

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**  
**FACULDADE DE MEDICINA**

**HEUDER GUSTAVO OLIVEIRA PAIÃO**

**Caracterização molecular de isolados do vírus Varicela Zoster em amostras de líquido cefalorraquidiano de pacientes com quadro de meningite, encefalite ou meningoencefalite aguda**

**São Paulo**

**2023**

**Heuder Gustavo Oliveira Paião**

**Caracterização molecular de isolados do vírus Varicela Zoster em amostras de líquido cefalorraquidiano de pacientes com quadro de meningite, encefalite ou meningoencefalite aguda**

Dissertação apresentada à Faculdade de  
Medicina da Universidade de São Paulo  
para obtenção do título de Mestre em  
Ciências

Programa de Doenças Infecciosas e  
Parasitárias

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Maria Cássia  
Mendes Correa

**São Paulo**

**2023**

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)**

Preparada pela Biblioteca da  
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Paião, Heuder Gustavo Oliveira  
Caracterização molecular de isolados do vírus  
Varicela Zoster em amostras de líquido  
cefalorraquidiano de pacientes com quadro de  
meningite, encefalite ou meningoencefalite aguda /  
Heuder Gustavo Oliveira Paião. -- São Paulo, 2023.  
Dissertação (mestrado)--Faculdade de Medicina da  
Universidade de São Paulo.  
Programa de Doenças Infecciosas e Parasitárias.  
Orientadora: Maria Cássia Mendes Corrêa.

Descritores: 1.Herpesvirus humano 3 2.Sistema  
nervoso central 3.Epidemiologia molecular 4.Reação  
em cadeia da polimerase em tempo real  
5.Sequenciamento massivo paralelo

USP/FM/DBD-103/23

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

## **DEDICATÓRIA**

Aos meus pais, João e Neusa

Ao meu irmão Eder (*in memoriam*)

Aos meus sobrinhos

Aos amigos da vida, Eliene, Vitor e Caio

## AGRADECIMENTOS

À minha prezada orientadora Dra. Maria Cássia Mendes-Correa, pelo seu espírito crítico e científico, pelo companheirismo, orientação durante todo o projeto e por sempre se preocupar comigo nos âmbitos profissional e pessoal.

À minha supervisora Dra. Tânia Regina Tozetto-Mendoza pelo suporte, ensinamentos e orientações imprescindíveis à realização do projeto e por todas as oportunidades oferecidas a mim desde o início de minha caminhada acadêmica.

À toda equipe de funcionários do laboratório de virologia.

Aos amigos do laboratório de virologia, em especial Almir, Giovana Caleiro, Layla, Rodrigo Melim e Natan.

À equipe da Divisão de Liquor do Laboratório Central do HC-FMUSP, coordenada pelo Dr Hélio Rodrigues Gomes.

À equipe do laboratório Senne Liquor, em especial ao Dr Renan Barros, Dr Fernando Brunale e Dr Carlos Augusto Senne.

Ao laboratório de Imunopatologia do HC-FMUSP, em especial ao Dr. Hebert Fabrício Culler e à professora Dra. Juliana Pereira.

Ao Dr Antônio Charlys e à Dra. Camila Romano pelo auxílio e orientação nas etapas de análises filogenéticas.

À toda equipe do MENC, em especial Noely Evangelista, Sílvia Helena, Maria Laura, Bianca Santos, Dra. Maria Cristina Fink (*in memoriam*) e Dr. Gustavo Bruniera.

Ao programa de pós-graduação em Doenças Infecciosas e Parasitárias da FMUSP.

Ao CNPq, à FAPESP e ao LIM-52 do Hospital das Clínicas da FMUSP, pelo apoio financeiro durante a realização do projeto.

## RESUMO

Paião HGO. Caracterização molecular de isolados do vírus Varicela Zoster em amostras de líquido cefalorraquidiano de pacientes com quadro de meningite, encefalite ou meningoencefalite aguda [dissertação]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina; 2023.

**Introdução:** O vírus varicela zoster (VZV) é classificado como herpes vírus humano do tipo 3 (HHV-3). Seu genoma de DNA dupla fita possui 125 pb. Atualmente são descritos nove clados de VZV. É agente causador da varicela e, em caso de reativação, do herpes zoster. As complicações mais graves, em ambas situações clínicas, são associadas ao envolvimento do sistema nervoso central (SNC), entre eles os quadros agudos de meningite, encefalite e/ou meningoencefalite (MEM). A dificuldade de acesso a técnicas laboratoriais sensíveis na rede pública de saúde constitui fator limitante para a caracterização diagnóstica, da prevalência e da epidemiologia molecular do VZV em nosso meio. Desta forma, são escassos os estudos a este respeito no Brasil, a despeito de sua importância para o cenário de saúde pública global e local. **Objetivos:** 1- Avaliar o desempenho de um teste de PCR em tempo real *in-house* e validá-lo para a sua aplicação na detecção do DNA de VZV em LCR; 2- Caracterizar os isolados de VZV identificados para discriminação da presença do vírus vacinal ou vírus selvagem; 3- Caracterizar os isolados identificados para a classificação filogenética de seus clados. **Material e Métodos:** As amostras analisadas neste estudo são parte de um projeto maior que incluiu 600 casos de MEM aguda da cidade de São Paulo, Brazil, coletados entre fevereiro de 2018 e dezembro de 2019. Para validar e avaliar a sensibilidade analítica e desempenho do teste *in-house*, um painel de controles de VZV no LCR previamente testados por plataformas diagnósticas de referência e controles sintéticos com concentração conhecida foram usados. Para a discriminação da presença do vírus selvagem ou vacinal, a metodologia utilizada baseou-se na detecção de um SNP na região 107252 do genoma do VZV, por PCR em tempo real. Para classificação filogenética dos clados, utilizou-se amplificação das sequências de DNA de VZV de quatro ORFs do genoma viral, a saber: 22, 38, 54 e 62, pelo método de Sanger (MS) e complementarmente utilizou-se o método de sequenciamento massivo paralelo (SMP). **Resultados:** Dentre

todas as amostras analisadas foram identificados 30 casos de MEM por VZV, 5% (30/600) dos casos incluídos no projeto inicial. O desempenho do teste *in-house* para VZV foi satisfatório e sua sensibilidade analítica foi < 5 cópias por reação. Casos de VZV de origem vacinal não foram identificados. Em 40% (12/30) das amostras analisadas, foi possível a identificação dos clados envolvidos, a saber: clado 1 (5/12), clado 2 (3/12), clado 3 (1/12), clado 5 (2/12) e clado 6 (1/12) pelo MS. O método de SMP adaptado foi responsável pela identificação de apenas um único isolado de VZV entre todas as amostras disponíveis (28). Por SMP identificamos amostras sugestivas da presença de coinfeção com outros patógenos. **Conclusões:** O teste de PCR em tempo real *in-house* desenvolvido apresentou desempenho satisfatório em termos de eficiência e sensibilidade analítica, constituindo-se assim uma ferramenta diagnóstica adequada para a identificação do VZV em amostras de LCR, em locais de menor acesso às plataformas comerciais já disponíveis. Nas amostras analisadas não fomos capazes de identificar a presença de vírus vacinal e conseguimos identificar a presença do clado 2, pela primeira vez na América Latina e do clado 6, pela primeira vez em nosso país. O método de SMP adaptado não atendeu às expectativas de complementação na caracterização molecular em relação ao MS nas amostras analisadas.

**Palavras-chave:** Herpesvírus humano 3. Sistema nervoso central. Epidemiologia molecular. Reação em cadeia da polimerase em tempo real. Sequenciamento massivo paralelo.

## ABSTRACT

Paião HGO. Molecular characterization of Varicella Zoster Virus isolates in cerebrospinal fluid samples from patients presenting acute infectious meningitis, encephalitis or meningoencephalitis [dissertation]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina; 2023.

**Introduction:** Varicella Zoster Virus (VZV) is classified as human herpesvirus type (HHV-3). Its double stranded DNA genome comprises 125 kb. Currently, nine clades are described. It is the etiologic agent of varicella and, in case of reactivation, of herpes zoster. The most severe complications, in both clinical presentations, are the ones involving central nervous system (CNS), among them, cases of acute meningitis, encephalitis and/or meningoencephalitis (MEM). Difficulty in accessing diagnostic tests with adequate sensitivity and specificity in the Brazilian public health system for VZV is a limiting factor for the diagnostic characterization and molecular epidemiology of VZV in different regions of our country. As a consequence, there are few studies in this regard in Brazil, despite its importance for the global and local public health scenario. **Objectives:** 1- To evaluate the performance of an in-house real-time PCR test and to validate it for its application in the detection of VZV DNA in CSF; 2- To characterize the identified VZV isolates to differentiate VZV vaccine strains from wild-type strains; 3- To characterize the identified VZV isolates to determine the phylogenetic classification of their clades. **Material and Methods:** The samples analyzed in this study are part of a larger study that included 600 cases of acute MEM from the city of São Paulo, Brazil and were collected between February 2018 and December 2019. For validation and evaluation of the analytical sensitivity and performance of the in-house test, a panel of VZV controls in the CSF, previously tested by reference diagnostic platforms and synthetic controls with known concentration, were used. For the differentiation of VZV vaccine strains from wild-type strains, the methodology used was based on the detection of SNPs in the 107252 region of the VZV genome, by real-time PCR. For the phylogenetic classification of the clades, amplification of the VZV DNA sequences of four ORFs of the viral genome, namely, 22, 38, 58 and 62, was used by Sanger method (SM) and, complementarily, by the massive parallel sequencing (MPS) method. **Results:** Among all analyzed samples,



30 cases of VZV MEM were identified, 5% (30/600) of included cases in the initial study. The performance of the in-house test for VZV was satisfactory and its analytical sensibility was < 5 copies per reaction. VZV vaccine strains were not identified. In 40% (12/30) of all analyzed samples, we were able to identify the evolved clades, as follows: clade 1 (5/12), clade 2 (3/12), clade 3 (1/12), clade 5 (2/12) and clade 6 (1/12), by SM. The adapted SMP method was responsible for identifying only a single VZV isolate among all (28) available samples. By using SMP we were able to identify samples suggestive of the presence of co-infection with other pathogens, among the analyzed samples. **Conclusions:** The in-house real-time PCR test, performed satisfactorily in terms of efficiency and analytical sensitivity, thus constituting an adequate diagnostic tool for the identification of VZV in CSF samples, in places with less access to commercial platforms already available for VZV detection. In the analyzed samples, we were not able to identify the presence of VZV vaccine strains and we were able to identify the presence of clade 2, for the first time in Latin America, and clade 6, for the first time in our country. The adapted MPS method did not meet the expectations of diagnostic complementation in relation to the SM in the analyzed samples.

**Keywords:** Herpesvirus 3, human. Central nervous system. Molecular epidemiology. Real-time polymerase chain reaction. Massive parallel sequencing.

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Descrição de algumas ORFs do VZV, seus respectivos produtos gênicos e funções biológicas relacionadas a estes .....	25
Tabela 2 - Números absolutos e incidência das admissões de varicela em pacientes menores de 20 anos durante o período pré (2003-2012) e pós-vacinação .....	38
Tabela 3 - Número de casos de meningite viral notificados no Brasil, separados por sexo e por período, compreendendo os anos de 2012 a 2021 .....	40
Tabela 4 - Estudos epidemiológicos acerca da prevalência de MEM por VZV em alguns países do mundo .....	41
Tabela 5 - Número de casos de meningite assépticas na cidade de São Paulo, por ano, entre os períodos de 2011 a 2019.....	42
Tabela 6 - Distribuição da incidência, por faixa etária, de casos de meningite por VZV, nos períodos pré (2010 – 2013) e pós-vacinação (2014 – 2019) ..	43
Tabela 7 - Predominância dos diferentes clados do VZV nos diferentes continentes do mundo .....	45
Tabela 8 - Sequências de primers e sonda para detecção do VZV .....	53
Tabela 9 - Sequência de oligonucleotídeo sintético .....	54
Tabela 10 - Protocolo da termociclagem da PCR em tempo real para VZV .....	56
Tabela 11 - Sequência de primers e sondas sintetizados para utilização no processo de diferenciação entre isolado selvagem e vacinal, de acordo com o proposto por Campsall et al.....	61
Tabela 12 - Sequência de primers sintetizados para utilização no processo de classificação genotípica .....	62
Tabela 13 - Características demográficas e clínicas dos indivíduos com MEM infecciosa aguda .....	72
Tabela 14 - Parâmetros laboratoriais do LCR de indivíduos com MEM infecciosa aguda .....	73
Tabela 15 - Parâmetros de eficiência do teste de PCR em tempo real in house .....	75
Tabela 16 - Valor de Ct, média, desvio padrão e coeficiente de variação em porcentagem das réplicas do ponto de menor diluição da curva padrão	76
Tabela 17 - Ct, média, desvio padrão e coeficiente de variação das réplicas dos pontos de diluição da curva sintética em relação a variação intra-teste.	77

Tabela 18 - Ct, média, desvio padrão e coeficiente de variação em porcentagem das réplicas do ponto da curva sintética em relação a variação inter-teste ..	79
Tabela 19 - Distribuição do número de amostras controles conforme suas respectivas plataformas e a concordância (%) com PCR in house .....	80
Tabela 20 - Relação das regiões amplificadas em cada uma das amostras positivas .....	83
Tabela 21 - Relação de gêneros virais detectados, a partir do alinhamento de sequencias de AAs e as respectivas quantidades de reads obtidas .....	91

## LISTA DE QUADROS

- Quadro 1 - Taxas de similaridade nucleotídica dos isolados de VZV em comparação a algumas sequências protótipos, pertencentes a diferentes clados .....93
- Quadro 2 - Substituições nucleotídicas observadas nos alinhamentos das ORFs 22, 38, 54 e 62 com uso do software Seaview V.5.0.4.....95

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Representação da estrutura genômica do VZV.....	24
Figura 2 -	Sistema de nomenclatura proposto para o agrupamento de genótipos do VZV, em conformidade ao ENVZV .....	28
Figura 3 -	Lesões de varicela e HZ.....	34
Figura 4 -	Fluxograma de etapas desde o estabelecimento do diagnóstico do quadro de MEM infecciosa aguda até a investigação etiológica em amostras de LCR .....	52
Figura 5 -	Diluição seriada na base 10 do oligonucleotídeo sintético em tampão Tris-EDTA.....	54
Figura 6 -	Fluxograma das etapas de caracterização molecular dos isolados de VZV nos 30 casos incluídos neste estudo.....	60
Figura 7 -	Prevalência do VZV dentre os casos de MEM infecciosa aguda diagnosticados em unidades hospitalares de diferentes complexidades	71
Figura 8 -	Plot de amplificação de oligos sintéticos de VZV em pontos de diluição na base 10 .....	74
Figura 9 -	Curva padrão - relação entre Ct (Cycle threshold) e carga viral – PCR in house para VZV .....	75
Figura 10 -	Plot de amplificação das réplicas (triplicatas) para análise da variação intra-teste .....	78
Figura 11 -	Amplificação de DNA de isolados de VZV partir de uma amostra de cultura de vírus vacinal pela sonda O-VZ62T (amarelo) e de uma amostra de LCR com presença de isolado selvagem detectada pela sonda WT-VZ62T (verde).....	81
Figura 12 -	Padrão de migração por eletroforese em gel de agarose a 1,5% de fragmentos do de DNA de VZV da amostra VZV016, a saber: ORF22, 22, 38, 54 e 62 com tamanhos de 447, 350, 222 e 419 pb, respectivamente .....	84

Figura 13 - Semi-quantificação de DNA de amostra positiva para VZV com marcador de massa molecular (LM) após eletroforese em gel de agarose a 1,5% sob transiluminação ultravioleta .....	85
Figura 14 - Eletroferograma analisado com o software Codon Code Aligner .....	85
Figura 15 - Apresentação ilustrativa do alinhamento dos isolados de VZV obtidos nas amostras de LCR com sequências protótipos depositadas no GenBank .....	86
Figura 16 - Árvore filogenética reconstruída por NJ .....	87
Figura 17 - Curva de amplificação dos padrões de quantificação e reta de regressão .....	88
Figura 18 - Padrão de corrida eletroforética do pool em comparação ao peso molecular de 100pb (1) e a distribuição e quantidade dos tamanhos de fragmentos presentes no pool (2).....	89
Figura 19 - Padrão de corrida eletroforética do pool em comparação ao peso molecular de 100pb (1) e a distribuição e quantidade dos tamanhos de fragmentos presentes no pool (2), após seleção de fragmentos de interesse via sistema Pippin prep.....	90
Figura 20 - Proporção de famílias virais detectadas na amostra VZV012 após reação de SMP e alinhamento de nucleotídeos.....	91
Figura 21 - Frequência dos tamanhos de fragmentos das sequências compatíveis ao VZV obtidas após reação de SMP na amostra VZV012.....	92

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AA	aminoácido
CMV	Citomegalovírus
COVISA	Coordenadoria de Vigilância em Saúde
Cq	Ciclo de quantificação
Ct	<i>Cycle threshold</i>
CV	Coeficiente de variação
DATASUS	Departamento de informática do Sistema Único de Saúde
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DP	Desvio padrão
EBV	Vírus Epstein-Barr
ENVZV	Encontro para Nomenclatura do VZV
GTG	Gânglio trigeminal
HAdv	Adenovírus humano
HC-FMUSP	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
HHV-3	Herpes vírus humano tipo 3
HHV-6	Herpes vírus humano tipo 6
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
HSV-1	Herpes vírus humano tipo 1
HSV-2	Herpes vírus humano tipo 2
HZ	Herpes zoster
IgG	Imunoglobulina G
IR	Região invertida

LCR	Líquido cefalorraquidiano
LM	<i>Low Mass DNA Ladder</i>
LoD	<i>Low Detection</i>
LSL	Laboratório Senne Liquor
LV-IMT	Laboratório de virologia do Instituto de Medicina Tropical da Universidade de São Paulo
MEM	Meningite(s), encefalite(s) e meningoencefalite(s)
MS	Metodologia de Sanger
NJ	<i>Neighbor joining</i>
NNI	<i>Neighbor nearest interchange</i>
nt	nucleotídeo
NTC	Controle sem <i>template</i> [ <i>Non template control</i> ]
ORF	Fase de leitura aberta [ <i>Open reading frame</i> ]
ORiS	Origem de replicação
pb	Pares de base
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PM	Peso molecular
pM	Pico molar
REDCap	<i>Research Electronic Data Capture</i>
RFLP	Técnica de polimorfismo de comprimento de fragmento de limitação
RGD	raiz dos gânglios dorsais
RNA	Ácido ribonucleico
SES	Secretaria de Saúde do Estado de São Paulo
SINAN	Sistema de Informação de Agravos de Notificação
SMF	Sistema mononuclear fagocitário
SMP	Sequenciamento Massivo Paralelo



SNC	Sistema nervoso central
SNP	Polimorfismo de nucleotídeo único
TALV	Transcritos associados à latência do VZV
vOka	Estirpe vacinal vOka

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>22</b>
1.1	ASPECTOS GERAIS .....	22
1.2	ESTRUTURA VIRAL E MOLECULAR.....	22
<b>1.2.1</b>	<b>Ciclo viral .....</b>	<b>26</b>
1.3	CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR .....	27
<b>1.3.1</b>	<b>Genótipos e clados .....</b>	<b>27</b>
<b>1.3.2</b>	<b>Processos de variações, recombinações e mutações.....</b>	<b>29</b>
<b>1.3.3</b>	<b>Vírus vacinal .....</b>	<b>29</b>
1.4	HISTÓRIA NATURAL DA INFECÇÃO PELO VÍRUS VARICELA ZOSTER.....	30
<b>1.4.1</b>	<b>Varicela.....</b>	<b>30</b>
<b>1.4.2</b>	<b>Latência.....</b>	<b>32</b>
<b>1.4.3</b>	<b>Reativação e manifestações clínicas associadas .....</b>	<b>33</b>
1.4.3.1	Meningites, encefalites e meningoencefalites .....	34
1.5	DIAGNÓSTICO DO VÍRUS VARICELA ZOSTER E ASPECTOS LABORATORIAIS.....	36
1.6	EPIDEMIOLOGIA.....	37
<b>1.6.1</b>	<b>Epidemiologia da varicela.....</b>	<b>37</b>
<b>1.6.2</b>	<b>Epidemiologia do herpes zoster .....</b>	<b>39</b>
<b>1.6.3</b>	<b>Epidemiologia das meningites virais no Brasil e no mundo .....</b>	<b>39</b>
1.6.3.1	Epidemiologia das meningites virais na cidade de São Paulo.....	41
<b>1.6.4</b>	<b>Epidemiologia molecular do VZV.....</b>	<b>43</b>
1.7	VACINAÇÃO PARA VARICELA E HERPES ZOSTER .....	46
<b>2</b>	<b>JUSTIFICATIVA.....</b>	<b>47</b>
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>49</b>

3.1	OBJETIVO GERAL.....	49
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	49
<b>4</b>	<b>MATERIAL E METÓDOS.....</b>	<b>50</b>
4.1	DESENHO DO ESTUDO.....	50
4.2	POPULAÇÃO DE ESTUDO .....	50
4.3	PERÍODO DO ESTUDO E SELEÇÃO DOS PACIENTES.....	51
<b>4.3.1</b>	<b>Critérios de inclusão dos casos de MEM .....</b>	<b>51</b>
4.4	INSTRUMENTOS DE COLETA DE DADOS.....	51
4.5	PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS .....	51
4.6	AVALIAÇÃO DA PCR EM TEMPO REAL <i>IN HOUSE</i> PARA DETECÇÃO DO DNA VIRAL DE VZV EM AMOSTRAS DE LCR .....	53
<b>4.6.1</b>	<b><i>Primers</i> e sondas.....</b>	<b>53</b>
<b>4.6.2</b>	<b>Oligonucleotídeos sintéticos e controles de reação .....</b>	<b>53</b>
<b>4.6.3</b>	<b>Protocolo da mistura de PCR em tempo real.....</b>	<b>55</b>
<b>4.6.4</b>	<b>Protocolo de termociclagem .....</b>	<b>56</b>
<b>4.6.5</b>	<b>Parâmetros de desempenho do teste PCR <i>in house</i>.....</b>	<b>56</b>
4.6.5.1	Relação Ct e carga viral .....	56
4.6.5.2	Sensibilidade analítica .....	58
4.6.5.3	Variação intra e inter-teste.....	58
4.7	EXTRAÇÃO DE ÁCIDOS NUCLEICOS .....	58
4.8	PCR <i>IN HOUSE</i> PARA VZV NO LCR .....	59
<b>4.8.1</b>	<b>Validação da PCR <i>in house</i> para VZV em LCR e investigação etiológica .....</b>	<b>59</b>
4.9	CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DOS ISOLADOS DE VZV .....	59
<b>4.9.1</b>	<b>Diferenciação de isolado vacinal e selvagem .....</b>	<b>60</b>
<b>4.9.2</b>	<b>Sequenciamento pela metodologia de Sanger .....</b>	<b>61</b>
4.9.2.1	Amplificação das ORFs 22, 38, 54 e 62 .....	61

4.9.2.2	Identificação dos fragmentos de DNA alvo em gel de agarose .....	63
4.9.2.3	Purificação das amostras e reação de sequenciamento pelo método de Sanger .....	63
4.9.2.3.1	<i>Qualidade das sequências, alinhamento e geração de sequências consenso</i> .....	64
<b>4.9.3</b>	<b>Sequenciamento de DNA por sequenciamento massivo paralelo .....</b>	<b>65</b>
4.9.3.1	Protocolo Nextera XT adaptado, purificação e quantificação .....	65
4.9.3.2	Normalização das bibliotecas, preparação de <i>pool</i> de amostras e controle de qualidade .....	66
4.9.3.3	Sequenciamento massivo paralelo (Illumina® Inc).....	67
4.9.3.4	Qualidade das sequências, alinhamento de aminoácidos e pré-identificação .....	67
<b>4.9.4</b>	<b>Classificação filogenética.....</b>	<b>68</b>
<b>4.9.5</b>	<b>Análise de similaridade nucleotídica e sequência de aminoácidos ....</b>	<b>69</b>
<b>4.9.6</b>	<b>Sequências protótipos depositadas no GenBank .....</b>	<b>69</b>
4.10	CONSIDERAÇÕES ÉTICAS .....	69
4.11	REVISÕES BIBLIOGRÁFICAS .....	70
<b>5</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>71</b>
5.1	CARACTERÍSTICAS DA POPULAÇÃO DO ESTUDO .....	71
5.2	AVALIAÇÃO DA PCR EM TEMPO REAL <i>IN HOUSE</i> .....	74
<b>5.2.1</b>	<b>Curva sintética e desempenho do teste .....</b>	<b>74</b>
<b>5.2.2</b>	<b>Sensibilidade analítica (LoD 95%).....</b>	<b>76</b>
<b>5.2.3</b>	<b>Variação intra e inter-teste.....</b>	<b>77</b>
<b>5.2.4</b>	<b>Avaliação da qualidade da extração de DNA das amostras de LCR para aplicação na PCR em tempo real <i>in house</i>.....</b>	<b>80</b>
<b>5.2.5</b>	<b>Concordância entre PCR <i>in house</i> para identificação de VZV e plataformas comerciais na inclusão de casos.....</b>	<b>80</b>
5.3	CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DOS ISOLADOS DE VZV .....	81

<b>5.3.1</b>	<b>Diferenciação entre isolado vacinal e selvagem .....</b>	<b>81</b>
<b>5.3.2</b>	<b>Sequenciamento pela metodologia de Sanger .....</b>	<b>82</b>
5.3.2.1	Amplificação das ORFs 22, 38, 54 e 62 e identificação dos fragmentos em gel de agarose.....	82
5.3.2.2	Purificação e reação de sequenciamento.....	84
5.3.2.3	Alinhamento com sequências protótipos e classificação filogenética.....	85
<b>5.3.3</b>	<b>Sequenciamento massivo paralelo adaptado (Illumina® Inc) .....</b>	<b>88</b>
5.3.3.1	Preparo e quantificação de bibliotecas e controle de qualidade.....	88
5.3.3.2	Análise <i>reads</i> , alinhamento de aminoácidos e alinhamento de nucleotídeos ( <i>de novo</i> ) .....	90
5.3.3.3	Cobertura genômica .....	92
<b>5.3.4</b>	<b>Análise de similaridade nucleotídica e sequência de aminoácidos ....</b>	<b>93</b>
5.3.4.1	Sequências obtidas pela metodologia de Sanger.....	93
<b>6</b>	<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>100</b>
<b>7</b>	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>111</b>
<b>8</b>	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>112</b>
ANEXO A - Sequências protótipos de VZV, as respectivas ORFs à quais foram alinhadas, autor, ano de deposição da sequência no GenBank, região geográfica de obtenção e o tipo de amostra biológica utilizada.....		
		124
ANEXO B - Parecer consubstanciado da CEP – emenda de projeto.....		
		126
ANEXO C - Cobertura genômica das sequências compatíveis com VZV obtidas por SMP compreendendo regiões não contínuas do genoma viral.....		
		131

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 ASPECTOS GERAIS

Os mais antigos relatos de exantemas vesiculares característicos da infecção pelo vírus varicela zoster (VZV) datam de antigas civilizações, porém apenas em 1892 foram feitas as primeiras associações da etiologia da varicela e do herpes zoster (HZ), pelo húngaro von Bókai. Já em 1925 a transmissibilidade foi demonstrada pela inoculação do vírus em crianças sem histórico de exposição ao VZV<sup>1,2</sup>.

