.

SEEHUSSEN, D. A.; REEVES, M.M.; FOMIN, D.A. Cerebrospinal fluid analysis. **Am. Fam. Physician**, v. 68, n. 6, p. 1103-1107, 2003.

SHINAGAWA, M.; MATSUDA, A.; ISHIYAMA, T.; GOTO, H.; SATO, G. A rapid and simple method for preparation of adenovirus DNA from infected cells. **Microbiol. Immunol.**, v. 27, p. 817-822, 1983.

SILVA, H. R.; TANAJURA, G. M.; TAVARES-NETO, J.; GOMES, M. D.; LINHARES, A. D.; ADA, C.; VASCONCELOS, P. F.; KO, A. I. Aseptic meningitis syndrome due to enterovirus and *Leptospira* sp in children of Salvador, Bahia. **Rev. Soc. Brás. Méd. Trop.**, v. 35, n. 2, p. 159-65, 2002.

SIMKO, J. P.; CALIENDO, A. M.; HOGLE, K.; VERSALOVIC, J. Differences in laboratory findings for cerebrospinal fluid specimens obtained from patients with meningitis or encephalitis due to Herpes Simplex Virus (HSV) documented by detection of HSV DNA. **Clin. Infect. Dis.**, v. 35, p. 414-419, 2002.

SIRENA, D.; LILIENFELD, B.; EISENHUT, M.; KÄLIN, S.; BOUCKE, K.; BEERLI, R. R.; VOGT, L.; RUEDL, C.; BACHMANN, M. F.; GREBER, U. F.; HEMMI, S. The human membrane cofactor CD46 is a receptor for species B adenovirus serotype 3. **J Virol.** V. 78, p. 4454-4462, 2004.

SOBUE, R.; MIYAZAKI, H.; OKAMOTO, M.; HIRANO, M.; YOSHIKAWA, T.; SUGA, S.; ASANO, Y. Fulminant hepatitis in primary human herpesvirus-6 infection. **N. Engl. J. Med.** v. 2, n. 324, p. 1290, 1991.

STELLRECHT, K. A.; HARDING, I.; WORON, A. M.; LEPOW, M. L.; VENEZIA, R. A. The impact of an enteroviral RT-PCR assay on the diagnosis of aseptic meningitis and patient management. **J. Clin. Virol.**, v. 25, p. S19-S26, 2002.

TANG, Y. W.; HIBBS, J. R.; TAU, K. R.; QIAN, Q.; SKARHUS, H. A.; SMITH, T. F.; PERSING, D. H. Effective use of polymerase chain reaction for diagnosis of central nervous system infections. **Clin. Infect. Dis.**, v. 29, n. 4, p. 803-806, 1999.

TATARA, R.; IMAI, H. Serum C-reactive protein in the differential diagnosis of childhood meningitis. **Pediatrics**, v. 42, n. 5, p. 541-546, 2000.

TAVAKOLI, N. P.; NATTANMAI, S.; HULL, R.; FUSCO, H.; DZIGUA, L.; WANG, H.; DUPUIS, M. Detection and typing of human herpesvirus 6 by molecular methods in specimens from patients diagnosed with encephalitis or meningitis. **J. Clin. Microbiol.**, v. 45, n. 12, p. 3972-8, 2007.

TAVAZZI, E.; MINOLI, L.; FERRANTE, P.; SCAGNELLI, P.; DEL BUE, S.; ROMANI, A.; RAVAGLIA, S.; MARCHIONI, E. Varicela zoster virus meningo-encephalo-myelitis in an immunocompetent patient. **Neurol. Sci.**, v. 29; n. 4, p. 279-83. 2008.

THOMPSON, J. D.; HIGGINS, D. G.; GIBSON, T. J. Clustal W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Res.**, v. 11, n. 22, p. 4673-4680, 1994.

THOREN, A.; WIDELL, A. PCR for the diagnosis of enteroviral meningitis. **Scand. J. Infect. Dis.**, v. 26, n. 3, p. 249-254, 1994.