Até a década de 1950 a patogenicidade do VZV era compreendida apenas como o surgimento de exantemas característicos da varicela e infecções brandas<sup>1,3</sup>. Esse panorama mudou completamente após a introdução do tratamento quimioterápico para crianças também na década de 1950 por Farber et al<sup>4</sup>. Junto ao sucesso dos tratamentos houve também expressivo aumento dos casos graves de varicela e suas complicações (lesões em fígado, pulmão, miocardite e infecções bacterianas secundárias), causa de morte em crianças com imunossupressão<sup>5</sup>.

O aumento dos casos graves de varicela e HZ é considerado uma consequência do aumento e expansão da quimioterapia, de transplantes e o do uso de drogas imunossupressoras, o que tornou necessário o desenvolvimento de tratamento específico e vacinação<sup>3</sup>.

O sequenciamento do genoma completo do VZV ocorreu em 1986, possibilitando posteriores estudos sobre os mecanismos de patogenicidade do vírus, polimorfismos além de eventos de recombinação e mutação<sup>1,6</sup>.

## 1.2 ESTRUTURA VIRAL E MOLECULAR

O VZV, também chamado de herpesvírus humano do tipo 3 (HHV-3), faz parte da família *Herpesviridae*, que tem como característica principal causar infecções persistentes, por meio de um processo de latência viral<sup>7</sup>. Outras características comuns aos herpesvírus humanos são: I) codificar proteínas envolvidas no

metabolismo e síntese do ácido nucleico viral; II) síntese de DNA no núcleo da célula hospedeira; III) causar infecção lítica<sup>2,8,9</sup>.

A família *Herpesviridae* é subdividida em três subfamílias: *Alfaherpesvirinae*, *Betaherpesvirinae* e *Gamaherpesvirinae*. O vírus Varicela Zoster se encontra na subfamília *Alfaherpesvirinae*, gênero *Varicellovirus*<sup>7</sup>, e, assim como os Herpes Simplex do tipo 1 (HSV-1) e do tipo 2 (HSV-2), possuem processo de replicação de curta duração e neurotropismo<sup>2,10,11</sup>.

O menor dentre os herpesvírus humanos ( $\approx 125.000$  pb), o VZV tem estrutura icosaédrica em seu capsídeo, com um diâmetro de  $\approx 125$  nm. O capsídeo, por sua vez, é envolto pelo tegumento, uma estrutura proteica amorfa, que possui aderidos a ela 162 espículas. O envelope viral é de composição glicolipoproteica, conferindo ao VZV um diâmetro total de 215 nm. As proteínas que formam essa estrutura, comum a todos os herpes vírus, é codificada por meio de um grupo de genes conservados, também comuns a todos os herpes vírus<sup>11,12</sup>.

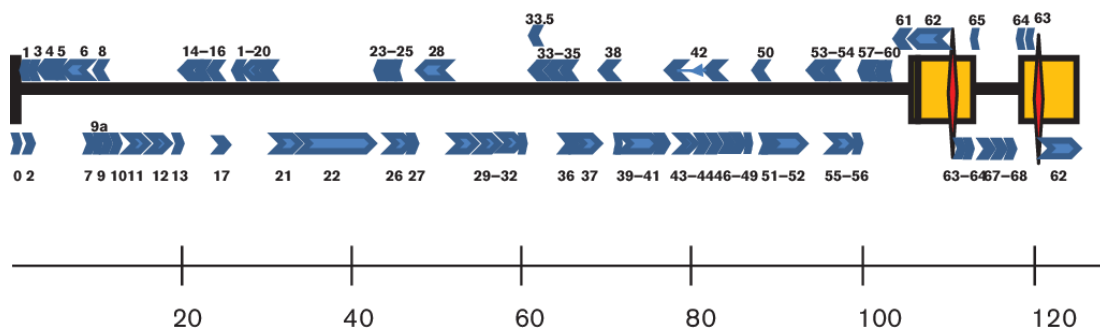
Molecularmente, o vírus apresenta uma fita dupla de DNA composta, em sua maior parte, de regiões denominadas “únicas”. Na sequência genômica, há ainda, grandes sequências de repetições, que variam da ordem de  $10^3$  a  $10^4$  pb, com essa proporção mantida por meio de processos de recombinações. A organização ocorre da seguinte forma: uma sequência “única” seguida por pares de sequências repetidas na direção oposta, nas quais há uma proporção maior do conteúdo de G+C. A sequência gênica é constituída por duas regiões únicas (longa e curta), limitadas por cinco sequências repetidas (R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub>, R<sub>4</sub> e R<sub>5</sub>), sendo que a sequência R<sub>4</sub> se encontra entre as regiões de origem de replicação (OriS)<sup>13</sup>. A sequência gênica do VZV é responsável pela expressão de 72 fases de leitura aberta (ORFs – do inglês *Open reading frames*), enumeradas de 0 a 71, sendo algumas homologas aos vírus HSV-1, HSV-2<sup>8,12</sup>.

O genoma do VZV possui 69 ORFs únicas e 3 que ocorrem de forma duplicada (ORFs 62, 63 e 64) na chamada região de invertida (IR). A organização genômica, similar ao grupo HSV, permitiu a determinação da função de diversos genes do VZV com base em produtos proteicos do HSV-1 homólogos por meio de alinhamento de aminoácidos (AA)<sup>13,14</sup>.

Estudos descrevem regiões genômicas que variam entre diferentes isolados. Estas variações podem ocorrer em comprimentos de até 500 pb e são observadas devido a variações de comprimento das regiões de repetição e da região OriS. As regiões R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub> e R<sub>3</sub>, correspondentes às ORFs 11, 14 e 22, respectivamente, representam regiões codificantes do genoma. As regiões R<sub>4</sub> e OriS ocorrem em duplicidade nas ORFs 62 e 63 e 70 e 71<sup>12,15</sup>.

A Figura 1 apresenta esquematização da organização do genoma do VZV e a Tabela 1 apresenta algumas ORFs do VZV e as funções implicadas a cada uma delas.

Figura 1 - Representação da estrutura genômica do VZV



Legenda: As ORFs são representadas na cor azul; as regiões únicas (longa e curta), representadas pela linha preta, estão separadas pelas sequências repetidas, em amarelo. Em vermelho, está a indicação da região OriS.

Fonte: Adaptado de Kennedy et al, 2015<sup>13</sup>.



Tabela 1 - Descrição de algumas ORFs do VZV, seus respectivos produtos gênicos e funções biológicas relacionadas a estes

RF	Produto gênico	Função
	Proteína inicial imediata do tegumento	Proteína associada à latência
	Glicoproteína N	Associação com a glicoproteína M / proteína tegumentar
1	Proteína de ligação com RNA	Atua junto à ORF9 no processo de replicação
4	Glicoproteína C	Proteína de expressão tardia correspondente à região R <sub>4</sub>
1	Proteína do nucleocapsídeo	Atua no processo de transcrição quando associada à gene promotor
2	Maior proteína do tegumento	Desencapsulamento do DNA, envoltório secundário
9	Proteína de ligação com DNA	Gene de ativação induzida pela proteína IE62
1	Glicoproteína B	Ligação com moléculas de heparan; fusão
7	Glicoproteína H	Fusão
8	Mediador 2 de saída citoplasmática	Saída do vírus por meio do citoplasma
0	Glicoproteína M	Associação com a glicoproteína N
4	Proteína portal	Encapsulação do DNA
0	Glicoproteína L	Fusão
2	Proteína IE62	Gene imediato inicial de replicação
3	Proteína IE63	Fosfoproteína que se liga à IE62 durante replicação
6	Proteína quinase serina/treonina	Fosforila a IE62, impedindo sua entrada no núcleo

Fonte: Tabela elaborada pelo autor com base nos conceitos apresentados por Cohrs et al (2002)<sup>16</sup>; Baiker et al (2004)<sup>17</sup>; Cohen et al (2005)<sup>18</sup>; Mocarski Jr (2007)<sup>19</sup>; Che et al (2011 e 2013)<sup>20,21</sup>; Folster et al (2011)<sup>22</sup>; e Grose et al (2013)<sup>23</sup>.

### 1.2.1 Ciclo viral

O ciclo viral do VZV ocorre no núcleo da célula hospedeira e tem como primeira etapa o processo de adsorção do capsídeo na membrana celular, que ocorre com a interação das glicoproteínas gB e gC que interagem com moléculas de heparan-sulfato presente na membrana celular<sup>2</sup>. A enzima degradadora de insulina também desempenha importante papel nesse processo. Este composto está envolvido em processos de regulação de eventos celulares como adesão e proliferação celular. Essa interação ocorre de forma irreversível<sup>2,24</sup>.

Logo após, há interação entre as glicoproteínas gH e gL cujo papel é expor os domínios da glicoproteína gB permitindo que adsorção ocorra e o vírus possa adentrar o espaço intracelular, até que o mesmo se dirija ao núcleo da célula por intermédio de proteínas carreadoras da célula ou via citoesqueleto<sup>2,25,26</sup>.

O DNA viral é liberado no núcleo para a replicação e o capsídeo permanece no citoplasma. A replicação ocorre em círculo rolante, formando concatâmeros que serão clivados em monômeros para a formação do capsídeo. A expressão dos genes de replicação viral ocorre de forma sequencial, sendo estes: 1- genes do grupo *Alpha*: codificam as chamadas proteínas iniciais imediatas que atuam na regulação do processo de transcrição; 2- genes do grupo *Beta*: ativado pelos genes *Alpha*, atuam na regulação do processo de replicação e codificam as chamadas proteínas iniciais; 3- grupo *Gamma*: os chamados genes tardios, são expressos após a replicação e participam da formação de proteínas estruturais<sup>2,27</sup>.

Ainda no núcleo, ocorre o processo de empacotamento dos monômeros e, então, o envelopamento no citoplasma, com posterior liberação para o espaço extracelular, que pode ocorrer por brotamento, associado a membrana plasmática ou vesículas do Complexo de Golgi<sup>2,26</sup>.

## 1.3 CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR

### 1.3.1 Genótipos e clados

Os genótipos virais decorrem das variações na composição genômica do VZV e determinam a divisão de uma espécie em grupo e subgrupos (genótipos e subgenótipos). O VZV, por sua vez, tem seus diversos genótipos agrupados em clados, cuja definição são grupos de espécies evolutivamente relacionadas, que possuem um ancestral comum<sup>28</sup>.

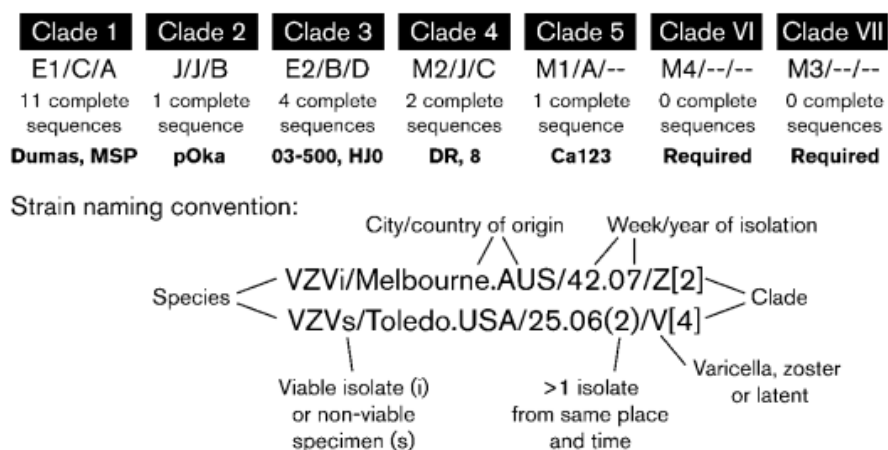
Em uma linha temporal, a caracterização molecular (genótipos e clados) do VZV sofreu modificações metodológicas. Estudos iniciais, realizados na década de 1980, faziam uso da técnica de técnica de polimorfismo de comprimento de fragmento de limitação [RFLP] por meio das enzimas de restrição *Pst*I, *Bgl*II e *Sma*I, as quais possuem sítios de clivagem nas ORFs 38, 54 e 62, respectivamente<sup>6,29</sup>. Esta abordagem mostrou-se um mecanismo eficiente, porém limitado. A caracterização molecular por meio desta abordagem baseava-se na presença ou ausência dos sítios de clivagem, fator que indicava a ocorrência de polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) nestas regiões e a determinação do referido genótipo<sup>30</sup>.

Com o desenvolvimento da biologia molecular, as metodologias de sequenciamento tornaram-se uma forma mais ampla e metodologicamente mais simples de analisar a ocorrência de SNPs evidenciassem variações alélicas e permitissem uma melhor caracterização genotípica dos vírus analisados, possibilitando, também, um estudo mais aprofundado das características moleculares do vírus para melhor entender a organização molecular do VZV, bem como identificar e caracterizar eventos de recombinação e mutação<sup>12,31,32</sup>.

Diferentes sistemas de classificação foram, então, desenvolvidos para este fim. Barret-Muir et al (2003)<sup>33</sup> desenvolveram um sistema de avaliação concomitante de identificação de 92 SNPs em 37 ORFs distribuídas pelo genoma. Peters et al (2006)<sup>34</sup> realizou a análise de SNPs com base em glicoproteínas virais. Loparev et al (2004)<sup>35</sup>, por avaliar a ORF 22 como suficientemente polimórfica, a utilizou como base para identificação dos genótipos mosaico, japonês e europeu.

Esse desalinhamento gerado pelos diversos sistemas de classificação genotípica e análise propostos durante a década de 2000 foram solucionados com a criação de um sistema padronizado, utilizando-se um sistema de classificação dos genótipos, por meio de cladogramas. Este é o método atualmente aceito para a caracterização molecular do VZV. O sistema foi criado durante o Encontro para Nomenclatura do VZV (ENVZV), realizado na cidade de Londres no ano 2008 e define que análise dos genótipos, além de obedecer a esta divisão (figura abaixo), deveria basear-se na análise de SNPs<sup>31,36</sup>.

Figura 2 - Sistema de nomenclatura proposto para o agrupamento de genótipos do VZV, em conformidade ao ENVZV



Legenda: Os genótipos de diferentes sistemas de classificação foram agrupados em 5 principais cladogramas, com sequências de genoma completo disponíveis à época. Ocorreu também a padronização para nomenclatura de isolados sequenciados.

Fonte: Breuer J, Grose C, Norberg P, et al. 2010<sup>36</sup>.

Atualmente o VZV é subdividido em genótipos que se agrupam em sete cladogramas de acordo com a classificação do ENVZV. Os cinco primeiros, propostos durante o ENVZV, e o sexto e nono cladogramas propostos posteriormente são representados por algarismos arábicos (1 a 5, 6 e 9) e possuem sequências de genoma completo disponíveis. Outros dois cladogramas ainda sem sequenciamento completo foram propostos e são apresentados por algarismos romanos (VII e VIII)<sup>36,37,38</sup>.

### 1.3.2 Processos de variações, recombinações e mutações

O VZV possui variabilidade nucleotídica percentual de 0,043% a 0,061% entre as cepas de diferentes clados, enquanto a variação intraclado é estimada entre 0,03% a 0,07%<sup>38</sup>.

Apesar dos baixos percentuais de variabilidade, são relatados eventos de recombinações e variações em diversas regiões do mundo. Grose et al (2004)<sup>39</sup> realizaram análise completa do sequenciamento das duas primeiras cepas de VZV encontradas na América do Norte com mutações na glicoproteína gE, cuja ocorrência leva a uma acelerada disseminação do vírus para às células adjacentes. Zell et al (2012)<sup>40</sup> descreveram a análise do genoma de isolados de VZV na Alemanha e identificaram diferentes genótipos e a ocorrência de duas cepas recombinantes.

Pouco se sabe sobre o possível impacto clínico da presença de variantes virais ou dos diferentes clados na história natural da infecção por esse vírus. No entanto, já se descreveu presença de diferentes cepas virais em diferentes lesões de um mesmo paciente<sup>38</sup>. Esses achados levaram alguns autores a supor que os processos de reativação viral e quadros que acometem sistema nervoso central (SNC), possam estar eventualmente associados à presença de eventuais recombinações virais, acumuladas ao longo dos anos de sua evolução, podendo estas ter alguma influência na capacidade de resposta do sistema imunológico dos indivíduos infectados<sup>41</sup>.

### 1.3.3 Vírus vacinal

O vírus vacinal também é alvo de estudos de caracterização molecular, já que pode estar associado a manifestações clínicas<sup>42,43</sup>. Cerca de 2% a 5% das pessoas vacinadas podem experimentar este raro evento e estudos sugerem recombinações entre as cepas vacinais e selvagem e SNPs na ORF 62, o que pode levar alterações na virulência do vírus vacinal<sup>38</sup>.

Estudos mostram divergências entre as cepas selvagens e vacinais, ainda que com baixas taxas de SNPs. Até o presente momento, não é claro qual (is) deste(s) SNPs estão relacionado(s) com a baixa virulência da cepa vacinal. Ademais, são

descritos processos de recombinação, nos quais sequências nucleotídicas comuns às cepas selvagens estão presentes no genoma de isolados virais, condição que ocorre em baixa frequência, mas de notável destaque<sup>38</sup>.

Relatos de reativação do vírus vacinal<sup>44</sup>, transmissão do vírus vacinal por estes indivíduos<sup>45</sup>, bem como manifestações clínicas associadas<sup>46</sup> e que podem ocorrer de forma severa são encontrados na literatura e a diferenciação entre as cepas vacinal e selvagem constitui etapa importante em estudos de epidemiologia molecular, para, não somente, avaliar casos de recombinação e quadros clínicos gerado por vírus vacinal, mas também para análise de prevalência em determinada população<sup>38</sup>.

A diferenciação também oferece parâmetros referentes à variação entre diferentes *loci* das cepas. Regiões distintas da ORF 62 são detectáveis em casos de reativação do vírus vacinal e apresentam polimorfismos comuns a todas as formulações vacinais disponíveis, sendo que as regiões 105705 e 107252 são regiões cuja frequência de polimorfismos entre clones é 3% e 2%, respectivamente<sup>42,47</sup>. Ainda, a região 107252 também apresenta recombinantes com alelos de cepas selvagens<sup>44</sup>.

Embora raras, as manifestações clínicas causadas pelo vírus vacinal merecem especial atenção e podem auxiliar no entendimento da história natural da infecção pelo VZV e alteração de padrões comportamentais do vírus selvagem, especialmente em populações de alta taxa de cobertura vacinal<sup>30,33,38</sup>.

## 1.4 HISTÓRIA NATURAL DA INFECÇÃO PELO VÍRUS VARICELA ZOSTER

### 1.4.1 Varicela

A infecção primária pelo VZV, denominada varicela, ocorre por exposição de hospedeiros susceptíveis a partículas virais provenientes de lesões cutâneas ou secreções respiratórias, geralmente na infância<sup>1,2</sup>.

A transmissão do VZV ocorre por contato direto com esse vírus. Este contato pode se dar a partir de uma lesão cutânea (líquido da vesícula), ou através da saliva ou secreções respiratórias da pessoa infectada. O local de inoculação do vírus é provavelmente a conjuntiva ou mucosa do trato respiratório superior. Após a inalação

das secreções respiratórias, o vírus se replica na orofaringe ou linfonodos regionais. Cerca de 96 horas após a infecção o vírus se dissemina para as vísceras através de uma disseminação hematogênica, numa fase denominada de viremia primária<sup>1,2</sup>.

Na viremia primária o VZV atinge o fígado e diferentes outros órgãos, e infecta células do sistema mononuclear fagocitário (SMF) durante o período de incubação, com duração de cerca de 14 dias<sup>1,2</sup>.

Na circulação sanguínea, o VZV permanece associados às células do SMF, o que permite ao vírus acesso às células epiteliais, levando à manifestação clínica clássica do vírus: o aparecimento de exantema. Os mecanismos envolvidos no processo são dois: I) células do SMF migram dos capilares para o tecido, liberando partículas virais cujo alvo são células epiteliais; II) vírus se disseminam para células do endotélio dos capilares, se replicam e infectam células epiteliais adjacentes realizando esse processo até atingir a pele<sup>1,2</sup>.

Com neurotropismo conhecido, o VZV infecta células da raiz dos gânglios dorsais (RGD) e do gânglio trigeminal (GTG). A infecção pode ocorrer de duas formas: I) as lesões muco cutâneas dão ao vírus acesso aos axônios das células neurais (rota ascendente); II) os vírus atingem a região da RGD em associação com células do SMF infectadas antes do aparecimento das lesões<sup>1,2</sup>.

O mecanismo denominado *round trip* (vai e volta), é o responsável pela produção de novas partículas virais durante a infecção. Seu processo se dá pelo transporte de vírus produzidos nas células da RGD e do GTG até a pele via axônios neuronais, levando à infecção das células epiteliais e formação de novas partículas virais. Os vírus formados nas lesões do epitélio retornam aos neurônios e lá infectam mais células, local onde se replicarão. Esse mecanismo mantém a infecção aguda, já que as células infectadas são eliminadas em um período de 24 a 72 após o aparecimento dos exantemas<sup>1,2</sup>.

Na literatura são descritos estudos sobre fatores neurotrópicos e epitéliotrópicos baseados em modelos *ex vivo* e *in vivo*<sup>11,48,49</sup>. Há também demonstrações *in vitro* do potencial de disseminação do VZV em diferentes tipos celulares, incluindo células tronco nervosas e células tronco pluripotentes<sup>50</sup>.

Em indivíduos imunocompetentes, comumente, a resposta imune celular específica gerada durante o processo infeccioso leva à resolução da infecção branda

e é crucial para que vírus presentes nos neurônios da RGD e GTG entrem em fase de latência<sup>1,3</sup>.

Indivíduos imunossuprimidos estão sob maior risco de apresentar complicações decorrentes da varicela, esta apresentando-se como doença grave<sup>1,3</sup>. Embora raras, as complicações podem ocorrer em indivíduos que se infectam durante a infância. A condição imunológica do hospedeiro pode facilitar a disseminação do vírus para outros órgãos e a ação do VZV como agente oportunista, levando a complicações como pneumonia e infecções bacterianas secundárias e acometimento de SNC (que incluem ataxia cerebelar, mielite, encefalopatia, vasculite, meningites e encefalites)<sup>51,52</sup>. Bozzola et al (2012)<sup>53</sup> reportaram uma taxa de 21,7% em relação a complicações de SNC. Estes são quadros graves que necessitam de hospitalização e podem levar ao óbito, especialmente na faixa etária de 0 a 5 anos.

Sequelas podem incluir retardo no desenvolvimento, disartria, hemiparesia, epilepsia, cegueira, surdez e desordens de coordenação motora<sup>52</sup>. Em relação à letalidade, observa-se maiores taxas na faixa etária de 5 a 9 anos<sup>54</sup>. Quando adquirida em fase adulta, a varicela também pode apresenta potencial de severidade<sup>1,3</sup>

#### **1.4.2 Latência**

O processo de latência do VZV ocorre em cerca 2% a 5% das células infectadas<sup>3,26</sup>. O vírus permanece de forma não integrada (epissomal) ao DNA humano em formato de concatâmero. Sua expressão gênica se limita a poucas ORFs, sendo estas: 4, 21, 29, 62, 63 e 66<sup>13,27,55</sup>.

Os mecanismos que determinam a latência são incertos, e a hipótese mais aceita é que durante a passagem pelos axônios, nucleocapsídeos são liberados nas células, em direção ao núcleo, na ausência de proteínas do tegumento, mantendo o genoma na forma epissomal e inibindo a transcrição. Há a expressão de transcritos associados à latência do VZV (TALV), sobre os quais pouco se sabe, codificados em sentido antisenso a ORF 61 e, geralmente coexpresso com a ORF63<sup>27</sup>.

O período de latência ocorre por tempo indeterminado e o processo de reativação do VZV costuma ocorrer uma única vez. Condições de imunossupressão,



incluindo fatores relacionados ao avanço da idade, são associados a reativação. Esse processo propicia a replicação viral em toda região da RGD e GTG. Eventualmente e mais raramente, casos de reativação podem ser recorrentes<sup>13,26,27</sup>

### 1.4.3 Reativação e manifestações clínicas associadas

A manifestação clínica mais comum decorrente do processo de reativação do VZV é o herpes zoster (HZ). O HZ produz lesões cutâneas que acometem todo o dermatomo associado ao nervo onde ocorreu a reativação<sup>56</sup>. O acometimento de toda RGD e GTG leva a morte celular, o que pode tornar escassa quantidade de vírus latentes, fazendo com que uma nova reativação seja muito pouco provável<sup>26,27</sup>.

O HZ, comumente, afeta pessoas acima dos 45 anos e em estado de imunossupressão<sup>1,56</sup>. Casos que ocorrem antes dos 10 anos de idade, são raros e se devem a exposição ao vírus durante o primeiro ano de vida ou em casos de infecção intrauterina<sup>57</sup>. Em casos de infecção intrauterina, o risco de a criança desenvolver HZ nos dois primeiros anos de vida está diretamente relacionado à semana gestacional em que ocorreu a infecção materna<sup>58</sup>.

O quadro clínico é caracterizado pela presença de lesões no dermatomo correspondente ao local de reativação, geralmente acompanhadas de dor local<sup>59</sup>. Alguns pacientes experimentam um evento raro denominado *zoster sine herpette*, no qual não se observam lesões cutâneas e apenas a sensação dolorosa é relatada<sup>60,61</sup>. O processo inflamatório que ocorre nos neurônios é o responsável pela sensação dolorosa e as células satélites adjacentes, onde não há a presença do vírus, podem ser infectadas e alvo da inflamação<sup>62,63</sup>.

Mesmo após o controle do processo inflamatório e resolução das lesões cutâneas, cerca de 40% dos pacientes relatam a cronicidade das dores, evento denominado neuralgia pós-herpética<sup>63</sup>.

Durante o processo de reativação viral, pode ocorrer viremia, acometimento visceral e disseminação para outros dermatomos. Demais complicações incluem necrose local, mielite, déficits de função motora, acometimento hepático, pulmonar e

de SNC, com destaque para os casos de meningites, encefalites e meningoencefalites (MEM), que podem ocorrer em 0,2% a 0,5% dos casos de reativação viral<sup>1</sup>.

Figura 3 - Lesões de varicela (A) e HZ (B)



Legenda: Lesões de varicela (à esquerda), disseminadas ao longo do tronco, e HZ (à direita), agrupadas em único dermatomo de forma unilateral, respectivamente.

Fonte: Disponível em: <<https://www.flickr.com/photos/gilbertopalma/8080610411>> e <<https://saude.ig.com.br/2017-06-19/herpes-zoster.html>>, respectivamente. Acesso em: 05/09/2019.

Eventos raros associados à reativação incluem: cepas distintas com potencial de latência e processo de reativação destas em momentos distintos<sup>38</sup>; reativação de cepa vacinal em indivíduos vacinados<sup>44,64</sup>; e casos de reinfecção assintomática com posterior latência e reativação da segunda cepa<sup>3,13,38</sup>.

Reativações subclínicas são comuns e um processo importante na manutenção da imunidade de memória e da latência viral. Quando há esse processo, seja por exposições endógenas a antígenos virais ou exposição a outras cepas, há um *boosting* na imunidade celular<sup>1,3,65</sup>.

#### 1.4.3.1 Meningites, encefalites e meningoencefalites

Kumar et al<sup>65</sup> (2013, p. 825-30) definem o processo infeccioso das meningites como o “processo inflamatório das leptomeninges e do líquido cefalorraquidiano

(LCR)” e das meningoencefalites como “combinação de meningite com a inflamação do parênquima encefálico”.

Os casos de MEM são considerados uma das mais graves complicações neurológicas da infecção pelo VZV<sup>1,66</sup>, podendo ocorrer tanto como complicação da infecção primária (geralmente na infância)<sup>67</sup> quanto como complicação do processo de reativação (geralmente a partir da terceira idade)<sup>68</sup>, com taxa letalidade que varia entre 5% a 25% e sequelas em cerca de 20% dos casos de sobrevivência. Ocorre processo inflamatório de início agudo, com febre, alteração de consciência (que varia de confusão mental a estado de coma), cefaléia, fotofobia, rigidez nuchal, convulsões, sonolência e paresia<sup>53,69</sup>.

Acredita-se que o quadro patológico ocorra a partir da disseminação central do vírus no SNC atingindo o espaço subaracnoide e células meníngeas e endoteliais por intermédio do LCR e interação com astrócitos, cuja uma das funções é a regulação da neuroinflamação<sup>70</sup>. Esse processo ainda não foi demonstrado em modelos *in vitro* e pode ser evidenciado em exames de imagem. A idade avançada e o acometimento de nervos da face na reativação são fatores que influenciam para o agravamento do quadro clínico<sup>69</sup>.

No âmbito celular, ocorre a invasão, agressão e lesão das células nervosas. A nível tecidual observa-se vasculite, acometimento do tronco encefálico e estruturas internas e isquemia envolvendo arteríolas cerebrais. Estão presentes e evidenciados em cortes histológicos: edema com áreas de inflamação multifocal ou difusa, desmielinização e necrose<sup>69,70</sup>. O processo inflamatório ocorre predominantemente na região cinzenta do parênquima encefálico e muito se discute se o VZV possui ação direta nesse processo ou se ele é derivado de uma possível vasculopatia<sup>64,66,71,72</sup>.

O processo patológico de MEM costuma ocorrer após uma a duas semanas das manifestações associadas ao VZV<sup>64,68,72, 74,75,76</sup>. Esta associação nem sempre ocorre e o quadro de MEM pode ocorrer antes ou até mesmo sem o aparecimento dos exantemas característicos das manifestações cutâneas, fato que pode tornar o diagnóstico mais tardio<sup>77,78,79</sup>. A presença ou ausência dessa associação é amplamente descrita na literatura, assim como casos decorrentes de uma segunda reativação do vírus. Embora raros, casos de MEM podem ocorrer também em pacientes imunocompetentes, incluindo crianças ou, ainda, casos raros de uma segunda reativação e quadro clínico causado por vírus vacinal<sup>73,80,81</sup>. Exposição em

fase mais tardia também está associada a um maior risco de complicações neurológicas decorrentes da infecção primária<sup>58</sup>.

## 1.5 DIAGNÓSTICO DO VÍRUS VARICELA ZOSTER E ASPECTOS LABORATORIAIS

O diagnóstico da varicela e do HZ ocorre com base em sintomas e sinais, especialmente as lesões cutâneas características que o paciente apresenta. Trata-se, portanto, de um diagnóstico clínico, não necessitando, comumente, de confirmação laboratorial<sup>69</sup>. Os casos de MEM, por sua vez, requerem um diagnóstico laboratorial por meio de técnica que evidencie a presença do vírus no LCR, de modo que a técnica considerada “padrão ouro” é a reação em cadeia da polimerase (PCR – *Polymerase Chain Reaction*)<sup>61,82</sup>. Eventualmente, a avaliação do título de anticorpos IgG anti-VZV em LCR e imunofluorescência direta podem ser utilizadas como técnicas auxiliares indiretas que sugerem a confirmação do diagnóstico<sup>83</sup>.

A detecção do VZV em LCR apresenta grande significância clínica, ao passo que a detecção em plasma é tema de discussão e possui aplicabilidade ainda não muito bem estabelecida, uma vez que os títulos virais presentes em amostras sanguíneas são extremamente baixos<sup>84</sup>. No entanto, não está relacionada com possíveis sequelas neurológicas, a presença de lesões cutâneas ou com o tempo de aparecimentos dos sintomas<sup>81,85,86</sup>.

A análise de parâmetros bioquímicos e citológicos do LCR são de grande valia, pois seus valores são bem característicos nos casos de MEM. O LCR apresenta padrão predominantemente inflamatório, pleocitose branda com predomínio de células mononucleares, ligeiro aumento do nível de proteínas e glicorraquia e lactato em níveis normais<sup>69</sup>. Pleocitose baixa (5 a 10 células / mm<sup>3</sup>) ou celularidade normal indicam quadro de encefalite sem envolvimento meníngeo<sup>26,87</sup>. Os níveis proteicos são considerados alterados quando  $\geq 45$  mg/dL<sup>88</sup>.

A ressonância magnética, técnica de imagem de escolha, e a eletroencefalografia podem auxiliar na avaliação do quadro clínico e avaliar a extensão das lesões<sup>64,69</sup>. Já o uso de biópsia de lesão encefálica e técnicas de isolamento viral se tornaram poucos usuais com o advento da PCR<sup>26,53</sup>.

Ainda, técnicas de sequenciamento (Sanger [MS] e sequenciamento de nova geração, por vezes referido como sequenciamento massivo paralelo [SMP]) mostraram-se como alternativas aos testes moleculares já utilizados e menos sensíveis. Além da eventual aplicabilidade dessa técnica na rotina diagnóstica, as técnicas de sequenciamento também são úteis para estudos de epidemiologia molecular e filogenia<sup>89,90</sup>.

## 1.6 EPIDEMIOLOGIA

### 1.6.1 Epidemiologia da varicela

Dados sobre a prevalência do VZV na população brasileira são escassos. Estudos soropidemiológicos mostram prevalência média de 58,1% em populações pediátricas (0 a 15 anos), com maior índice de soropositividade em crianças acima dos 10 anos de idade<sup>91,92</sup>. Em populações adultas as taxas de soroprevalência apresentam níveis acima dos 90% e com distribuição não homogênea pelo país<sup>93</sup>.

Já a incidência teve significativa mudança com o advento da vacina viva atenuada e sua implementação nos programas de vacinação ao redor do mundo. Em muitos países europeus e nos Estados Unidos da América, sua implementação ocorreu entre as décadas de 1990 e 2000<sup>94</sup>. No Brasil, a inclusão no calendário nacional de imunizações dessa vacina ocorreu a partir de 2012. Neste ano, os casos totais notificados de varicela ultrapassaram a faixa de 150.000, enquanto os óbitos totais foram de 176 casos, números que decresceram nos anos seguintes<sup>95</sup>.

Apenas casos graves de varicela são de notificação compulsória, o que dificulta a obtenção de dados consistentes em relação ao número total de casos<sup>96</sup>. As estimativas do Ministério da Saúde são de 3 milhões de novos casos ao ano e o número de admissões e internações relacionados ao VZV apresentou expressiva redução após implementação da vacinação no Brasil, conforme mostrado na figura abaixo, com destaque para as faixas etárias de 0 a 9 anos, no período de 2003 a 2016, conforme mostrado na Tabela 2<sup>97,98</sup>.

Tabela 2 - Números absolutos e incidência das admissões de varicela em pacientes menores de 20 anos durante o período pré (2003-2012) e pós-vacinação

Idade	<1 anos		1 - 4 anos		5 - 9 anos		10 - 14 anos		15 - 19 anos	
Ano	Admissões	Incidência	Admissões	Incidência	Admissões	Incidência	Admissões	Incidência	Admissões	Incidência
2003	945	31,62	4228	35,60	1692	11,45	536	3,53	77	0,49
2004	824	28,28	2868	24,32	1076	7,34	348	2,30	55	0,35
2005	557	19,50	2366	20,24	853	5,81	292	1,93	43	0,28
2006	679	24,33	2822	24,63	1057	7,17	345	2,30	40	0,26
2007	579	21,61	2243	20,35	733	5,06	254	1,74	54	0,36
2008	2021	77,92	2898	27,08	856	5,97	348	2,41	240	1,65
2009	1516	60,15	2643	25,43	858	6,02	415	2,89	307	2,11
2010	1606	67,51	3604	37,23	1021	7,51	407	2,84	235	1,63
2011	1137	47,93	2629	27,59	904	6,75	458	3,18	228	1,59
2012	967	41,93	2467	26,55	729	5,56	363	2,52	221	1,55
2013	1262	56,58	2858	31,59	924	7,22	418	2,92	242	1,71
2014	840	38,72	1905	21,47	800	6,37	412	2,89	236	1,67
2015	627	29,27	1083	12,29	584	4,68	289	2,03	192	1,35
2016	597	27,31	803	9,19	645	5,21	269	1,90	161	1,11

Nota: Expressiva redução na frequência de casos de varicela na comparação entre os anos de 2003 e 2016.

Fonte: Adaptado de Scotta MC, la Ossa RP, Lumertz MS, et al 2017<sup>98</sup>.

De acordo com dados do Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN), o número de internações por varicela entre os anos de 2017 e 2021 foi de 23.586 internações. O número, conforme esperado, apresentou gradativa redução ao longo dos anos (6.099 internações em 2017 vs 2.764 internações em 2021), com destaque para as faixas etárias de 1 – 4 anos de idade e 5 – 9 anos de idade, cujas taxas de redução foi de 70,4% (716 internações em 2017 vs 212 internações em 2021) e 92,6% (651 internações em 2017 vs 86 internações em 2021), respectivamente<sup>99</sup>.

A vacinação contra varicela, ainda, se mostrou eficaz na diminuição de casos graves em crianças imunossuprimidas. Neste grupo, indivíduos completamente imunizados apresentam quadros leves, os quais ocorreram com baixa incidência<sup>100,101</sup>.

Vale ressaltar que a introdução da vacinação acarreta em mudanças no padrão de circulação do vírus. Com diminuição dos casos de varicela e da circulação do vírus selvagem espera-se, futuramente, um menor número de casos de reativação (considerando a menor virulência do vírus vacinal) e menor exposição de hospedeiros susceptíveis ao VZV<sup>65,102,103</sup>.

### 1.6.2 Epidemiologia do herpes zoster

O HZ possui taxas de incidência que aumentam conforme a idade e possui prevalência de 3 e a 5 casos a cada 100.000 pessoas, chegando a 11 casos por 100.000 pessoas nas faixas etárias acima dos 60 anos<sup>104</sup>. Estudos reportam um aumento de casos de HZ ao longo das últimas décadas em países da América do Norte, Europa e Ásia<sup>105</sup>. No Brasil, mesmo com a paucidade de dados na literatura, são observadas taxas similares<sup>106</sup>. Todavia, a recente vacinação para HZ também demonstra impactar na queda de casos e de hospitalizações associadas à reativação<sup>65,107</sup>.

### 1.6.3 Epidemiologia das meningites virais no Brasil e no mundo

Segundo dados do SINAN, os casos de meningites virais no Brasil no período de 2012 a 2021 totalizam aproximadamente 72 mil, conforme apresentado na Tabela 3. Vale ressaltar que o SINAN classifica os casos apenas como “meningites virais”, sem especificar o agente etiológico<sup>96</sup>. Apesar do caráter de notificação compulsória, as subnotificações dos casos de MEM são um importante ponto a ser considerado, podendo, o real número de casos, estar subestimado<sup>108</sup>. Ressalta-se, ainda, a limitação de acesso à testes diagnósticos, em especial na rede pública<sup>109</sup>.

De forma geral, de acordo com diferentes autores, o VZV está entre as principais causas de MEM de etiologia viral, com taxas de incidência que variam de 5% a 30% do total de casos, incluindo populações pediátricas (Tabela 4).

Tabela 3 - Número de casos de meningite viral notificados no Brasil, separados por sexo e por período, compreendendo os anos de 2012 a 2021

<b>Números de notificações por sexo</b>				
<b>ANO</b>	<b>Masculino</b>	<b>Feminino</b>	<b>Não especificado</b>	<b>Total</b>
2012	5.798	4.139	2	9.939
2013	5.138	3.676	1	8.815
2014	4.957	3.580	0	8.537
2015	4.185	3.013	0	7.198
2016	4.355	3.041	1	7.397
2017	4.724	3.206	0	7.930
2018	5.044	3.719	0	8.763
2019	4.775	3.448	1	8.224
2020	1.687	1.363	0	3.050
2021	1.272	1.062	0	2.334
<b>TOTAL</b>	<b>41.935</b>	<b>30.247</b>	<b>5</b>	<b>72.187</b>

Fonte: Desenvolvida pelo autor com base em dados obtidos pelo site do DATASUS. Brasil; 2022<sup>96</sup>.



Tabela 4 - Estudos epidemiológicos acerca da prevalência de MEM por VZV em alguns países do mundo

País	Estudo	Investigação	Prevalência (%)	Frequência (absoluta)	Período de estudo	Referência
Brasil	Retrospectivo	Ag. virais	20,4%	3º	2010 – 2012	Bastos (2014) <sup>110</sup>
Brasil	Prospectivo	Ag. virais e não virais	1,04%	4º	NI	Chesky (2000) <sup>111</sup>
Brasil	Retrospectivo	Ag. virais	13,6%	2º	2010 – 2013	Oliveira (2017) <sup>112</sup>
Colômbia	Longitudinal	Herpesvírus	0,8%	3º	2009 – 2011	Tique (2016) <sup>113</sup>
EUA		Ag. virais	1,9%	3º	2004 – 2007	Dupuis (2011) <sup>114</sup>
Espanha		Ag. virais	8,2%	1º	2007 - 2014	Arruti (2017) <sup>115</sup>
França		Ag. virais e não virais	14,5%	3º	2009 – 2011	Jarrin (2016) <sup>116</sup>
Israel	Retrospectivo	Herpesvírus	26,3%	1º	2002 - 2010	Pollak (2012) <sup>66</sup>
Índia		Ag. virais e não virais	11,1%	4º	2010 - 2014	Javali (2017) <sup>117</sup>
Austrália		Ag. virais e não virais	3,8%	2º	1990 - 2007	Huppatz (2007) <sup>118</sup>

Legenda: Ag. virais = Ag. virais; Ag. não virais = Ag. não virais; NI = não informado

Fonte: Desenvolvido pelo autor; 2023.

### 1.6.3.1 Epidemiologia das meningites virais na cidade de São Paulo

Na cidade de São Paulo, maior cidade do Brasil e da América Latina, com população de aproximadamente 46,6 milhões de habitantes<sup>119</sup>, o monitoramento destes casos fica sob responsabilidade da Coordenadoria de Vigilância em Saúde (COVISA), subjugada à Secretaria Municipal da Saúde.

De acordo com a COVISA, entre os anos de 2010 e 2019, foram notificados 37.299 casos suspeitos de meningites, com 34.675 (93%) de casos confirmados. As meningites assépticas representaram 68,6% (23.798 casos totais). O VZV, por sua vez, foi a terceira maior causa com 0,8% dos casos (189 casos totais)<sup>120</sup>. A Tabela 5 mostra um aumento da incidência entre os anos de 2010 e 2019.

Tabela 5 - Número de casos de meningite asséptica na cidade de São Paulo, por ano, entre os períodos de 2011 a 2019

<b>Ano</b>	<b>Casos confirmado por VZV (n, %)</b>	<b>Casos totais de meningites assépticas</b>
2010	11 (0,6%)	1.952
2011	13 (0,6%)	2.109
2012	18 (0,6%)	2.975
2013	20 (0,8%)	2.448
2014	11 (0,5%)	2.240
2015	18 (0,6%)	3.250
2016	14 (0,6%)	2.158
2017	19 (0,9%)	2.025
2018	35 (1,3%)	2.649
2019	30 (1,5%)	1.992
<b>TOTAL</b>	<b>189 (0,8)</b>	<b>23.798</b>

Nota: na ocasião do estudo, ano de 2017 e 2019, aumento da frequência de casos confirmados. Aumento do número de casos confirmados de MEM por VZV entre os anos de 2017 e 2018.

Fonte: Coordenadoria de Vigilância em Saúde (COVISA) - Notificações de casos de meningites no Sinan. Município de São Paulo, 2011 a 2019<sup>120</sup>.

Em relação à incidência dos casos de MEM por VZV, é observado, especialmente na faixa etária de 0 a 5 anos, importante redução dos casos. Este evento pode estar associado a implementação da vacinação para varicela no Calendário Nacional de Imunizações, conforme disposto na Tabela 6<sup>98</sup>.

Tabela 6 - Distribuição da incidência, por faixa etária, de casos de meningite por VZV, nos períodos pré (2010 – 2013) e pós-vacinação (2014 – 2019)

<b>Faixa etária (anos)</b>	<b>2010 - 2013</b>	<b>2014 - 2019</b>	<b>Total</b>
0 – 5	15 (24,2%)	9 (7,1%)	24 (12,6%)
6 – 10	3 (4,8%)	6 (4,7%)	9 (4,7%)
11 – 19	1 (1,6%)	1 (0,8%)	2 (1,1%)
16 – 20	3 (4,8%)	12 (9,4%)	15 (7,9%)
21 – 30	8 (12,9%)	18 (14,2%)	26 (13,7%)
31 – 40	7 (11,3%)	21 (16,5%)	28 (15,3%)
41 -50	5 (8,1%)	13 (10,2%)	18 (9,5%)
51 – 60	6 (9,7%)	11 (8,7%)	17 (8,9%)
> 60	14 (22,6%)	36 (28,3%)	50 (26,3%)
<b>TOTAL</b>	<b>62</b>	<b>127</b>	<b>189 (100%)</b>

Nota: redução da frequência na faixa etária de 0 a 5 anos.

Fonte: Coordenadoria de Vigilância em Saúde (COVISA) - Notificações de casos de meningites no Sinan. Município de São Paulo, 2011 a 2019<sup>120</sup>.

#### 1.6.4 Epidemiologia molecular do VZV

A epidemiologia molecular visa explorar as variações genéticas para investigar aspectos relacionados a evolução, história natural dos vírus e suas respectivas patologias<sup>31,38</sup>.