THORLEY B, KELLY H, NISHIMURA Y, YOON YK, BRUSSEN KA, ROBERTS J, SHIMIZU H. Oral poliovirus vaccine type 3 from a patient with transverse myelitis is neurovirulent in a transgenic mouse model. **J. Clin. Virol.**, v. 44, n. 4, p. 268-71, 2009.

TIEMESSEN, C. T.; KIDD, A. H. The subgroup F adenoviruses. **J. Gen. Virol.**, v. 76, p. 481-487, 1995.

TIRABASSI, R. S.; TOWNLEY, R. A.; ELDRIDGE, M. G.; ENQUIST, L. W. Molecular mechanisms of neurotropic herpesvirus invasion and spread in the CNS. **Neurosci. Biobehav. Rev.**, v. 22, n. 6, p. 709-720, 1998.

TRALLERO, G.; CASAS, I.; TENORIO, A.; ECHEVARRIA, J. E.; CASTELLANOS, A.; LOZANO, A.; BREÑA, P. P. Enteroviruses in Spain: virological and epidemiological studies over 10 years (1988-97). **Epidemiol. Infect.**, v. 124, n. 3, p. 497-506, 2000.

VAN VLIET, K. E; GILMAKER, M.; LEBON, P.; KLAPPER, P. E.; TAYLOR, C. E.; VAN LOON, A. M. Multicenter evaluation of the amplicor enterovirus PCR test with cerebrospinal fluid from patients with aseptic meningitis. **Clin. Microbiol.**, v. 36, n. 9, p. 2652-2657, 1998.

VERSTREPEN, W. A; KUHN, S.; KOCKX, M. M.; VAN DE VYVERE, M. E.; MERTENS, A. H. Rapid detection of enterovirus RNA in cerebrospinal fluid specimens with a novel single-tube real-time reverse transcription-PCR assay. **J. Clin. Microbiol.** v. 39, n. 11, p.4093-6, 2001.

VERSTREPEN, W. A.; BRUYNSEELS, P.; MERTENS, A. H. Evaluation of a rapid real-time RT-PCR assay for detection of enterovirus RNA in cerebrospinal fluid specimens. **J. Clin. Virol.**, v. 25, n. 1, p. 39-43, 2002. Supplement.

VIEIRA, J. F. Incidence of meningitis in patients 0-12 years old in the Instituto de Medicina Tropical de Manaus. **Arq. Neuropsiquiatr.**, v. 59, n. 2-A, p. 227-9, 2001.

VOLPI, A. Epstein-Barr virus and human herpesvirus type 8 infections of the central nervous system. **Herpes**, v. 11, n.2, p. 120A-127A, 2004, Review.

WADELL, G. Molecular epidemiology of human adenoviruses. **Curr. Top. Microbiol. Immunol.**, v. 110, p. 191-200, 1984.

WADELL, G. Adenoviruses. In: ZUCKERMAN, A. J.; BANATVALA, J. E.; PATTISON, J. R. **Principles and practice of Clinical Virology**. Chichester: Wiley, 2000. p. 301-3274.

WHITLEY, R. J. Herpes simplex encephalitis: adolescents and adults. **Antiviral Res.**, v. 71, n. 2-3, p. 141-8, 2006, Review.

WHITLEY, R. J. Herpes Simplex Viruses. In: FIELDS, BN; KNIP, DM; HOWLEY, PM. **Fields virology**. Philadelphia: Lippincott Williams & WilkinsPublishers, 2001. p. 1990-2030. v 1.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Data and statistics**. Disponível em: <<http://www.who.int/en>>. Acesso em: 24 mar. 2008.

YOSHIKAWA, T. Newly discovered human herpesviruses: pathogenesis and treatments for central nervous system infection due to HHV-6. **Rinsho Shinkeigaku**, v. 44, n. 11, p. 849-51, 2004, Review.

YOSHIKAWA, T.; IHIRA, M.; SUZUKI, K.; SUGA, S.; MATSUBARA, T.; FURUKAWA, S.; ASANO, Y. Invasion by human herpesvirus 6 and human herpesvirus 7 of the central nervous system in patients with neurological signs and symptoms. **Arch. Dis. Child.**, v. 83, p. 170-171, 2000.