Estudos de epidemiologia molecular demonstram a distribuição dos clados nos diferentes continentes e evidenciam processos de segregação geográfica, os quais são influenciados pelos movimentos migratórios<sup>30,33,121</sup>. Este fato permite que clados, até então não circulantes em determinada região, sejam levados para novas localidades alterando as dinâmicas comportamentais do VZV<sup>31</sup>.

Ao passo que este é um tema amplamente explorado em outras regiões do mundo, no Brasil poucos dados são disponíveis a este respeito. Até o presente

momento, apenas dois estudos são encontrados na literatura. O primeiro, realizado por Costa et al (2016)<sup>122</sup> em pacientes com varicela e HZ, avaliou a presença de SNPs nas ORFs 22, 38 e 54. O segundo, realizado por Bastos et al (2019)<sup>123</sup>, em pacientes diagnosticados com varicela, HZ ou MEM, avaliou a presença SNPs das ORFs 21, 22 e 50. Ambos descrevem presença dos clados 1, 3 e 5 como os prevalentes no Brasil, até então.

Ademais, Quinlivan et al (2002)<sup>30</sup> conduziram estudo de mesmo tópico em Londres, Inglaterra, utilizando 165 amostras de varicela e HZ, das quais 5 amostras eram de pacientes brasileiros com varicela. O estudo, que também utilizou amostras de outros países, evidenciou uma segregação continental entre os diferentes clados do VZV. O genótipo das cepas brasileiras, descritas como *PstI+* e *BglI+* (enzimas de restrição, cujos sítios de ligação são as ORFs 38 e 54, respectivamente), também foi observado em cepas da América do Norte, África e Ásia. Quatro amostras foram classificadas como genótipo A (clados 1 ou 5), ao passo que uma das amostras apresentou genótipo misto C/A (clados 1, 4 ou 5). A tabela abaixo apresenta a distribuição dos clados em cada um dos continentes, conforme descrito por diferentes autores.

Tabela 7 - Predominância dos diferentes clados do VZV nos diferentes continentes do mundo

	<b>Clados predominantes</b>	<b>Ano</b>	<b>Amostra biológica</b>	<b>Referência</b>
<b>América</b>	1, 2, 3, 4, 5, 6 e VIII, 9	2022	Raspado de lesão e LCR	Bryant <sup>124</sup>
		2019		Bastos <sup>123</sup>
		2016		Costa <sup>122</sup>
<b>África</b>	5	2019		Leung <sup>125</sup>
<b>Ásia</b>	2 e 4	2009		Liu <sup>126</sup>
		2017		Jin <sup>42</sup>
		2018		Raspado de lesão
<b>Europa</b>	1, 2, 3, 4 5, 6	2016		Boštková <sup>128</sup>
		2018		Depledge <sup>129</sup>
		2015		Norberg <sup>121</sup>
<b>Oceania</b>	1, 2, 3, 4, 5	2007		Loparev <sup>130</sup>

Fonte: Desenvolvida pelo autor; 2023.

A paucidade de dados também é observada em demais países da América Latina. Estudos na Argentina<sup>131</sup>, Peru<sup>132</sup> e México<sup>133,134</sup>, todos com utilização de amostra de raspado de lesão cutânea, descrevem a presença dos clados 1, 2, 3, 4, 5, 6, VIII e 9.

## 1.7 VACINAÇÃO PARA VARICELA E HERPES ZOSTER

Na década de 1970 foi desenvolvida por Takahashi et al. a primeira vacina viva atenuada cujo intuito era reduzir os casos de graves ou fatais de varicela em crianças imunocomprometidas. A vacina foi produzida por meio de diversas passagens de um isolado de cepa selvagem em fibroblastos embrionários humanos. A cepa vacinal (vOka) tem replicação atenuada na pele e outros tecidos, mas ainda é capaz de produzir latência em células nervosas<sup>31,135</sup>. Adotada em programas de vacinação ao redor do mundo, a vacina para varicela foi introduzida no Calendário Nacional de Imunizações do Ministério da Saúde a partir de 2012, em dose única, na forma de uma vacina tetravalente, também utilizada para sarampo, caxumba e rubéola. Nota-se expressiva diminuição de casos de varicela, complicações associadas e taxas de internações na faixa de 0 a 5 anos, o que parece estar diretamente relacionado ao impacto da vacinação<sup>97,98,121</sup>.

Na década de 2000 foi desenvolvida uma vacina específica para o HZ, com a mesma formulação da vacina vOka (vacina para varicela), porém em titulação superior<sup>103</sup>. Uma formulação recombinante também foi desenvolvida e encontra-se disponível<sup>136,137</sup>.

Apesar da alta imunogenicidade e tolerância, a vacina, produzida a partir de vírus vivo atenuado, tem se mostrado ter raro potencial de reativação e de produzir manifestações clínicas, incluindo manifestações em SNC<sup>38,138</sup>.

## 2 JUSTIFICATIVA

A comunidade científica mundial tem dirigido seus esforços ao entendimento do processo de reativação do vírus VZV vacinal e seu potencial de causar infecções graves utilizando métodos moleculares de investigação laboratorial. No entanto, no Brasil, a escassez de dados epidemiológicos e moleculares acerca do VZV constitui grande entrave para o esclarecimento dessas questões em nosso meio.

Acreditamos que, a dificuldade de acesso a técnicas laboratoriais diagnósticas sensíveis e de baixo custo na rede pública de saúde seja um dos fatores de maior impacto na dificuldade de obtenção de dados que possibilitem uma caracterização epidemiológica e molecular mais ampla do VZV em nosso meio.

Um recente estudo conduzido pelo nosso grupo nos permitiu acesso a amostras de LCR, bem caracterizadas do ponto de vista clínico e procedentes de pacientes com quadros de infecção aguda de SNC, associados à presença do VZV. Tal estudo baseou-se na análise laboratorial e clínica de pacientes atendidos no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, um hospital terciário e de outros hospitais da rede privada do município de São Paulo, em que casos de infecção de SNC por VZV foram diagnosticados.

O presente estudo buscou caracterizar do ponto de vista molecular os isolados de VZV circulantes na cidade de São Paulo e identificados no estudo acima mencionado.

Acreditamos que a caracterização molecular do VZV nestas amostras possa nos auxiliar, entre outros aspectos, na compreensão da dinâmica da circulação de diferentes cepas desse vírus em nosso meio e na avaliação do grau de impacto dessa variabilidade viral na apresentação clínica da infecção a nível do SNC.

Pretendemos também contribuir no âmbito dos métodos diagnósticos, através da avaliação do desempenho de uma PCR em tempo real *in house* para a detecção do DNA de VZV em amostras de LCR.

Pretendemos também que os dados obtidos neste estudo pudessem nos auxiliar a obter informações sobre a efetividade da utilização da vacina no nosso meio,

à medida que pudesse fornecer informações sobre a frequência com que cepas vacinais atenuadas poderiam estar associadas à manifestações de doença em SNC.

Trata-se de oportunidade ímpar de podermos contribuir em relação ao conhecimento das características moleculares do VZV associado a doença em sistema nervoso central em nosso meio.



### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

- Caracterizar molecularmente isolados do VZV identificados em amostras de LCR em indivíduos com quadro de MEM infecciosa aguda;

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o desempenho de uma PCR em tempo real *in house* e aplicar na detecção do DNA de VZV em amostras de LCR e validá-la a partir plataformas comerciais de referência;
- Diferenciar os isolados de VZV no LCR quanto a origem vacinal ou selvagem por meio da sua detecção específica por PCR em tempo real;
- Caracterizar os isolados de VZV presentes no LCR em pacientes com MEM infecciosa aguda por meio da análise filogenética dos seus principais alvos gênicos;
- Analisar as amostras de VZV de forma exploratória por sequenciamento massivo paralelo.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 DESENHO DO ESTUDO

Propomos a realização de um estudo transversal, descritivo, retrospectivo baseado em amostras de LCR nas quais foram identificadas infecção pelo vírus VZV, todas estas coletadas de pacientes apresentando quadro clínico compatível com meningite, encefalite ou meningoencefalite aguda.

### 4.2 POPULAÇÃO DE ESTUDO

As amostras analisadas neste estudo fazem parte de um estudo maior intitulado “*Avaliação das características etiológicas, clínicas e epidemiológicas de casos de meningites, encefalites e meningoencefalites atendidos no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo*” (CAPPesq – CAAE 67203417.0.0000.0068; FAPESP: 2017/10264-6).

Neste estudo foram incluídos 600 casos de MEM provenientes da Divisão de Líquor do Laboratório Central do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HC-FMUSP) e do Laboratório Senne Liquor (LSL). Trata-se, portanto, de uma amostra de conveniência.

As referidas amostras foram identificadas por meio da utilização de duas plataformas diagnósticas comerciais multiplex FilmArray® Meningitis/Encephalitis (ME) Panel (bioMérieux, França) e XGEN UMLTI N9® (Biometrix Diagnóstica, Brasil), utilizadas na rotina diagnóstica dos serviços de onde procedem as amostras. Ainda, foi utilizado um algoritmo de aplicação de testes de PCR *in house* otimizadas durante a condução do projeto no Laboratório de Virologia do Instituto de Medicina Tropical da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (LV-IMT).

### 4.3 PERÍODO DO ESTUDO E SELEÇÃO DOS PACIENTES

As amostras foram coletadas no período compreendido entre fevereiro de 2018 e dezembro de 2019.

#### 4.3.1 Critérios de inclusão dos casos de MEM

- I. Pacientes com quadro clínico compatível com meningite, encefalite ou meningoencefalite aguda de origem infecciosa, estabelecido pelo médico assistente responsável;
- II. Identificação molecular do VZV como agente etiológico do quadro infeccioso por meio de técnica laboratorial validada.

### 4.4 INSTRUMENTOS DE COLETA DE DADOS

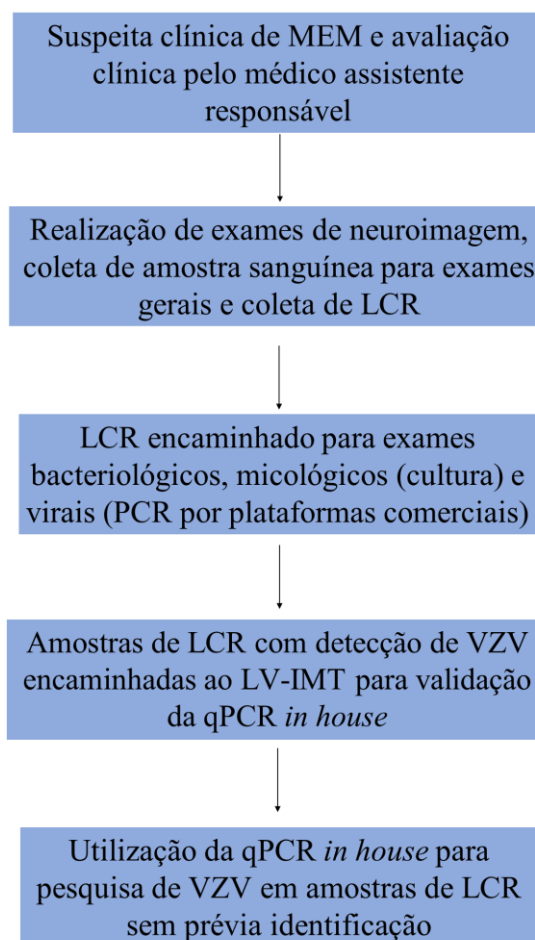
As informações laboratoriais dos pacientes foram obtidas a partir dos sistemas de dados dos respectivos locais de processamento das amostras (HC-FMUSP e LSL). Informações clínicas, quando disponíveis, foram obtidas e revisadas a partir do prontuário clínico dos pacientes. Todas as informações compiladas foram inseridas em formulários criados na plataforma REDCap, atualizada de forma retrospectiva conforme a inclusão dos pacientes<sup>139,140</sup>.

### 4.5 PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS

As amostras de LCR foram obtidas por punção de medula espinhal conforme o protocolo do local da coleta e enviadas ao LV-IMT e, então, separados em alíquotas de 250 µL em criotubos. As amostras foram armazenadas a -80°C até o momento do uso.

Os casos incluídos foram submetidos à investigação etiológica de acordo com o esquema abaixo, obedecendo ao protocolo de interno da respectiva unidade hospitalar antes da investigação viral:

Figura 4 - Fluxograma de etapas desde o estabelecimento do diagnóstico do quadro de MEM infecciosa aguda até a investigação etiológica em amostras de LCR



Fonte: Desenvolvido pelo autor; 2023.

## 4.6 AVALIAÇÃO DA PCR EM TEMPO REAL *IN HOUSE* PARA DETECÇÃO DO DNA VIRAL DE VZV EM AMOSTRAS DE LCR

### 4.6.1 *Primers* e sondas

As sequências de *primers* (Invitrogen®, Waltham, EUA) e sonda (Applied BioSystems®, Waltham, EUA) para VZV foram obtidas conforme descrição prévia de Weidmann, Armbruster e Hufert (2009)<sup>141</sup>, compreendendo uma região altamente conservada da polimerase do VZV, e cujo desenho dos *primers* foi baseado nos protótipos AB059828-31 a X04370. Estas foram sintetizadas e liofilizadas para uma concentração inicial de 100 µM (100 pMol/µL), conforme Tabela 8.

Tabela 8 - Sequências de primers e sonda para detecção do VZV

	Sequência 5' – 3'
<b>Primer senso</b>	CGGCATGGCCCGTCTAT
<b>Primer anti-senso</b>	TCGCGTGCTGCGGC
<b>Sonda (NED-MGB)</b>	ATTCAGCAATGGAAACACACGACGCC

Fonte: Desenvolvida pelo autor; 2023.

### 4.6.2 Oligonucleotídeos sintéticos e controles de reação

Uma sequência de oligonucleotídeos sintéticos (curva sintética) (Exxtend®, Paulínia, Brasil) contendo regiões complementares aos *primers* e sonda foi desenhada e usada como alvo e controle no processo de otimização da PCR em tempo real, conforme exemplificado em um modelo de PCR descrito por Tourinho et al (2015)<sup>142</sup>. A sequência foi sintetizada, purificada (HPLC - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência) e liofilizada a uma concentração de 100 µM, com alvos complementares aos *primers* e sondas do estudo e é descrita na tabela abaixo.

Tabela 9 - Sequência de oligonucleotídeo sintético

	Sequência 5' – 3'		
<b>Oligonucleotídeo sintético</b>	CGATA	TCGCGTGCTGCGGC	GCTAT
	GCGTCGTGTGTTTCCATTGCTGAAT		CGTGC
	ATAGACGGGCCATGCCG TACTG		

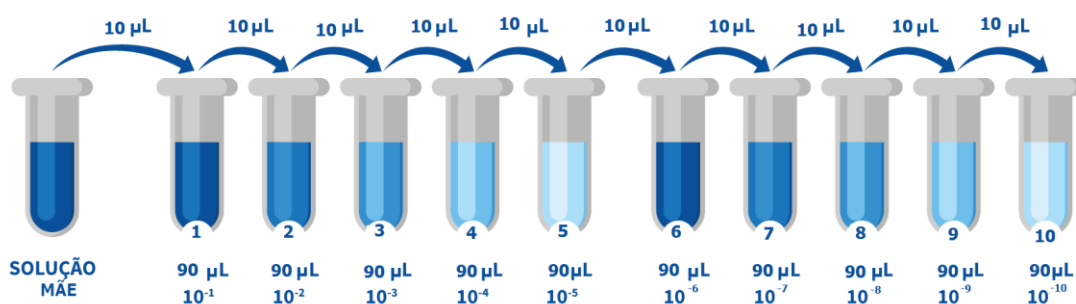
Fonte: Desenvolvida pelo autor; 2023.

Para sua utilização, foi realizada diluição em água ultrapura livre de DNase e RNase (Ambion™, Invitrogen®, Waltham, EUA) a 100 µM, e concentração equivalente a  $10^{13}$  moléculas de DNA/µL, de acordo com o cálculo do número de Avogadro.

$$\left( \frac{[DNAg/\mu L]}{\text{Tamanho da sequência do oligo (bp)} \times 660} \right) \times (6,022 \times 10^{23})$$

Após a ressuspensão do oligonucleotídeo sintético liofilizado, foram realizadas duas diluições iniciais de 1:1000 em tampão Tris-EDTA (LGC®, Cotia, Brasil) 1x concentrado e, a partir da segunda diluição, foram feitas diluições na base 10, também em Tris-EDTA, conforme ilustrado na imagem a abaixo.

Figura 5 - Diluição seriada na base 10 do oligonucleotídeo sintético em tampão Tris-EDTA



Fonte: Desenvolvido pelo autor; 2023.

Ao menos cinco pontos medianos da diluição seriada (de alta, média e baixa concentração) foram usados para análise dos parâmetros de eficiência da reação. A adição da mistura de reagentes aos poços da placa de PCR em tempo real foi realizada na sala de pré-PCR, enquanto os oligonucleotídeos sintéticos foram adicionados na sala de pós-PCR, em cabine de biossegurança específica para este fim (DNA *workstation*, Loccus do Brasil, Cotia, Brasil).

Além dos oligonucleotídeos sintéticos (controles sintéticos), foram utilizados controles positivos obtidos a partir de cultura de cepa vacinal vOka (01 por reação). Controles negativos NTC (*non template control*), baseado no uso de água ultrapura livre de nucleases (01 por reação) (Ambion™, Invitrogen®, Waltham, EUA), e controles negativos baseados em amostras positivas para outros herpesvírus (HSV-1, HSV-2, EBV, CMV e HHV-6) (n=06) também foram utilizados para análise de especificidade.

#### **4.6.3 Protocolo da mistura de PCR em tempo real**

O processo de PCR em tempo real foi baseado no sistema TaqMan, com uso de tampão *Universal Master Mix TaqMan 2x* (com UNG) (Applied BioSystems® - Thermo Fisher, Waltham, EUA), conforme instruções do fabricante. Os iniciadores (*primers*) foram adicionados à 300 nM, a sonda à 120 nM, conforme análise da titulação em bloco feita previamente. Um total de 20 ng de amostra de DNA (*template*) foi adicionada à mistura para um volume final de 20 µL de reação.

O preparo da mistura de PCR em tempo real foi realizado na sala de pré-PCR em microtubos de 1,5 mL (Axygen®, Corning, EUA). Após o preparo da mistura, foi realizada a homogeneização dos reagentes, rápida centrifugação e distribuição de 15 µL da mistura em cada poço de uma placa de 96 poços (Axygen®, Corning, EUA). Posteriormente, foram adicionados à mistura 5 µL de *template* em cada um dos poços.

#### 4.6.4 Protocolo de termociclagem

A termociclagem foi realizada no QuantStudio 5 (Applied BioSystems® - Thermo Fisher, Waltham, EUA), utilizando o fluoróforo ROX como referência passiva, conforme a Tabela 10. Os resultados foram analisados no software QuantStudio™ Design & Analysis 1.4.1 (QuantStudio™, Applied BioSystems®, Waltham, EUA) e expressos em Ct (*Cycle threshold*), conforme as instruções do fabricante.

Tabela 10 - Protocolo da termociclagem da PCR em tempo real para VZV

	Temperatura (°C)	Tempo (segundos)	Ciclos
<b>Ativação do UNG</b>	50	120	1
<b>Ativação da DNA Taq Polimerase</b>	95	600	1
<b>Desnaturação</b>	95	15	40
<b>Anelamento / Extensão</b>	60	60	40

Fonte: Desenvolvida pelo autor; 2023.

#### 4.6.5 Parâmetros de desempenho do teste PCR *in house*

##### 4.6.5.1 Relação Ct e carga viral

Com base ao menos cinco pontos da diluição seriada (cujas concentrações foram previamente conhecidas), uma reta de regressão foi construída para determinar a relação entre Ct (*Cycle threshold*) e número de cópias do fragmento gênico viral. Os valores esperados para o desempenho satisfatório do teste foram descritos previamente, conforme Bustin et al (2009)<sup>143</sup>. O manual do fabricante do sistema



*Taqman* (Thermo Fisher Scientific, Waltham, EUA) igualmente aponta os valores esperados\*:

*Slope* entre -3,5 a -3,2

R<sup>2</sup> em torno de 1,0

Eficiência entre 90% a 110%

---

\* Thermo Fisher Scientific. QuantStudio™ design and analysis software: user guide [Internet]. Waltham: Thermo Fisher Scientific; c2015 [cited 2022 Dec 106 p. Available from: [tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/MAN0010408\\_QuantStudioDesign\\_Analysis\\_Desktop\\_Software\\_UG.pdf](https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/MAN0010408_QuantStudioDesign_Analysis_Desktop_Software_UG.pdf)

#### 4.6.5.2 Sensibilidade analítica

A sensibilidade analítica da PCR *in house* para VZV foi expressa pelo LoD (do inglês, Low detection) a partir da diluição dos oligos sintéticos com objetivo de determinar a menor concentração detectável com uma confiabilidade maior ou igual a 95% (LoD $\geq$ 95%), conforme preconizado por Bustin et al (2009)<sup>143</sup> e pelo Colégio Americano de Patologistas<sup>144</sup>. Os pontos da curva padrão foram ensaiados em réplicas (octaplicatas) e foi considerado o ponto de menor diluição em que não houve nenhuma falha de detecção para definir a sensibilidade analítica do teste (log<sub>10</sub> cópias por  $\mu$ l ou por ml ou por reação).

#### 4.6.5.3 Variação intra e inter-teste

A variação de Ct entre os pontos das réplicas é aceitável quando o coeficiente de variação é inferior a 3% (Bustin et al., 2009)<sup>143</sup>. Para determinar a variação intra e inter-teste, foram selecionados 7 controles positivos sintéticos (pontos de diluição da curva sintética) em triplicata na mesma placa e em placas diferentes, respectivamente. O coeficiente de variação foi dado em porcentagem, definido pela divisão do valor de desvio padrão pelo valor da média dos Cts x 100.

### 4.7 EXTRAÇÃO DE ÁCIDOS NUCLEICOS

A extração de ácidos nucleicos das amostras de LCR foi realizada por duas metodologias: 1- plataforma automatizada NUCLISENS® EASYMAG® (bioMérieux, Capronne, França) para as etapas de PCR *in house* e MS, a partir de 500  $\mu$ L de LCR; e 2- plataforma automatizada Locus EXTRACTA 32 (Locus, Cotia, São Paulo, Brasil), para etapa de SMP, a partir de 200 $\mu$ L de LCR ultrafiltrado por centrifugação a 12780 g por 10 minutos em microtubo com filtro de 0,45 micros de diâmetro (Amicon® - Merck, Darmstadt, Alemanha). O diâmetro de 0,45 micros dos poros do filtro permite apenas a passagem de material genético viral presente no meio extracelular do LCR. Este processo visou reter células humanas, bacterianas, fúngicas e/ou parasitárias.

Ambas as plataformas se baseiam no princípio do uso de *beads* magnéticas e extração simultânea de DNA e RNA. Foram seguidas as instruções dos fabricantes e, após o processo, as amostras foram armazenadas a -80°C até o momento do uso.

O rendimento total de DNA para as etapas de PCR *in house* e MS foi avaliado por meio da análise espectrofotométrica (NanoDrop™, ThermoFisher®, EUA), enquanto a qualidade do processo de extração dos ácidos nucleicos foi realizada com base na detecção do gene da RNase P humana (controle interno), de acordo com Emery et al (2004)<sup>145</sup>.

#### 4.8 PCR *IN HOUSE* PARA VZV NO LCR

##### 4.8.1 Validação da PCR *in house* para VZV em LCR e investigação etiológica

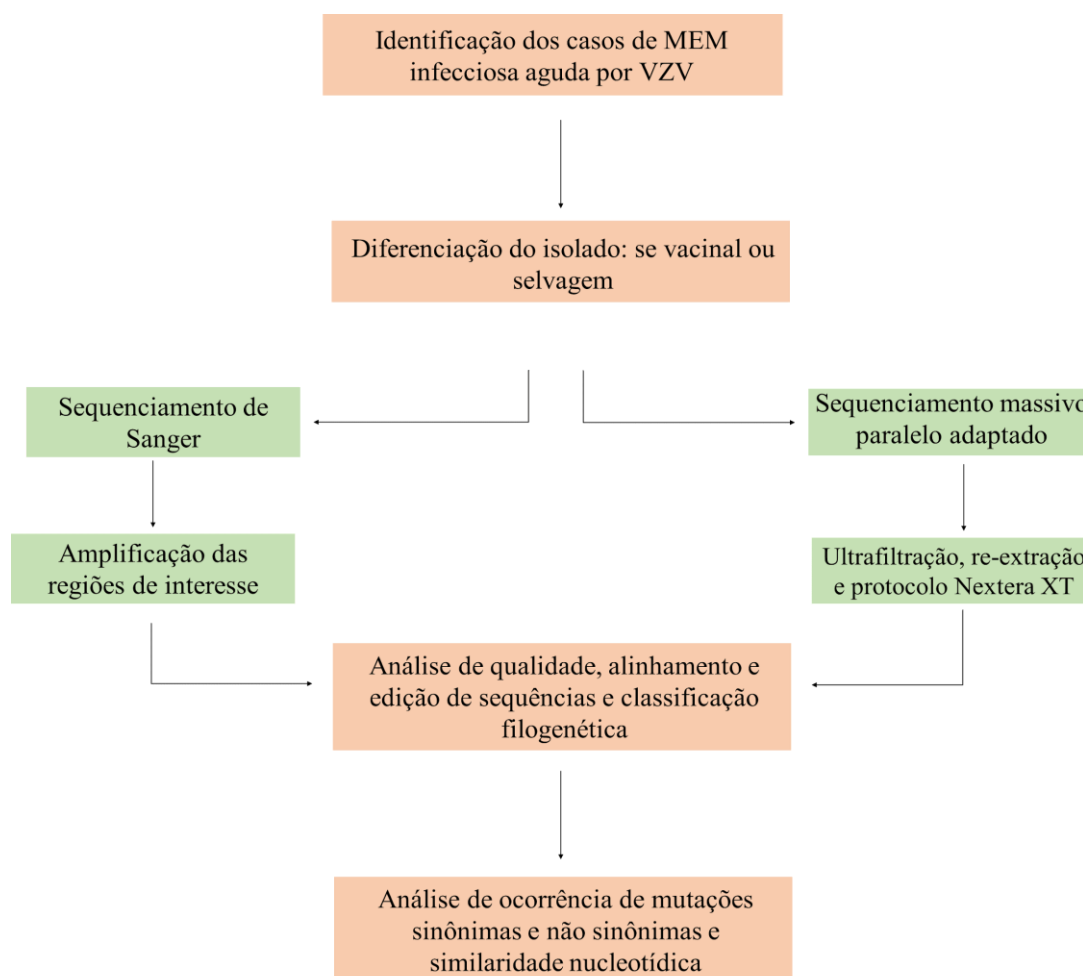
Amostras de LCR ensaiadas pelas plataformas comerciais FilmArray® Meningitis/Encephalitis (ME) Panel (bioMérieux, França) e XGEN UMLTI N9® (Biometrix Diagnóstica, Brasil) serviram como controle de validação dos resultados da PCR *in house*. A taxa de concordância entre os resultados das plataformas comerciais e da PCR *in house* foi analisada.

Amostras sem prévia identificação etiológica também foram submetidas à PCR *in house* para detecção de casos de MEM por VZV.

#### 4.9 CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DOS ISOLADOS DE VZV

A partir das amostras de LCR identificadas como positivas para VZV, procedeu-se à duas etapas de análises moleculares: I - diferenciação do isolado entre selvagem e vacinal; e II – sequenciamento e análise filogenética para determinação dos clados presentes no grupo de estudo e análises de variabilidade e mutações. Segue adiante fluxo de trabalho e descrição dos protocolos.

Figura 6 - Fluxograma das etapas de caracterização molecular dos isolados de VZV nos 30 casos incluídos neste estudo



Fonte: Desenvolvido pelo autor; 2023.

#### 4.9.1 Diferenciação de isolado vacinal e selvagem

A diferenciação da origem viral foi feita conforme descrito por Campsall et al (2004)<sup>146</sup>. A metodologia baseia-se na detecção de sequências variantes na presença de uma mutação pontual ou (SNPs) na região 107252 do genoma do VZV (sequência código AB097933.1), conforme comprovado por Gomi et al (2000)<sup>147</sup>. A discriminação da variante viral tem por base a amplificação do DNA viral pela sonda WT-VZ62T para vírus selvagem ou pela sonda O-VZ62T para o vírus vacinal, conforme os *primers* e sondas apresentados na tabela abaixo.

Amplificação do DNA viral foi feita com base no sistema Taqman com tampão *Universal Master Mix* (Applied BioSystems® - Thermo Fisher, Waltham, EUA). As concentrações dos reagentes e o protocolo da termociclagem foram realizadas conforme as instruções do fabricante.

Tabela 11 - Sequência de primers e sondas sintetizados para utilização no processo de diferenciação entre isolado selvagem e vacinal, de acordo com o proposto por Campsall et al.

	<b>Sequência 5' – 3'</b>
<b>Primer senso</b>	ACTGGAGCCCGTTGCCTC
<b>Primer anti-senso</b>	TCCTACAGAGTCTCCGCAGAGC
<b>Sonda WT-VZ62T (FAM / MGB)</b>	TTGCCAGCATGGC
<b>Sonda O-VZ62T (VIC / MGB)</b>	TTGCCGGCATGGC

Fonte: Campsall et al (2004)<sup>145</sup>

#### 4.9.2 Sequenciamento pela metodologia de Sanger

##### 4.9.2.1 Amplificação das ORFs 22, 38, 54 e 62

A amplificação das sequências de DNA de VZV foi obtida por PCR convencional para quatro ORFs do genoma viral: 22, 38, 58 e 62, que possuem fragmentos de 447, 350, 222 e 419 pb, respectivamente. Os alvos gênicos para o sequenciamento de DNA por MS foram selecionados após ampla revisão da literatura e baseadas em protocolos descritos pelos autores da tabela abaixo.

Tabela 12 - Sequência de primers sintetizados para utilização no processo de classificação genotípica

	ORF	Sequência 5' – 3'	Autor
<b>p22R1f</b>		GGGTTTTGTATGAGCGTTGG	Loparev et al, 2007 <sup>130</sup>
<b>p22R1r</b>	22	CCCCCGAGGTTTCGTAATATC	Sauerbrei et al, 2007 <sup>148</sup>
<b>PstA38</b>		TTGAACAATCACGAACCGTT	
<b>PstB38</b>	38	CGGGTGAACCGTATTCTGAG	LaRussa et al, 1992 <sup>149</sup>
<b>Fok54</b>		TCCCTTCATGCCCGTTACAT	LaRussa et al, 1998 <sup>150</sup>
<b>Nla54</b>	54	GGAACCCCTGCACCATTA	
<b>62F</b>		GGCCTTGGAACACATGATCG	
<b>62R</b>	62	CGTCTCCCGTTCCGCATGTAG	Luan et al, 2019 <sup>47</sup>

Fonte: Desenvolvido pelo autor; 2023.

A mistura da reação da PCR convencional foi composta por água ultrapura livre de nucleases e tampão Q5 Hot Start High-Fidelity Reaction Buffer™, dNTPs e DNA polimerase (BioLabs Inc.®, Ipswich, EUA), além dos *primers* (senso e anti-senso) descritos na tabela acima sintetizados pela empresa Exxtend®, Paulínia, Brasil.

As concentrações adotadas para os reagentes estão de acordo com protocolo proposto pelo fabricante (Q5 Hot Start High-Fidelity – BioLabs Inc.®, Ipswich, EUA), à exceção dos *primers* cujas concentrações foram otimizadas para 200 nM. O protocolo de termociclagem também obedeceu ao proposto pelo fabricante, com variação apenas na temperatura de anelamento, de acordo com a temperatura de *melting*, informada pelo fabricante dos *primers* (Exxtend®, Paulínia, Brasil) e confirmada com o uso da ferramenta eletrônica *Oligonucleotide Properties Calculator* (Kibbe, 2007)<sup>151</sup>, cuja versão atual encontra-se disponível em: <http://biotools.nubic.northwestern.edu/OligoCalc.html><sup>†</sup>.

<sup>†</sup> Kibbe WA, Buehler E, Cao Q. Oligo Calc: Oligonucleotide Properties Calculator [Internet]. Chicago: Northwestern University; 2015 [cited 2022 Dec 12]. Available from: <http://biotools.nubic.northwestern.edu/OligoCalc.html>

#### 4.9.2.2 Identificação dos fragmentos de DNA alvo em gel de agarose

Os produtos de PCR foram submetidos a eletroforese com corrente constante de 100 mA em gel de agarose (UltraPure™ Agarose, Invitrogen®, Waltham, EUA) a 1,5%, e Brometo de Etídeo (UltraPure™ Ethidium Bromide, Invitrogen®, Waltham, EUA), juntamente com peso molecular (PM) de 100 pb (100 bp DNA Ladder™, Invitrogen®, Waltham, EUA) e *Low Mass DNA Ladder* (LM) (Invitrogen®, Waltham, EUA) para semi-quantificação do DNA presentes na amostra em ng. A visualização da corrida ocorreu por meio de transiluminador com luz ultravioleta (Major Science, Saratoga, CA, EUA). As imagens obtidas foram salvas e arquivadas em formato .tiff.

As amostras que apresentaram amplificação de DNA dos alvos gênicos de interesse visualizados no gel de agarose foram selecionadas para a etapa de purificação e sequenciamento do DNA.

#### 4.9.2.3 Purificação das amostras e reação de sequenciamento pelo método de Sanger

A qualidade do produto de amplificação foi avaliada por revelação dos fragmentos gênicos em gel de agarose. Amostras pré-amplificadas, com grau de pureza comprometido pela formação de dímeros de *primers* ou bandas inespecíficas, foram submetidos a um processo de purificação a partir de fragmento retirado diretamente do gel de agarose, utilizando o kit comercial GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit (GE Healthcare®, Reino Unido). Amostras que não apresentaram estas condições foram purificadas utilizando o método de coluna de sílica, conforme instruções do kit comercial QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen, Hilden, Alemanha).

Os produtos purificados foram submetidos à etapa de sequenciamento. A reação de sequenciamento pelo MS foi realizada pelo kit comercial *Big Dye™ Terminator v 3.1 Cycle Sequencing Ready Reaction* (Applied BioSystems® - Thermo Fisher, EUA) em diluição 1:4. A mistura de reação continha, ainda, água ultrapura livre de nucleases (Ambion™, Invitrogen®, Waltham, EUA), *primers* (Exxtend®, Paulínia, Brasil) e *template*, com volume final de reação de 20 µL. As concentrações dos *primers* e volumes de *templates* utilizados foram baseadas em protocolo do Centro de

Genômica da Universidade de Nevada, Estados Unidos<sup>‡</sup>. O protocolo de termociclagem baseou-se nas instruções do fabricante do tampão Big Dye™ (Applied BioSystems® - Thermo Fisher, EUA).

Por fim, para remoção de nucleotídeos não incorporados na reação de sequenciamento, foi feita purificação pelo método de precipitação com isopropanol 65%, de acordo com especificações do fabricante do kit comercial *Big Dye*™ (Applied BioSystems® - Thermo Fisher, EUA). Após adição de 90 µL de isopropanol, homogeneização e incubação à temperatura ambiente e ao abrigo da luz, por 20 minutos, as amostras foram centrifugadas à 5.975 g por 45 minutos. Após centrifugação e remoção de resíduos de isopropanol, as amostras foram novamente purificadas com 200 µL de etanol 70%. Após adição de etanol às amostras, elas foram centrifugadas à 5.975 g por 20 minutos. Após processo de purificação e evaporação total do etanol, foi realizada a ressuspensão do sedimento seco com formamida 10% e realizada desnaturação a 95°C por 5 minutos, seguido de resfriamento a 4°C. As amostras, então, foram levadas para sequenciamento em Sequenciador Automático ABI 3730, que faz uso de metodologia de eletroforese capilar (Applied BioSystems® - Thermo Fisher, EUA).

A etapa de sequenciamento pelo MS e obtenção dos eletroferogramas foi realizada nas dependências do Laboratório de Imunopatologia do HC-FMUSP, com apoio técnico do Dr Hebert Fabrício Culler e da professora Dra Juliana Pereira.

#### 4.9.2.3.1 Qualidade das sequências, alinhamento e geração de sequências consenso

A avaliação da qualidade das sequências, leitura das bases sequenciadas e criação de sequência reverso complementar foi realizada pelo software CodonCode Aligner V.10.0.2 (CodonCode Corporation).

As sequências *foward* e reversa complementar que apresentavam alto grau de qualidade de sequenciamento, de acordo com o algoritmo de Phred, foram alinhadas

---

<sup>‡</sup> University of Nevada. Nevada Genomics Center. Sanger sequencing: Optimal amount of template and primer [Internet]. Reno: University of Nevada; [date unknown]. Available from: <https://www.unr.edu/genomics/guidelines/ss-template-primer>



utilizando a metodologia *Muscle*<sup>152</sup> incorporada ao software Seaview V.5.0.4 para geração de uma sequência consenso.

As sequências dos 4 alvos genômicos escolhidos foram concatenadas para formação de uma única sequência, posteriormente comparadas às sequências protótipos já disponíveis no GenBank (NCBI, EUA) para a reconstrução filogenética.

#### 4.9.3 Sequenciamento de DNA por sequenciamento massivo paralelo

A fim de obter informações moleculares complementares em relação ao genoma dos isolados de VZV de nossa casuística, procedeu-se ao SMP. As amostras deste estudo foram incluídas para análise em SMP juntamente à outras amostras de LCR de pacientes com MEM, estas de etiologia desconhecida e advindas da casuística do projeto piloto, as quais são parte de outro projeto desenvolvido pelo nosso grupo.

##### 4.9.3.1 Protocolo Nextera XT adaptado, purificação e quantificação

O material extraído foi submetido ao protocolo de sequenciamento Nextera XT DNA Library Prep (Illumina Inc.®, Califórnia, EUA)<sup>§</sup>, com capacidade para sequenciamento concomitante de até 384 bibliotecas (amostras) com alto grau de pureza. Todas as bibliotecas sequenciadas foram marcadas com os chamados adaptadores (*index*) que permitem a posterior identificação das bibliotecas.

O protocolo seguiu as instruções do fabricante nas etapas de tagmentação (fragmentação da sequência de DNA através da enzima transposase) e amplificação, e com adaptação no protocolo de termociclagem: 72°C por 3 minutos, 95°C por 30 segundos, seguidos de 16 ciclos de 95°C por 10 segundos, 55°C por 40 segundos,

---

<sup>§</sup> Illumina. Nextera XT DNA Library Prep: reference guide [Internet]. San Diego: Illumina; 2019 [cited 2022 Dec 12]. Available from: [https://emea.support.illumina.com/content/dam/illumina-support/documents/documentation/chemistry\\_documentation/samplepreps\\_nextera/nextera-xt/nextera-xt-library-prep-reference-guide-15031942-05.pdf](https://emea.support.illumina.com/content/dam/illumina-support/documents/documentation/chemistry_documentation/samplepreps_nextera/nextera-xt/nextera-xt-library-prep-reference-guide-15031942-05.pdf)

72°C por 50 segundos e um único ciclo final de 72°C por 5 minutos e resfriamento (*hold*) a 10°C.

As bibliotecas foram purificadas de acordo com instruções do protocolo ProNex® Size-Selective Purification System (Promega®, Wisconsin, EUA), em proporção de 1:2 em relação ao volume final da mistura de PCR (+54µL)\*\* em placa de polipropileno do tipo “poço profundo” (poço de 0,8 mL) (Laborglass, São Paulo, Brasil).

A quantificação ocorreu de acordo com instruções do protocolo ProNex® NGS Library Quant Kit (Promega®, Wisconsin, EUA)<sup>††</sup> através de uma curva padrão construída a partir de plasmídeos e com valores preconizados de *Slope* (-3,10 a -3,70) e R<sup>2</sup> (>0,990).

As bibliotecas foram amplificadas em termociclador 7500 Real-Time PCR System Program (Applied BioSystems®, Waltham, EUA) a 95°C por 2 minutos, seguido de 30 ciclos de 95°C por 15 segundos, 60°C por 15 segundos e 72°C por 45 segundos e a análise de seus respectivos resultados foi realizada no software 7500 Software v2.3. Os valores finais de quantificação das bibliotecas foram expressos em pM e nM.

#### 4.9.3.2 Normalização das bibliotecas, preparação de *pool* de amostras e controle de qualidade

As bibliotecas foram normalizadas para uma concentração igualitária de 2 ng dentro de um mesmo *pool*. A análise da qualidade das bibliotecas (tamanho, quantidade e integridade) que constituíam o *pool* foi realizada com o sistema de eletroforese automatizada Agilent 4200 *TapeStation* (Agilent Technologies Inc.,

---

\*\* Promega. ProNex® Size-Selective Purification System [Internet]. Madison: Promega; [date unknown] [cited 2022 Dec 12]. Available from: [https://france.promega.com/-/media/files/resources/protocols/technical-manuals/500/m508-pronex-size-selective-purification-system.pdf?rev=d6b3a4c148a14b608cdb29b4bd6ce542&sc\\_lang=en](https://france.promega.com/-/media/files/resources/protocols/technical-manuals/500/m508-pronex-size-selective-purification-system.pdf?rev=d6b3a4c148a14b608cdb29b4bd6ce542&sc_lang=en)

<sup>††</sup> Promega. ProNex® NGS Library Quant Kit [Internet]. Madison: Promega; [date unknown] [cited 2022 Dec 12]. Available from: <https://www.promega.com.br/-/media/files/resources/protocols/technical-manuals/500/pronexngslibraryquantkit.pdf?rev=2a9f572733104279962a705216a285d2&la=en>

Califórnia, EUA). Os resultados obtidos foram exibidos em eletroferograma e imagem de gel com separação por peso molecular.

Após, foi utilizado o sistema *Pippin Prep DNA Size Selection* (Sage Science, Massachusetts, EUA) para seleção dos tamanhos de fragmento de interesse, a saber: entre 300 e 600 pb, objetivando a remoção de fragmentos que não correspondessem a sequência de patógenos, de acordo com recomendações da Illumina Inc.® (Califórnia, EUA). Os resultados da seleção de fragmentos foram analisados com o sistema Agilent 4200 *TapeStation* (Agilent Technologies Inc., Califórnia, EUA).

#### 4.9.3.3 Sequenciamento massivo paralelo (Illumina® Inc)

O *pool* de bibliotecas foi submetido ao SMP, cujo princípio baseia-se na metodologia *based pair*, na qual duas sequências *forward* e duas sequências reversas são lidas de forma concomitante durante o processo. O protocolo da reação seguiu as instruções do fabricante (Illumina® Inc).

O processo ocorreu em sequenciador automatizado NovaSeq600 (Illumina®, San Diego, Califórnia, EUA) que faz uso de células de fluxo com um total de 500 ciclos (2 x 250), de acordo com especificações do protocolo Nextera XT. O processo ocorreu no Laboratório Multiusuário do Centro de Estudos do Genoma Humano e Células-Tronco do Instituto de Biociências da Universidade São Paulo.

#### 4.9.3.4 Qualidade das sequências, alinhamento de aminoácidos e pré-identificação

Os arquivos brutos com as sequências foram obtidos em formato FASTQ, de acordo com o *pipeline* do sequenciador, e para cada amostra foram gerados quatro arquivos: dois arquivos *forward* e dois reversos. Os arquivos em formato FASTQ eram compatíveis com diferentes softwares de análise genética.

Arquivos com alta quantidade de megabytes indicavam alta obtenção de *reads*. A quantidade e qualidade das *reads* geradas, bem como sua respectiva pré-identificação através do alinhamento de AAs (*de novo*), foi realizada conforme

proposto por Deng et al (2015)<sup>153</sup>, com uso do software Ugene v45.1<sup>154</sup>. A remoção das sequências de adaptadores, as quais são sequências de baixa qualidade, foi realizada de forma automática pelo software, que trima as *reads* a partir de um *cut off* de qualidade.

Após o alinhamento de AAs e prévia identificação, as amostras que continham sequências que correspondiam ao gênero *Varicellovirus* foram comparadas quanto à similaridade nucleotídica à demais sequências depositadas no GenBank com o uso da ferramenta BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*)<sup>‡‡</sup>. As sequências que correspondiam ao VZV foram avaliadas quanto ao *e-value* e o número de *contigs* gerados. Foram criadas sequências consenso a partir das sequências *forward* e reversa de cada amostra. Sequências correspondentes a genomas humanos e não virais foram desconsideradas nas análises posteriores. Sequências que correspondiam ao VZV foram utilizadas para análises de variabilidade após alinhamento com sequências protótipos.

#### 4.9.4 Classificação filogenética

As sequências obtidas por MS foram alinhadas às referências (sequências protótipos) e serviram de base para construção dos cladogramas, criados com auxílio do software Geneious version 2023.0, criado por Biomatters e disponível em <http://www.geneious.com><sup>§§</sup>.

Para reconstrução filogenética foi utilizado o método de agrupamento de vizinhos (NJ - Neighbor Joining) (K-2-P) e, por default, o método de troca de vizinhos mais próximos (NNI - Nearest Neighbor Interchange), afim de pesquisar sequências que possam agrupar ou separar os produtos do sequenciamento em diferentes clados. Rearranjos foram realizados com base no algoritmo heurístico NNI.

---

<sup>‡‡</sup> Myers E, et al. Basic Local Alignment Search Tool [Internet]. Bethesda: National Institutes of Health; [date unknown] [cited 2022 Dec 12]. Available from: <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>

<sup>§§</sup> Biomatters. Geneious version 2023.0 [Internet]. Auckland: Biomatters; 2023 [cited 2023 Jan 5]. Available from: <http://www.geneious.com>

Para análise da confiabilidade dos eventos de cladogênese, foi executado Bootstrap com 1.000 réplicas. A visualização das reconstruções foi realizada também pelo software utilizado o software Geneious version 2023.0.

#### **4.9.5 Análise de similaridade nucleotídica e sequência de aminoácidos**

O programa Ezbiocloud<sup>154</sup> foi utilizado para estimar a similaridade nucleotídica das amostras sequenciadas com demais protótipos. Para análises nas sequências de AAs foi utilizado o software Seaview V.5.0.4 e a ferramenta online *Protein Blast*.

A análise de variabilidade das regiões genômicas abrangeu os nucleotídeos das posições 37837 a 38283 (ORF 22), 69250 a 69599 (ORF 38), 95109 a 95330 (ORF 54) e 106983 a 107401 (ORF 62), sequenciados por MS, e com base no genoma da estirpe Dumas (X04370.1)<sup>31</sup>.

Os isolados utilizados neste estudo foram comparados, também, com isolados presentes no GenBank, tanto de bibliotecas de LCR quanto de amostra de obtida de lesões cutâneas.

#### **4.9.6 Sequências protótipos depositadas no GenBank**

As sequências protótipos (referências) do VZV obtidas em diversas regiões geográficas e depositadas no GenBank foram utilizadas nas reconstruções filogenéticas. As sequências protótipos são listadas no Anexo A, indicando para qual das regiões esta serviu como referência, o ano de deposição, região geográfica de obtenção e o tipo de amostra biológica utilizada.

### **4.10 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS**

O presente estudo foi aprovado pelo comitê de ética do HC-FMUSP, sob CAPPesq - CAAE número 67203417.0.0000.0068 (Anexo B), sendo anexado como emenda do projeto piloto, no qual se originou a casuística de estudo. O projeto contou,

ainda, com fomento da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) sob número de processo 2017/10264-6 e do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) sob número de processo 830626/1999-9 (bolsa de mestrado).

#### 4.11 REVISÕES BIBLIOGRÁFICAS

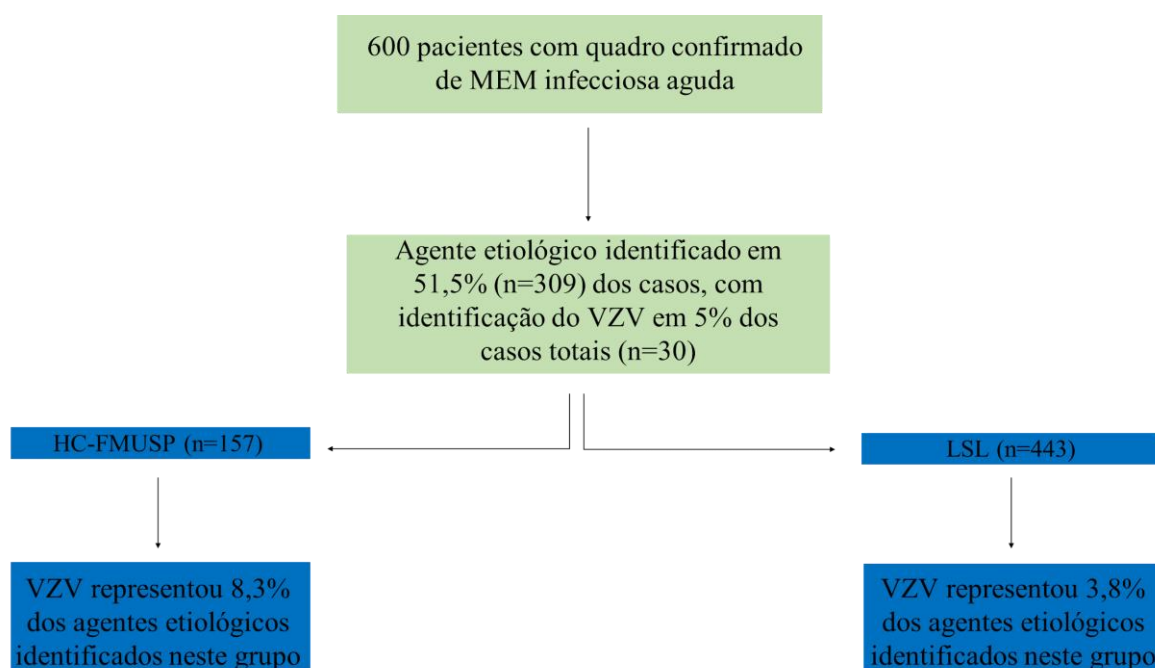
Para pesquisa bibliográfica de periódicos foram utilizadas as principais bases de dados disponíveis eletronicamente. Visando uma maior eficiência na obtenção das informações, além do uso de palavras-chave relevantes ao assunto abordado, foram utilizados descritores MESH e DeCS indexados respectivamente pelas bases MEDLINE e LILACS. Também foram revistas algumas publicações citadas por autores em suas referências.

## 5 RESULTADOS

### 5.1 CARACTERÍSTICAS DA POPULAÇÃO DO ESTUDO

Em uma casuística inicial de 600 casos de MEM infecciosa aguda, o VZV foi identificado em 30 amostras de LCR, por meio da PCR *in house* e/ou plataformas comerciais. Obteve-se 5% de positividade, entre todas as amostras analisadas. No grupo HC-FMUSP (n=157) o VZV apresentou frequência de 8,3%, enquanto no grupo LSL (n=443) frequência de 3,8%, conforme o esquema abaixo.

Figura 7 - Prevalência do VZV dentre os casos de MEM infecciosa aguda diagnosticados em unidades hospitalares de diferentes complexidades



Fonte: Desenvolvido pelo autor; 2023.

A Tabela 13 apresenta o resumo das principais características demográficas e clínicas disponíveis dos indivíduos com MEM infecciosa aguda na população de estudo, separadas de acordo com o grupo de origem.

A Tabela 14 descreve os parâmetros laboratoriais do LCR, também separadas de acordo com o grupo de origem.

Tabela 13 - Características demográficas e clínicas dos indivíduos com MEM infecciosa aguda

<b>Dados demográficos</b>	<b>Grupo HC-FMUSP (n=13)</b>	<b>Grupo LSL (n=17)</b>
Masculino (n, %)	7 (53,8%)	8 (47,1%)
Feminino (n, %)	6 (46,2%)	9 (52,9%)
Mediana de idade (anos) (min. - max.)	53 (17 – 79)	35 (17 – 72)
<b>Presença de lesão cutânea</b>		
Sim (n, %)	10 (76,9%)	3 (17,6%)
Não (n, %)	3 (23,1%)	14 (82,4%)
Não informado / não se recorda (n, %)	0	0
<b>Causas de imunossupressão identificadas</b>		
Transplante de órgão sólido (n, %)	5 (38,4%)	-
Diabetes (n, %)	4 (30,7%)	-
Doença autoimune (n, %)	1 (7,7%)	-
HIV (n, %)	1 (7,7%)	1 (5,9%)
Paciente oncológico (n, %)	1 (7,7%)	-
Uso de imunossupressor (n, %)	10 (76,9%)	-
Não informado / não se recorda (n, %)	0	16 (94,1%)
<b>Vacina para HZ</b>		
Sim (n, %)	0	-
Não (n, %)	6 (46,2%)	-
Não informado / não se recorda (n, %)	7 (53,8%)	17 (100%)
<b>Uso de medicação</b>		
Aciclovir (n, %)	11 (84,6%)	5 (29,4%)
Ceftriaxona (n, %)	1 (7,7%)	-
Ampicilina (n, %)	1 (7,7%)	-
Não especificado / informado (n, %)	4 (30,8%)	12 (70,6%)
<b>Desfecho clínico</b>		
Alta hospitalar (n, %)	6 (46,2%)	5 (29,4%)
Alta hospitalar com seqüela (n, %)	2 (15,4%)	1 (5,9%)
Óbito (n, %)	5 (38,4%)	-
Não informado (n, %)	0	11 (64,7%)

Fonte: Desenvolvida pelo autor; 2023.



Tabela 14 - Parâmetros laboratoriais do LCR de indivíduos com MEM infecciosa aguda

<b>Parâmetros laboratoriais</b>	<b>Grupo HC-FMUSP (n=13)</b>	<b>Grupo LSL (n=17)</b>
<b>Agentes coinfecantes detectados no LCR*</b>		
EBV** (n, %)	2 (15,4%)	0
HAdv** (n, %)	1 (7,7%)	0
HIV*** (n, %)	0	1 (5,9%)
<b>Carga viral (PCR <i>in house</i>) ****</b>		
Log <sub>10</sub> de cópias / mL (mediana)	3,7 (10,4 - 3,7)	8,1 (10,7 - 3,7)
<b>Análise física do LCR</b>		
Límpido e incolor	7 (53,8%)	1 (5,9%)
Levemente hemorrágico	2 (15,4%)	-
Levemente turvo	3 (23,1%)	1 (5,9%)
Turvo e xantocrômico	1 (7,7%)	-
Não informado	0	15 (88,2%)
<b>Pesquisa de células neoplásicas</b>		
Negativo	3 (23,1%)	1 (5,8%)
Não testado / não informado	10 (76,9%)	16 (94,2%)
<b>Parâmetros bioquímicos</b>		
Celularidade em mm <sup>3</sup> (mediana)	25 (4 - 1360)	165 (7 - 1442)
Proteínas em mg / dL (mediana)	60 (32 - 281)	98 (10 - 2014)
Lactato em mg / dL (mediana)	22 (0 - 40,5)	19 (5 - 67)
Glicose em mg / dL (mediana)	61 (43 - 126)	55 (40 - 133)

Legenda: \*A identificação de casos de coinfeção foi baseada em exames já realizados na unidade de atendimento dos pacientes e/ou no LV-IMT (HIV);

\*\*EBV e HAdv identificados como agentes coinfecante por FilmArray® Meningitis/Encephalitis (ME) Panel (bioMérieux, França) e/ou XGEN UMLTI N9® (Biometrix Diagnóstica, Brasil);

\*\*\*HIV identificado como agente coinfecante por detecção no LCR por metodologia molecular (PCR);

\*\*\*\*Para cálculo da mediana, amostras que apresentaram amplificação abaixo do limite quantificável tiveram suas respectivas cargas virais estimadas de acordo com o LoD 95%.

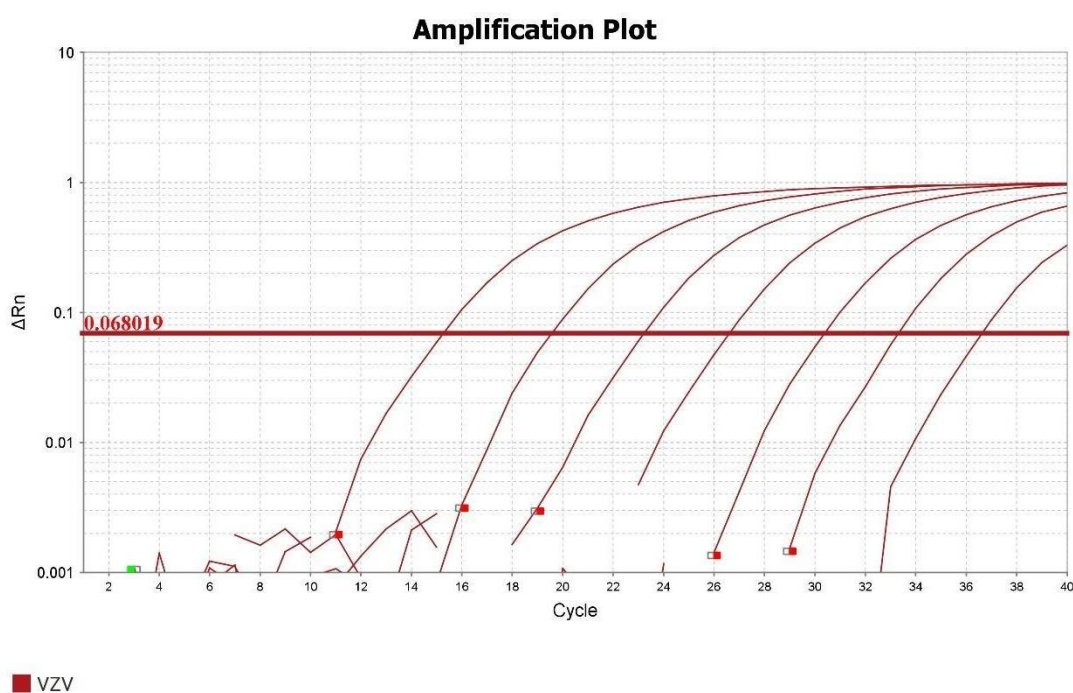
Fonte: Desenvolvido pelo autor; 2023.

## 5.2 AVALIAÇÃO DA PCR EM TEMPO REAL *IN HOUSE*

### 5.2.1 Curva sintética e desempenho do teste

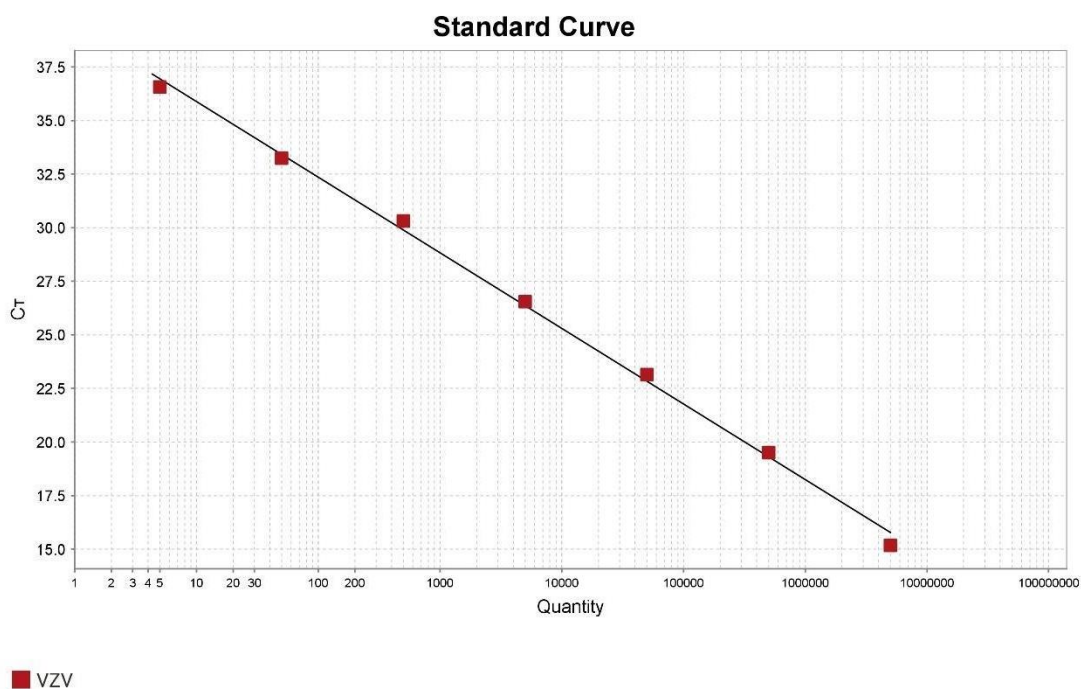
A linearidade da PCR foi observada entre os Cts 15,1 a 35,9 (pontos P3 a P9 da diluição), ou seja, a carga viral variou de 9,7 a 3,7  $\log_{10}$  de cópias por mL. Abaixo, é apresentado a curva de amplificação dos pontos de diluição dos oligonucleotídeos sintéticos (Figura 8) e a reta de regressão traçada entre a relação Ct e carga viral de VZV (Figura 9).

Figura 8 - Plot de amplificação de oligos sintéticos de VZV em pontos de diluição na base 10



Fonte: Desenvolvido pelo autor; 2023.

Figura 9 - Curva padrão - relação entre Ct (Cycle threshold) e carga viral – PCR in house para VZV



Fonte: Desenvolvido pelo autor; 2023.

A curva padrão da PCR em tempo real *in house* para VZV apresentou valores dentro dos parâmetros de referência. A tabela abaixo apresenta os valores de *Slope*,  $R^2$  e eficiência.

Tabela 15 - Parâmetros de eficiência do teste de PCR em tempo real *in house*

<b>Parâmetros (referência)*</b>	<b>Valor obtido PCR <i>in house</i></b>
<b><i>Slope</i></b> (-3,5 a -3,2)	-3,52
<b><math>R^2</math></b> ( $\approx 1,0$ )	0,99
<b>Eficiência</b> (90 % a 110%)	92,06%

Fonte: \*Parâmetros de referência: Bustin et al (2009) <sup>142</sup>

### 5.2.2 Sensibilidade analítica (LoD 95%)

As réplicas do menor ponto dentro da faixa de linearidade foram positivas 100% das vezes. A sensibilidade analítica foi de 4,5 cópias por reação (3,9 log<sub>10</sub> cópias por ml). O Ct médio da octaplicata foi de 36,22. A Tabela 16 apresenta o Ct das réplicas, a média entre eles, o desvio padrão e o coeficiente de variação (CV) em porcentagem. O teste apresentou o coeficiente de variação das réplicas dentro do esperado (<3%).

Tabela 16 - Valor de Ct, média, desvio padrão e coeficiente de variação em porcentagem das réplicas do ponto de menor diluição da curva padrão

	<b>Ct*</b>
<b>P9</b>	36,68
<b>P9</b>	36,17
<b>P9</b>	36,55
<b>P9</b>	35,69
<b>P9</b>	36,59
<b>P9</b>	36,44
<b>P9</b>	36,72
<b>P9</b>	34,92
<b>Média</b>	36,22
<b>DP**</b>	0,62
<b>CV(%)***</b>	1,72
<b>Log<sub>10</sub> de cópias/ml (média)</b>	3,9

Legenda: \*Ct = *Cycle threshold*; \*\*DP = desvio padrão; \*\*\*CV = coeficiente de variação em porcentagem.

Fonte: Desenvolvido pelo autor; 2023.

### 5.2.3 Variação intra e inter-teste

Os pontos de diluição da curva padrão sintética apresentaram coeficiente de variação dos valores de Ct dentro dos parâmetros adequados (<3%).

O valor dos Cts, bem como a média, desvio padrão e o coeficiente de variação em porcentagem são apresentados na tabela abaixo e se referem à variação intra-teste (Tabela 17).

Tabela 17 - Ct, média, desvio padrão e coeficiente de variação das réplicas dos pontos de diluição da curva sintética em relação a variação intra-teste

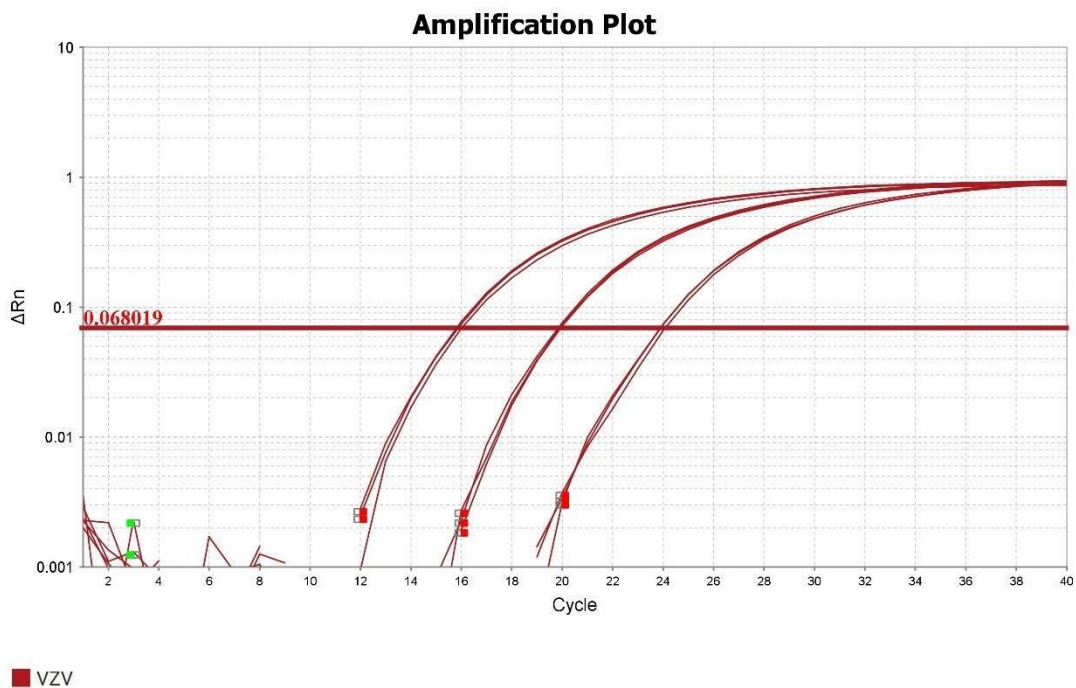
	Ct	Média Ct	Log <sub>10</sub> de cópias / mL (média)	Desvio padrão	CV (%)
<b>P3</b>	15,97	15,84	9,7	0,11	0,7
<b>P3</b>	15,81				
<b>P3</b>	15,75				
<b>P4</b>	19,88	19,84	8,5	0,06	0,3
<b>P4</b>	19,86				
<b>P4</b>	19,77				
<b>P5</b>	23,83	23,90	7,4	0,10	0,4
<b>P5</b>	24,01				
<b>P5</b>	23,85				
<b>P6</b>	27,31	27,12	6,5	0,17	0,6
<b>P6</b>	27,07				
<b>P6</b>	26,97				
<b>P7</b>	30,34	30,38	5,6	0,15	0,5
<b>P7</b>	30,54				
<b>P7</b>	30,25				
<b>P8</b>	33,74	33,39	4,7	0,31	0,9
<b>P8</b>	33,27				
<b>P8</b>	33,15				
<b>P9</b>	36,94	36,58	3,8	0,35	1,0
<b>P9</b>	36,55				
<b>P9</b>	36,24				

Legenda: Ct = *Cycle threshold*; CV = coeficiente de variação.

Fonte: Desenvolvido pelo autor; 2023.

A figura abaixo apresenta a variação intra-teste ideal das triplicatas em três distintos pontos de diluição da curva padrão sintética (Figura 10).

Figura 10 - Plot de amplificação das réplicas (triplicatas) para análise da variação intra-teste



Fonte: Desenvolvido pelo autor; 2023.

A Tabela 18 apresenta os valores de Ct, bem como suas respectivas médias, desvios padrões e o coeficientes de variação em porcentagem dentro dos valores de referência esperados.

Tabela 18 - Ct, média, desvio padrão e coeficiente de variação em porcentagem das réplicas do ponto da curva sintética em relação a variação inter-teste

	Ct	Média Ct	Log <sub>10</sub> de cópias / mL (média)	Desvio padrão	CV (%)
<b>P3</b>	15,77	15,57	9,8	0,34	2,2
<b>P3</b>	15,18				
<b>P3</b>	15,75				
<b>P4</b>	19,64	19,64	8,6	0,13	0,7
<b>P4</b>	19,51				
<b>P4</b>	19,77				
<b>P5</b>	23,34	23,44	7,5	0,36	1,5
<b>P5</b>	23,14				
<b>P5</b>	23,83				
<b>P6</b>	26,74	26,75	6,6	0,21	0,8
<b>P6</b>	26,55				
<b>P6</b>	26,97				
<b>P7</b>	30,1	30,25	5,6	0,13	0,4
<b>P7</b>	30,32				
<b>P7</b>	30,34				
<b>P8</b>	33,37	33,29	4,7	0,07	0,2
<b>P8</b>	33,24				
<b>P8</b>	33,27				
<b>P9</b>	35,8	36,30	3,9	0,44	1,2
<b>P9</b>	36,56				
<b>P9</b>	36,55				

Legenda: Ct = *Cycle threshold*; CV = coeficiente de variação.

Fonte: Desenvolvido pelo autor; 2023.

#### 5.2.4 Avaliação da qualidade da extração de DNA das amostras de LCR para aplicação na PCR em tempo real *in house*

O rendimento médio das amostras submetidas à extração de DNA foi de 16,5 ng/ $\mu$ L por meio da análise espectrofotométrica. Todas as amostras de DNA encontravam-se na faixa de concentração esperada para cada reação da PCR ( $\cong$  82,5 ng). Em adição, foi possível detectar o gene da RNase P, referente ao controle interno em 100% das amostras.

#### 5.2.5 Concordância entre PCR *in house* para identificação de VZV e plataformas comerciais na inclusão de casos

As amostras identificadas por meio das plataformas comerciais e correspondentes ao momento do diagnóstico foram usadas como referências e serviram como controle de validação da PCR *in house*. A tabela abaixo mostra o painel de 18 amostras controles de VZV positivas no LCR, detectadas pelas respectivas plataformas referência, bem como a taxa de concordância com os resultados do teste *in house*. A concordância de sensibilidade entre as plataformas e a PCR em tempo real *in house* para VZV foi de 94,4%. O teste *in house* apresentou, ainda, 100% (6/6) de especificidade quando ensaiado com controles para outros herpes vírus.

Tabela 19 - Distribuição do número de amostras controles conforme suas respectivas plataformas e a concordância (%) com PCR *in house*

	Total (n)	Concordância PCR <i>in house</i> (n), %
FilmArray® Meningitis/Encephalitis (ME) Panel	12	(12), 100%
XGEN UMLTI N9®	06	(05), 83,3%
<b>Total de controles de validação</b>	<b>18</b>	<b>(17),94,4%</b>

Fonte: Desenvolvido pelo autor; 2023.

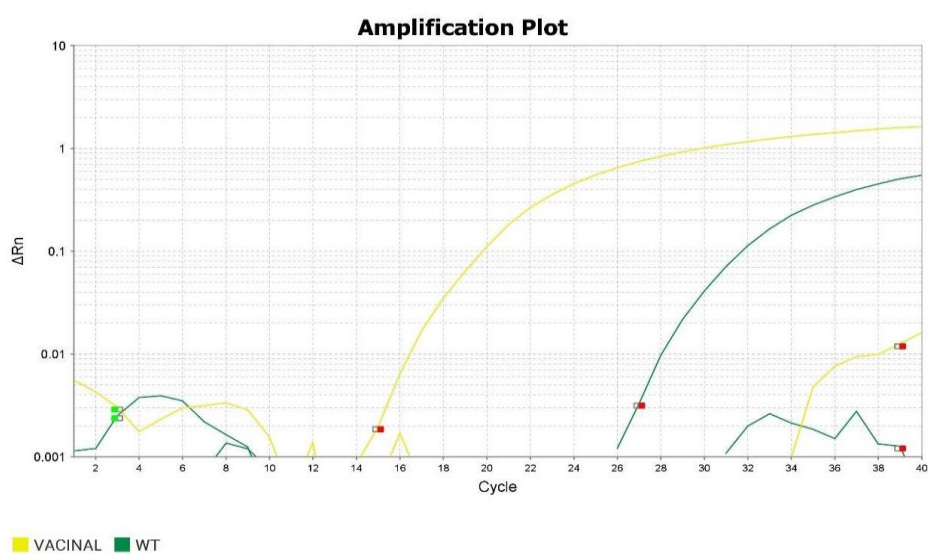


## 5.3 CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DOS ISOLADOS DE VZV

### 5.3.1 Diferenciação entre isolado vacinal e selvagem

A Figura 11, a seguir, apresenta o desempenho satisfatório da detecção das variantes selvagem e vacinal pelo teste para a amplificação dos controles da reação: controle vacinal pela sonda O-VZ62T e controle de isolado selvagem pela sonda WT-VZ62T.

Figura 11 - Amplificação de DNA de isolados de VZV partir de uma amostra de cultura de vírus vacinal pela sonda O-VZ62T (amarelo) e de uma amostra de LCR com presença de isolado selvagem detectada pela sonda WT-VZ62T (verde)



Fonte: Desenvolvido pelo autor; 2023.

Foi demonstrada a presença de isolado selvagem em 25 dos 30 casos analisados. Não foi possível fazer a diferenciação em 5 casos, todos eles procedentes do grupo HC-FMUSP.

### 5.3.2 Sequenciamento pela metodologia de Sanger

#### 5.3.2.1 Amplificação das ORFs 22, 38, 54 e 62 e identificação dos fragmentos em gel de agarose

A amplificação e identificação dos fragmentos de DNA foi possível em 12 amostras (40%), com amplificação de, ao menos, duas regiões de interesse em cada. Destas, 9 amostras (75%) eram do grupo LSL e 3 (25%) do grupo HC-FMUSP. Na técnica de PCR convencional, a ORF 54 (12/12) foi a mais sensível, seguida da ORF 38 (11/12).

Importante ressaltar que o teste de discriminação da origem do isolado foi capaz de detectar a variante selvagem em amostras com carga viral indetectável pelo PCR *in house*. A Tabela 20 apresenta os resultados das amostras em relação à amplificação das regiões de interesse.

Tabela 20 - Relação das regiões amplificadas em cada uma das amostras positivas

AMOSTRA	GRUPO	CARGA VIRAL	ISOLADO	ORF	ORF	ORF	ORF
		(log <sub>10</sub> de cópias/ mL)	VIRAL	22	38	54	62
VZV001	HC	8,0	WT	+	+	+	+
VZV002	HC	IND*	ND	-	-	-	-
VZV003	HC	IND*	ND	-	-	-	-
VZV004	HC	8,2	WT	+	+	+	+
VZV005	HC	IND*	ND	-	-	-	-
VZV006	HC	3,7	WT	-	-	-	-
VZV007	HC	IND*	WT	-	-	-	-
VZV008	HC	8,0	WT	-	-	-	-
VZV009	HC	IND*	WT	-	-	-	-
VZV010	HC	IND*	ND	-	-	-	-
VZV011	HC	IND*	ND	-	-	-	-
VZV012	HC	10,4	WT	+	+	+	-
VZV013	HC	7,5	WT	-	-	-	-
VZV014	LSL	8,1	WT	-	-	-	-
VZV015	LSL	8,2	WT	-	+	+	-
VZV016	LSL	10,7	WT	+	+	+	+
VZV017	LSL	7,1	WT	-	-	-	-
VZV018	LSL	8,7	WT	-	+	+	-
VZV019	LSL	7,3	WT	-	+	-	-
VZV020	LSL	8,3	WT	-	+	+	-
VZV021	LSL	8,3	WT	-	+	+	+
VZV022	LSL	7,3	WT	-	-	-	-
VZV023	LSL	7,8	WT	+	+	+	+
VZV024	LSL	7,5	WT	-	-	-	-
VZV025	LSL	3,7	WT	-	-	-	-
VZV026	LSL	8,5	WT	-	+	+	-
VZV027	LSL	8,2	WT	+	+	+	+
VZV028	LSL	7,5	WT	-	-	-	-
VZV029	LSL	7,6	WT	-	-	-	-
VZV030	LSL	9,2	WT	-	+	+	+

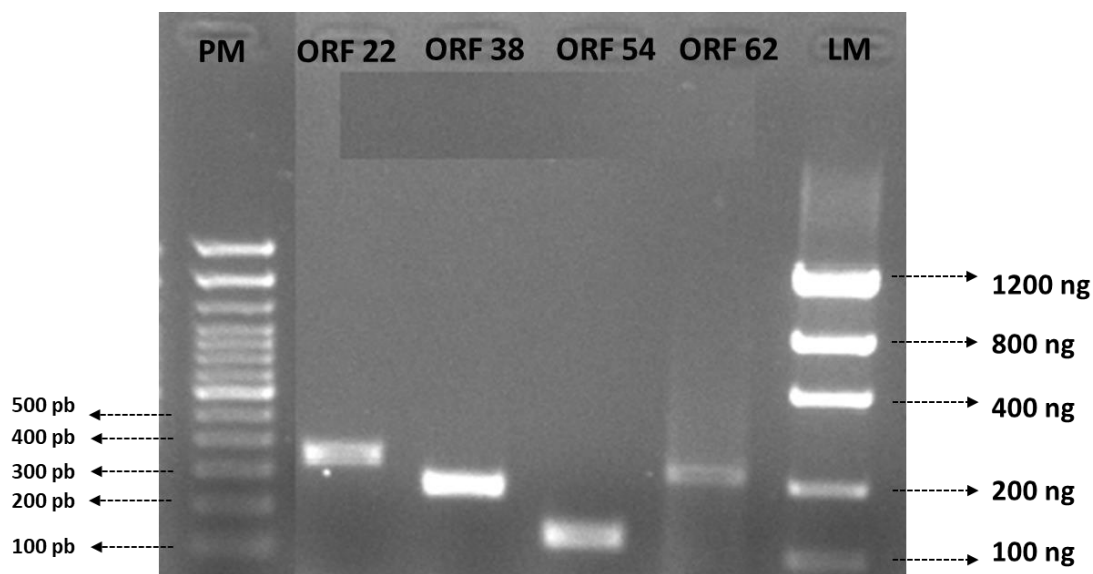
Legenda: IND = carga viral na PCR; WT = *wild type* (isolado selvagem); ND = não diferenciado; + = amplificação positiva da região alvo; - = não amplificação da região alvo.

\*Amostras com carga viral indetectável tratavam-se de amostras de casos de MEM coletadas após o diagnóstico do quadro agudo e introdução de tratamento antiviral

Fonte: Desenvolvido pelo autor; 2023.

Abaixo, a Figura 12 apresenta o perfil eletroforético visualizado de um gel de agarose da amostra de DNA de VZV (VZV016) amplificada pelos 4 alvos de interesse.

Figura 12 - Padrão de migração por eletroforese em gel de agarose a 1,5% de fragmentos do de DNA de VZV da amostra VZV016, a saber: ORF22, 22, 38, 54 e 62 com tamanhos de 447, 350, 222 e 419 pb, respectivamente



Legenda: Os fragmentos se referem a reação de PCR convencional. À direita o padrão de peso molecular (PM) de 100 pb e à esquerda o padrão de semi-quantificação com LM.

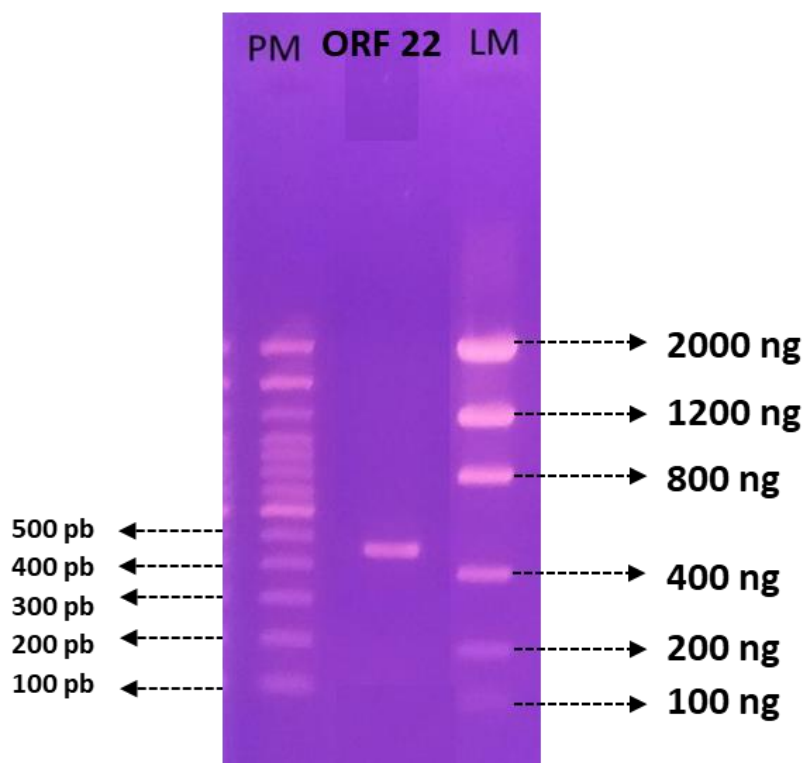
Fonte: Desenvolvido pelo autor; 2023.

### 5.3.2.2 Purificação e reação de sequenciamento

A Figura 13 apresenta o padrão de qualidade de um fragmento de VZV purificado. Não foram observadas perdas significativas de material genético (ng) após o processo de purificação.

A Figura 14 apresenta eletroferograma de um trecho sequenciado, mostrando alta qualidade e cobertura do mesmo.

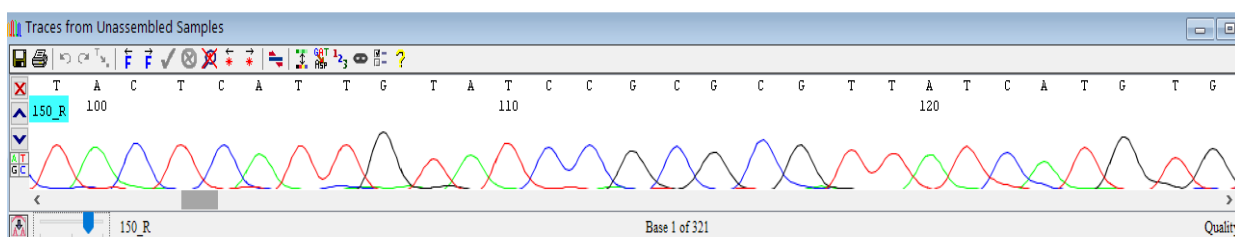
Figura 13 - Semi-quantificação de DNA de amostra positiva para VZV com marcador de massa molecular (LM) após eletroforese em gel de agarose a 1,5% sob transiluminação ultravioleta



Legenda: O fragmento de 447 pb (ORF22) da amostra VZV012, após processo de purificação, apresentou quantidade de DNA próxima a 400ng.

Fonte: Desenvolvido pelo autor; 2023.

Figura 14 - Eletroferograma analisado com o software Codon Code Aligner



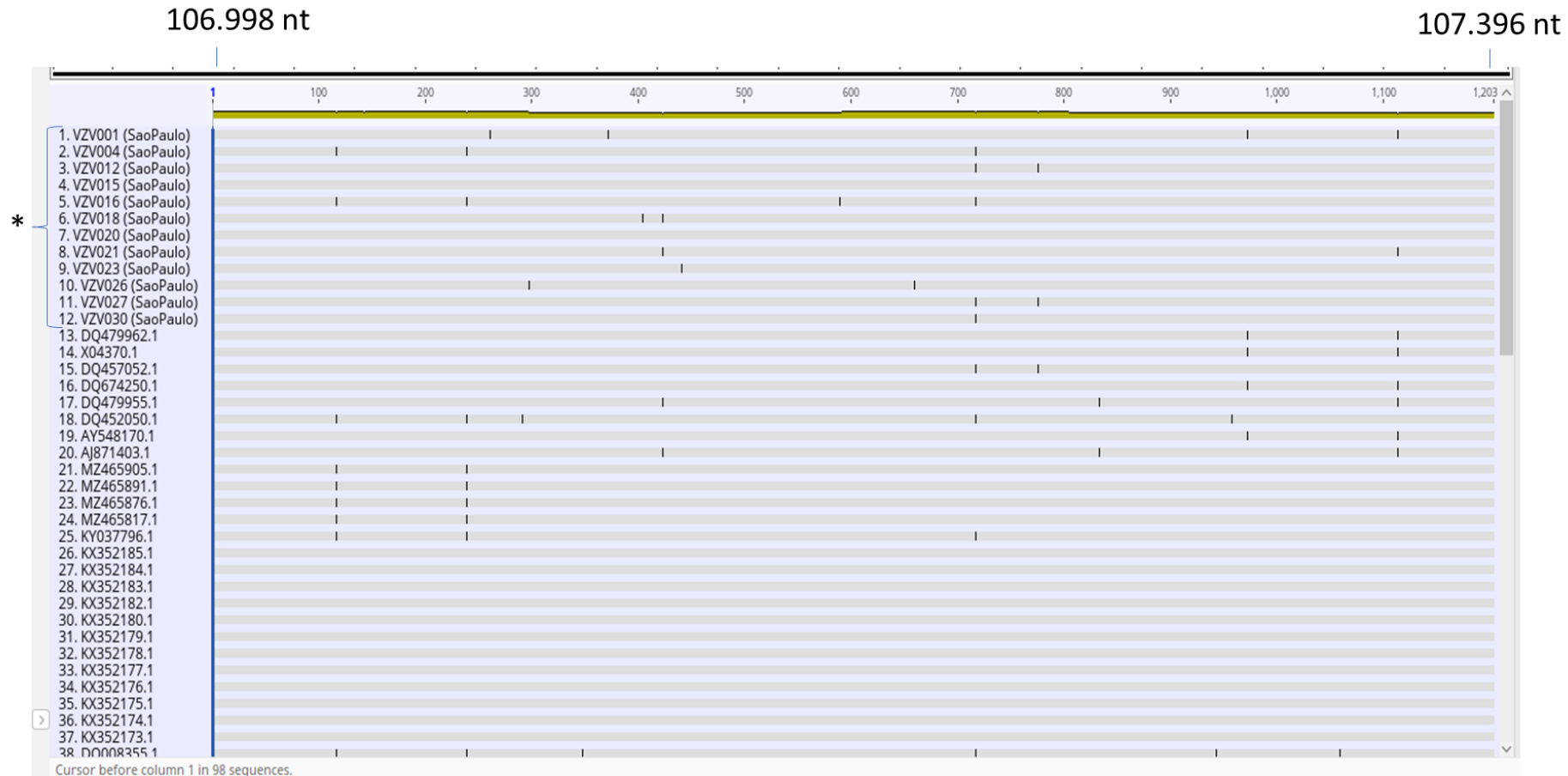
Legenda: No trecho da imagem, o sequenciamento apresentou alta qualidade de leitura dos nucleotídeos.

Fonte: Desenvolvido pelo autor; 2023.

### 5.3.2.3 Alinhamento com sequências protótipos e classificação filogenética

As sequências consenso obtidas por MS foram alinhadas com sequências protótipos depositadas no GenBank (Anexo A), conforme mostrado na Figura 15.

Figura 15 - Apresentação ilustrativa do alinhamento dos isolados de VZV obtidos nas amostras de LCR com sequências protótipas depositadas no GenBank

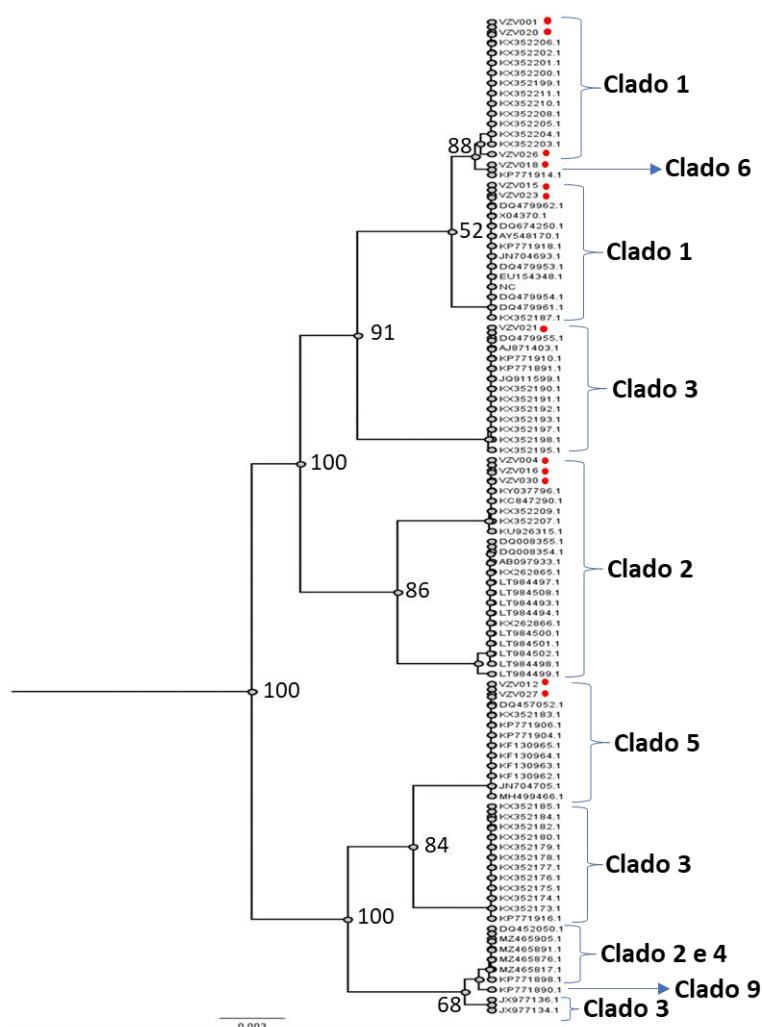


Legenda: Imagem produzida por meio do software *Geneious version 2023.0* criado por *Biomatters*. Disponível em <http://www.geneious.com>. Visualiza-se regiões de substituição nucleotídica (|), quando comparadas as sequências dos isolados de VZV deste estudo\* (1 a 12) e à estirpe Dumas (código de acesso X04370.1: posição nucleotídica de 106.998 a 107.396). Alinhamento concatenado.

Fonte: Desenvolvido pelo autor; 2023.

Estas sequências, quando submetidas à reconstrução filogenética, foram capazes de agrupar com as sequências protótipos de diferentes regiões geográficas. A Figura 16 apresenta o cladograma resultante da reconstrução filogenética a partir do sequenciamento por MS. As amostras sequenciadas apresentaram agrupamento filogenético com protótipos de VZV de diferentes localidades e foram classificadas como pertencentes aos clados 1 (VZV001, VZV015, VZV020, VZV023 e VZV026), 2 (VZV004, VZV016 e VZV030), 3 (VZV021), 5 (VZV012 e VZV027) e 6 (VZV018), indicados através de chaves à direita (Figura 16).

Figura 16 – Reconstrução filogenética por NJ



Nota: Sequência “NC” refere-se ao protótipo NC\_001348.1.

Legenda: Os retângulos coloridos representam os isolados deste estudo. As chaves indicam a qual grupamento filogenético (clados) as amostras e sequências protótipos pertencem.

Fonte: Desenvolvido pelo autor; 2023.

Quando submetidas à reconstrução filogenética de forma separada, as regiões alvo de uma mesma amostra apresentaram consistência na topologia final, apresentando agrupamento filogenético com as mesmas sequências protótipos.

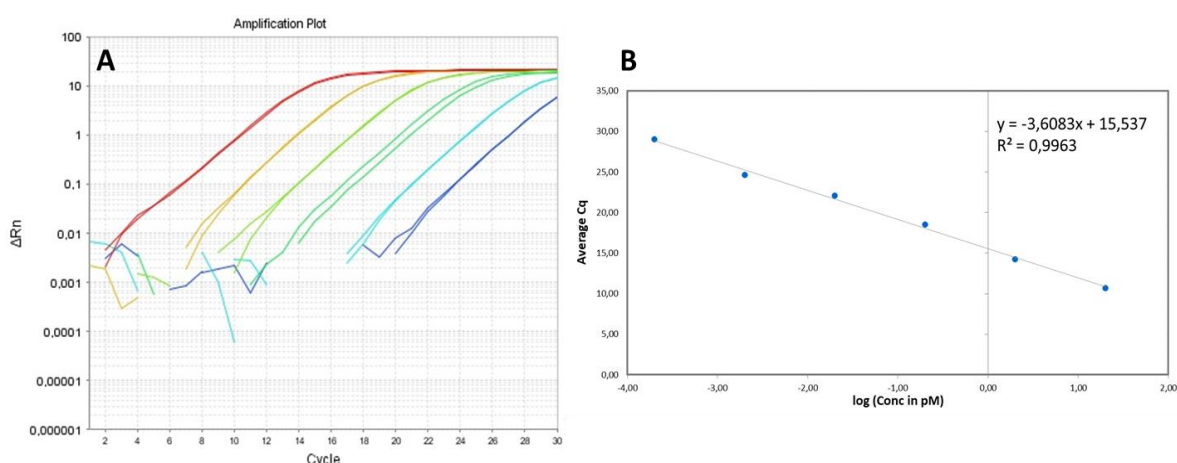
### 5.3.3 Sequenciamento massivo paralelo adaptado (Illumina® Inc)

#### 5.3.3.1 Preparo e quantificação de bibliotecas e controle de qualidade

As 28 amostras de LCR disponíveis para avaliação exploratória de VZV foram ensaiadas por SMP.

As bibliotecas foram quantificadas a partir dos valores de Cq dos padrões e uma reta de regressão foi gerada com valores de *Slope*= -3,61 e  $R^2= 0,9963$ , de acordo com as especificações do fabricante. A curva de amplificação dos padrões de quantificação e a reta de regressão são apresentadas na Figura 17 a e b, respectivamente. As amostras (bibliotecas) apresentaram quantificação final variando de 2,67 a 13,33 ng/μL, com concentração média de 8,8 ng/μL.

Figura 17 - Curva de amplificação dos padrões de quantificação e reta de regressão



Legenda: Figura 17a Curva de amplificação dos padrões de quantificação nas respectivas concentrações de 20pM, 2pM, 0,2pM, 0,02pM, 0,002pM e 0,0002pM, todas em testadas em duplicata.

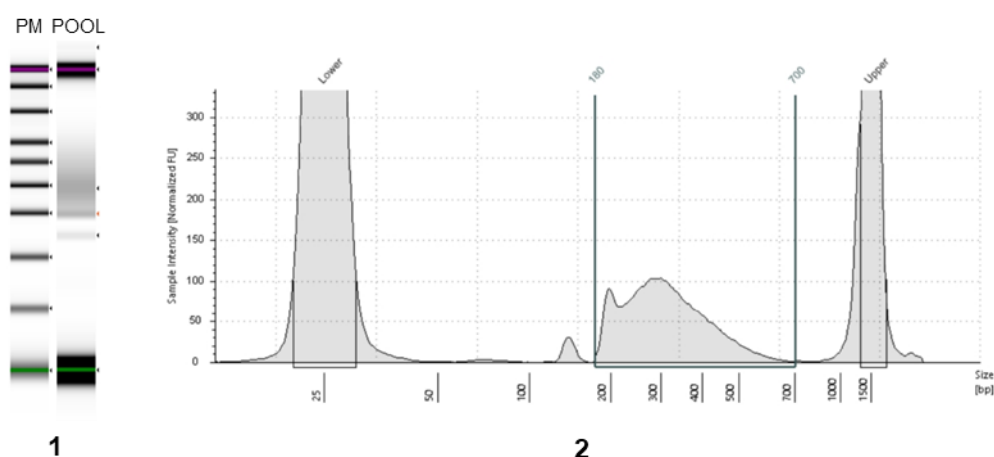
Figura 17b Reta de regressão traçada a partir da amplificação dos padrões de quantificação. Parâmetros de *Slope* e  $R^2$  dentro das especificações do fabricante.

Fonte: Desenvolvido pelo autor; 2023.



As bibliotecas foram normalizadas (equimolarizadas) para constituição de um *pool*. As amostras que compunham o *pool* apresentaram, em primeira análise, com o sistema *Tapestation*, grande quantidade de fragmentos fora da faixa pré-estabelecida de 300 a 600 pb. A maior parte dos fragmentos (67,4%) se concentrou na faixa de 180 a 700 pb (média: 318 pb) com concentração média de 1,56 ng/ $\mu$ L. A Figura 18 apresenta o padrão de corrida eletroforética do *pool* em comparação ao peso molecular de 100pb (1) e a distribuição e quantidade dos tamanhos de fragmentos presentes no *pool* (2).

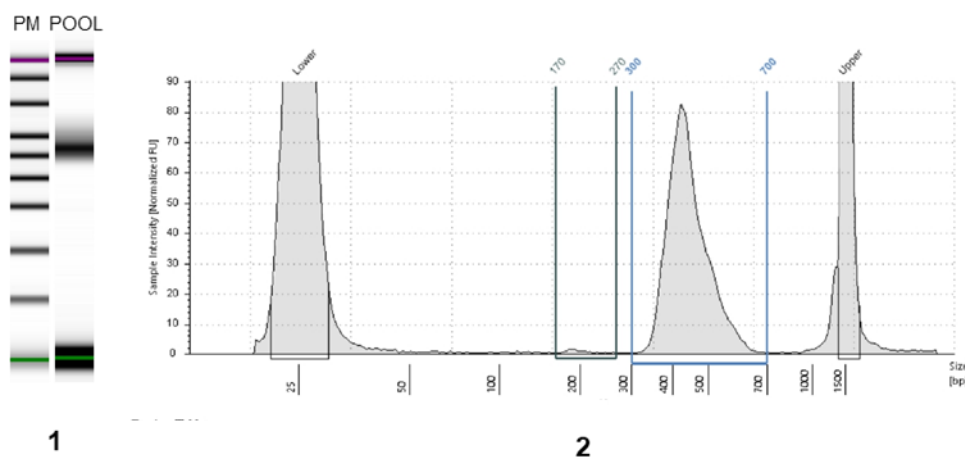
Figura 18 - Padrão de corrida eletroforética do *pool* em comparação ao peso molecular de 100pb (1) e a distribuição e quantidade dos tamanhos de fragmentos presentes no *pool* (2)



Fonte: Desenvolvido pelo autor; 2023.

Após seleção dos fragmentos via sistema *Pippin prep*, a maior parte dos fragmentos (80,1%) concentrou-se na faixa de 300 a 700 pb (média: 449 pb), com concentração média de 0,20 ng/ $\mu$ L. A Figura 19 apresenta o padrão de corrida eletroforética do *pool* em comparação ao peso molecular de 100pb (1) e a distribuição e quantidade dos tamanhos de fragmentos presentes no *pool* (2).

Figura 19 - Padrão de corrida eletroforética do pool em comparação ao peso molecular de 100pb (1) e a distribuição e quantidade dos tamanhos de fragmentos presentes no pool (2), após seleção de fragmentos de interesse via sistema Pippin prep



Fonte: Desenvolvido pelo autor; 2023.

### 5.3.3.2 Análise *reads*, alinhamento de aminoácidos e alinhamento de nucleotídeos (*de novo*)

Das 28 amostras disponíveis, 25 apresentaram quantidade de leituras de sequências nucleotídicas (*reads*) insuficientes para quaisquer análises. Apenas 3 amostras (10,7%), duas pertencentes ao grupo LSL e uma ao grupo HC-FMUSP, obtiveram geração de *reads* suficientes para algum tipo de análise, a saber: VZV012, VZV021 e VZV022. Dessas, uma não havia sido detectada pelas ORFs selecionadas na etapa de sequenciamento por MS.

Apenas a amostra VZV012 apresentou leituras suficientes para as próximas análises de caracterização molecular do VZV (Tabela 21 e Figura 20).

A Tabela 21 apresenta a relação de gêneros virais detectados nas amostras e as respectivas quantidades de leituras obtidas para as três amostras de LCR avaliadas, a partir do alinhamento de sequências de AAs dos isolados de VZV.

Tabela 21 - Relação de gêneros virais detectados, a partir do alinhamento de sequências de AAs e as respectivas quantidades de reads obtidas

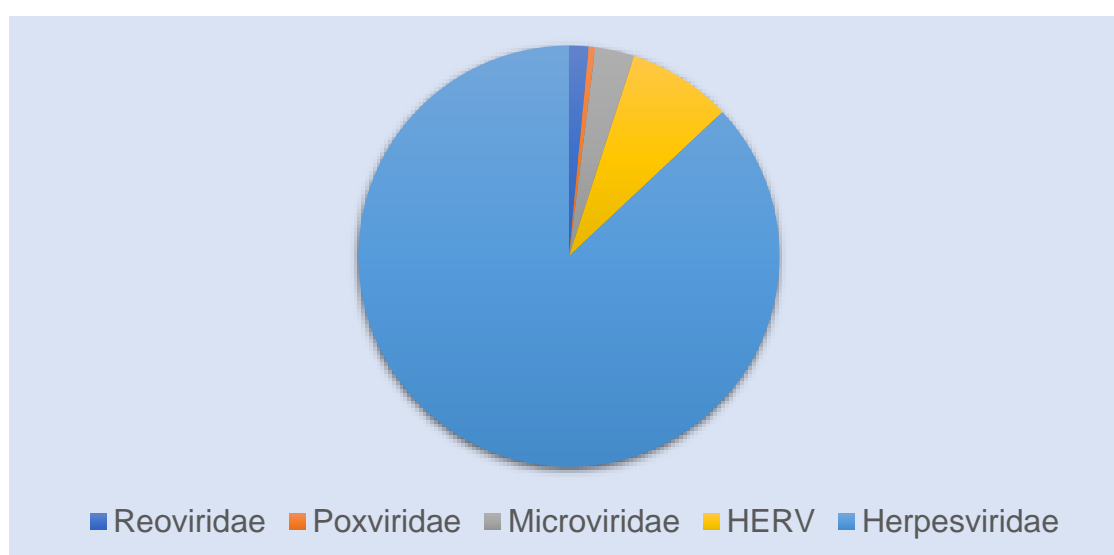
Gênero	VZV012	VZV021	VZV022
Varicellovirus	860.141.504	0,943	0
Simplexvirus	0	0,000	28.895.531
Lymphocryptovirus	1.023.978	0	0
Cytomegalovirus	0	0	0,2

Fonte: Desenvolvido pelo autor; 2023.

A Figura 20 mostra a proporção de famílias detectadas, a partir do alinhamento de nucleotídeos (*de novo*), na amostra VZV012 com a família *Herpesviridae* representando a maior parte das sequências obtidas.

De acordo com os objetivos delimitados a este trabalho, apenas as sequências compatíveis com o gênero *Varicellovirus*, espécie *Human alphaherpesvirus 3* foram utilizadas nas análises subsequentes.

Figura 20 - Proporção de famílias virais detectadas na amostra VZV012 após reação de SMP e alinhamento de nucleotídeos

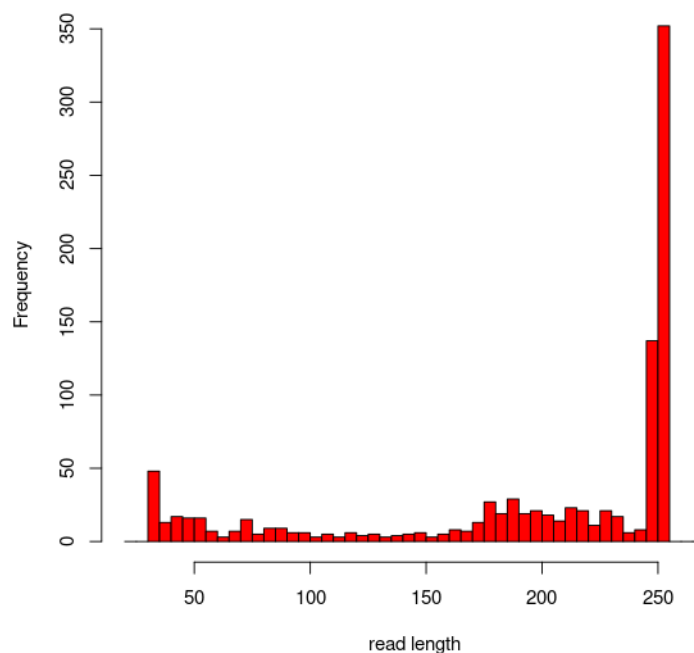


Legenda: Os gêneros de cada família foram classificados após alinhamento a sequências depositadas no GenBank, cuja identificação se deu pela porcentagem de similaridade e *e-value*, indicadas pela ferramenta BLAST.

Fonte: Desenvolvido pelo autor; 2023.

As sequências obtidas compatíveis ao VZV apresentaram comprimento entre 54 e 251 pb, conforme gráfico da Figura 21.

Figura 21 - Frequência dos tamanhos de fragmentos das sequências compatíveis ao VZV obtidas após reação de SMP na amostra VZV012



Fonte: Desenvolvido pelo autor; 2023.

Utilizando os parâmetros de confiabilidade para SMP, a amostra VZV012 apresentou um total de 251 *contigs* para sequências compatíveis ao VZV (espécie *Human alphaherpesvirus 3*), com *e-value* médio de  $4,3^{-46}$  e um total de 91 sequências finais (sequências consenso). Todas as sequências obtidas apresentaram similaridade superior a 96% e foram alinhadas à estirpe Dumas (X04370.1).

### 5.3.3.3 Cobertura genômica

As 91 sequências compatíveis com VZV obtidas por SMP foram concatenadas em 61 sequências únicas, todas com suas respectivas posições nucleotídicas determinadas a partir de alinhamento com a sequência “estirpe Dumas” (código de

acesso X04370.1). Estas são apresentadas no Anexo C, no qual podemos observar que os trechos obtidos compreendem regiões não contínuas do genoma viral.

### 5.3.4 Análise de similaridade nucleotídica e sequência de aminoácidos

#### 5.3.4.1 Sequências obtidas pela metodologia de Sanger

O Quadro 1 apresenta as taxas de similaridade nucleotídica entre todos os isolados, quando comparados a algumas sequências protótipos de diferentes clados, cujas taxas são superiores a 99%, demonstrando-se um genoma altamente conservado.

Quadro 1 - Taxas de similaridade nucleotídica dos isolados de VZV em comparação a algumas sequências protótipos, pertencentes a diferentes clados

			Amostra					
Protótipo	GenBank ID	Clado	VZV001	VZV004	VZV012	VZV015	VZV016	VZV018
Reino Unido	X04370.1	1	99,8%	99,2%	99,6%	99,8%	99,3%	99,5%
Japão	AB097933.1	2	99,2%	99,9%	99,4%	99,5%	99,7%	99,1%
Alemanha	AJ871403.1	3	99,5%	99,3%	99,4%	99,7%	99,2%	99,7%
Suécia	DQ452050.1	4	99,2%	99,7%	99,4%	99,7%	99,6%	99,3%
Índia	MH499466.1	5	99,4%	99,6%	99,9%	99,5%	99,5%	99,1%
Suécia	KP771914.1	6	99,3%	99,5%	99,3%	99,5%	99,3%	99,8%
Suécia	KP771890.1	9	99,2%	99,7%	99,4%	99,5%	99,5%	99,5%

			Amostra					
Protótipo	GenBank ID	Clado	VZV020	VZV021	VZV023	VZV026	VZV027	VZV030
Reino Unido	X04370.1	1	99,5%	99,7%	99,8%	99,5%	99,5%	99,5%
Japão	AB097933.1	2	99,1%	99,5%	99,2%	99,1%	99,6%	99,8%
Alemanha	AJ871403.1	3	99,5%	99,9%	99,7%	99,3%	99,4%	99,4%
Suécia	DQ452050.1	4	99,1%	99,5%	99,2%	99,3%	99,5%	99,8%
Índia	MH499466.1	5	99,6%	99,5%	99,4%	99,1%	99,2%	99,8%
Suécia	KP771914.1	6	99,5%	99,7%	99,3%	99,1%	99,4%	99,4%
Suécia	KP771890.1	9	99,1%	99,7%	99,2%	99,1%	99,4%	99,5%

Nota: Taxa de similaridade calculada com o programa Ezbiocloud, comparando a composição nucleotídica das sequências concatenadas em relação às sequências protótipos.

O Quadro 2 apresenta as substituições nucleotídicas observadas no alinhamento de cada ORF, sua respectiva posição, e o AA correspondente ao códon aonde ocorreu a substituição, podendo este também ser alterado. O Quadro apresenta a sequência referência para análise (X04370.1), os isolados do estudo e outras sequências protótipos de diferentes clados. É indicada a posição nucleotídica na qual ocorreu a substituição e o AA correspondente ao códon onde ocorreu a mutação.

Quadro 2 - Substituições nucleotídicas observadas nos alinhamentos das ORFs 22, 38, 54 e 62 com uso do software Seaview V.5.0.4

ORF 22										
Sequência	Clado	nt 38055	AA	nt 38081	AA	nt 38177	AA	nt 38199	AA	
X04370.1	1	T	Y	A	P	G	E	A	I	
VZV001	1	T	Y	A	P	G	E	G	V	
VZV015	1	-	-	-	-	-	-	-	-	
VZV020	1	-	-	-	-	-	-	-	-	
VZV023	1	T	Y	A	P	G	E	A	I	
VZV026	1	-	-	-	-	-	-	-	-	
AB097933.1	2	C	H	C	P	A	E	A	I	
VZV004	2	C	H	C	P	A	E	A	I	
VZV016	2	C	H	C	P	A	E	A	I	
VZV030	2	-	-	-	-	-	-	-	-	
AJ871403.1	3	T	Y	A	P	G	E	A	I	
VZV021	3	-	-	-	-	-	-	-	-	
JN704705.1	5	T	Y	C	P	G	E	A	I	
VZV012	5	T	Y	C	P	G	E	A	I	
VZV027	5	T	Y	C	P	G	E	A	I	
KP771914.1	6	T	Y	C	P	A	E	A	I	
VZV018	6	-	-	-	-	-	-	-	-	

Legenda: nt = nucleotídeo; AA = aminoácido; - (traço) = região não sequenciada.

Em azul destaca-se as mutações sinônimas e em laranja as mutações não-sinônimas.

ORF 38													
Sequência	Clado	nt 69298	AA	nt 69349	AA	nt 69373	AA	nt 69405	AA	nt 69424	AA	nt 69442	AA
X04370.1	1	A	M	A	S	A	I	T	S	G	V	A	T
VZV001	1	A	M	A	S	G	V	T	S	G	V	A	T
VZV015	1	A	M	A	S	A	I	T	S	G	V	A	T
VZV020	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
VZV023	1	A	M	A	S	A	I	T	S	G	V	G	A
VZV026	1	G	V	A	S	A	I	T	S	G	V	A	T
AB097933.1	2	A	M	G	G	A	I	T	S	G	V	A	T
VZV004	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
VZV016	2	A	M	A	S	A	I	T	S	G	V	A	T
VZV030	2	A	M	A	S	A	I	T	S	G	V	A	T
AJ871403.1	3	A	M	A	S	A	I	T	S	A	I	A	T
VZV021	3	A	M	A	S	A	I	T	S	A	I	A	T
JN704705.1	5	A	M	A	S	A	I	T	S	G	V	A	T
VZV012	5	A	M	A	S	A	I	T	S	G	V	A	T
VZV027	5	A	M	A	S	A	I	T	S	G	V	A	T
KP771914.1	6	A	M	A	S	A	I	C	S	A	I	A	T
VZV018	6	A	M	A	S	A	I	C	S	A	I	A	T

Legenda: nt = nucleotídeo; AA = aminoácido; - (traço) = região não sequenciada.

Em azul destaca-se as mutações sinônimas e em laranja as mutações não-sinônimas.



ORF 54							
Sequência	Clado	nt 95184	AA	nt 95241	AA	nt 95300	AA
X04370.1	1	A	S	T	A	C	P
VZV001	1	A	S	T	A	C	P
VZV015	1	A	S	T	A	C	P
VZV020	1	A	S	T	A	C	P
VZV023	1	A	S	T	A	C	P
VZV026	1	G	S	T	A	C	P
AB097933.1	2	A	S	C	A	C	P
VZV004	2	A	S	C	A	C	P
VZV016	2	A	S	C	A	C	P
VZV030	2	A	S	C	A	C	P
AJ871403.1	3	A	S	T	A	C	P
VZV021	3	A	S	T	A	C	P
JN704705.1	5	A	S	C	A	T	L
VZV012	5	A	S	C	A	T	L
VZV027	5	A	S	C	A	T	L
KP771914.1	6	A	S	T	A	C	P
VZV018	6	A	S	T	A	C	P

Legenda: nt = nucleotídeo; AA = aminoácido; - (traço) = região não sequenciada.

Em azul destaca-se as mutações sinônimas e em laranja as mutações não-sinônimas.

ORF 62									
Sequência	Clado	nt 107026	AA nt 107165	AA nt 107307	AA nt 107366	AA			
X04370.1	1	A	D	C	S	T	S	T	R
VZV001	1	A	D	C	S	T	S	T	R
VZV015	1	-	-	-	-	-	-	-	-
VZV020	1	-	-	-	-	-	-	-	-
VZV023	1	-	-	-	-	-	-	-	-
VZV026	1	-	-	-	-	-	-	-	-
AB097933.1	2	A	D	T	S	C	P	T	R
VZV004	2	-	-	T	S	C	P	T	R
VZV016	2	A	D	T	S	C	P	T	R
VZV030	2	A	D	T	S	C	P	-	-
AJ871403.1	3	G	G	T	S	T	S	T	R
VZV021	3	-	-	T	S	T	S	T	R
JN704705.1	5	A	D	T	S	C	P	T	R
VZV012	5	-	-	-	-	-	-	-	-
VZV027	5	A	D	T	S	C	P	-	-
KP771914.1	6	A	D	T	S	T	S	C	R
VZV018	6	-	-	-	-	-	-	-	-

Legenda: nt = nucleotídeo; AA = aminoácido; - (traço) = região não sequenciada.

Em azul destaca-se as mutações sinônimas e em laranja as mutações não-sinônimas.

Em suma, o Quadro 2 nos mostra a ocorrência de alguns SNPs nas regiões analisadas. Alguns destes, quando traduzidos para AAs nos revelam serem mutações do tipo não-sinônimas.

Analisando a classe de AAs, foi observada troca de classe nas mutações não-sinônimas da ORF22 para as amostras VZV004 e VZV016 (tirosina por histidina); da ORF38 para a amostra VZV023 (treonina por alanina); da ORF54 para as amostras VZV012 e VZV027 (prolina por leucina); e da ORF62 para as amostras VZV004, VZV016, VZV027 e VZV030 (serina por prolina). Todas as regiões citadas compreendem trechos de alta qualidade, conforme análise de eletroferograma.

Os resultados apontaram que não houve diferença entre as sequências de AAs de VZV nos alvos analisados em relação à protótipos depositados no *Protein Blast*.

## 6 DISCUSSÃO

O VZV apresenta alta prevalência em populações adultas e é agente causador de um amplo espectro de manifestações clínicas<sup>12</sup>. Tanto em quadros de infecção primária (varicela), quanto em quadros de reativação, na forma de HZ, o indivíduo acometido pode apresentar, dentre as diversas complicações, manifestações de SNC<sup>52,66</sup>. Os casos de MEM agudas são as mais raras e graves complicações, ocorrendo em menos em 1% dos casos de HZ e cerca de 13% a 20% dos casos de varicela grave. A gravidade das manifestações clínicas do VZV é multifatorial. A relação entre a gravidade da infecção por VZV e a sua variação genética é tema ainda em aberto e discutido por diferentes autores<sup>53</sup>.

Os aspectos moleculares do VZV começaram a ser estudados de forma mais ampla a partir da década de 1980, com o desenvolvimento do campo da biologia molecular e com a definição de seus principais grupos, atualmente definidos como clados<sup>3,12</sup>. Estudos acerca deste tópico em LCR são escassos se comparados a estudos que utilizam amostras de lesão cutânea. No Brasil, apenas dois estudos, um no estado do Pará<sup>122</sup>, e outro no estado do Amazonas<sup>123</sup>, dirigem a atenção à essa questão.

De fato, os estudos epidemiológicos acerca de casos de MEM agudos por VZV são escassos na literatura brasileira. Entre os poucos estudos encontrados podemos destacar os realizados por Bastos et al (2014)<sup>110</sup> e Oliveira et al (2017)<sup>112</sup> que relatam uma prevalência de 20,4% e 13,6%, respectivamente, de casos de VZV nas populações estudadas. Ambos os estudos realizaram buscas apenas por agentes virais. Considerando estudos similares e que considerassem agentes virais e não virais, o VZV apresentou uma prevalência de 1,04% e 3,8%, nos estudos de Chesky et al (2000)<sup>111</sup> e Huppatz et (2007)<sup>118</sup>, respectivamente.

Com enfoque similar aos estudos acima citados, delineou-se o estudo inicial do qual se originou a casuística utilizada no presente trabalho. Dos 600 casos de MEM infecciosa aguda analisados, e, considerando agentes virais e não virais, o VZV foi identificado em 30 (5%) casos. A população de estudo foi composta por dois grupos de diferentes origens: 13 casos advindos do HC-FMUSP, muitos deles com complicações associadas a doenças de base e quadros de imunossupressão,

sabidamente fatores de risco para o desenvolvimento de complicações da infecção pelo VZV<sup>51</sup>; e 17 casos advindos do LSL, todos casos comunitários. A mediana de idade dos pacientes HC-FMUSP foi de 53 anos (variando de 17 a 72 anos) e com distribuição similar entre os sexos (7 indivíduos do sexo masculino (53,8%) vs 6 indivíduos do sexo feminino (46,2%), dos quais 10 (76,9%) tiveram a presença de lesões cutâneas. Dentre os pacientes com PCR positiva para agentes virais, Bastos et al (2014)<sup>110</sup> obteve uma média de idade de 27 anos (1 – 59) e acometendo, também, mais indivíduos do sexo masculino (59,2%). Analisando especificamente casos de manifestações neurológicas por VZV, Shikova et al (2021)<sup>156</sup> não observaram diferenças estatisticamente significativas entre idade e sexo.

A população HC-FMUSP era uma população majoritariamente com doenças de base e condições de imunossupressão (69,2%), e sem histórico de vacinação para varicela. Estes aspectos se destacam em relação à outras casuísticas como a de Lenfant et al (2021)<sup>157</sup> que reportaram taxas de imunossupressão de 38%. O desfecho clínico observado foi: óbito (38,4%), alta hospitalar (46,2%) e alta com sequelas (15,4%), com destaque para confusão mental e alteração de consciência, sequelas motoras e disartria, também descritas por Bozzola e Bozzola (2016)<sup>52</sup>.

Dentre as poucas informações inerentes aos casos comunitários (grupo LSL), a mediana de idade foi de 35 anos (variando de 17 a 72 anos) e com poucos casos de lesão cutânea associada (17,6%). A ausência de lesões cutâneas dificulta o diagnóstico, como descrito por Spernovasilis et al (2018)<sup>158</sup>. Ainda, levando-se em consideração, apenas as informações disponíveis na comunidade, a presença de imunossupressão dos pacientes foi evento pouco observado, presente em apenas um caso (indivíduo HIV+).

Dados em relação à prévia vacinação dos pacientes LSL também se encontravam indisponíveis. A ausência de demais dados clínicos inviabilizou investigar se os casos de MEM tratavam-se de mera complicação do processo de reativação ou complicações da infecção primária, ambas amplamente descritas na literatura<sup>52,66</sup>. Informações em relação ao desfecho dos quadros não estavam disponíveis em 64,7% dos casos.

Em relação a dados laboratoriais citológicos e bioquímicos em LCR observados para os dois grupos de pacientes incluídos, eles podem ser observados na Tabela 14.

A discussão detalhada destes achados não será incluída neste momento, pois não constitui objeto específico do presente estudo.

Também a carga viral de VZV e sua relação com parâmetros bioquímicos do LCR e dados demográficos não foi objeto de análise neste estudo, embora tenha sido discutido por alguns autores<sup>81,159</sup>. A quantificação de carga viral abordada no presente trabalho foi utilizada para fins de determinação da sensibilidade analítica da PCR *in house* (LoD 95%).

Em relação à detecção de co-patógenos identificados em associação ao VZV, nas amostras analisadas, à época do diagnóstico da doença aguda, observamos entre os pacientes procedentes do HCFMUSP três casos de coinfeção, dois com o vírus Epstein-Barr (EBV) (amostras VZV006 e VZV012) e um com o HAdv (amostra VZV004). No entanto, é necessário cautela em relação à interpretação quanto ao verdadeiro papel patogênico da presença desses vírus no LCR de pacientes onde VZV (ou outros patógenos) também sejam identificados. A detecção de outros vírus<sup>110</sup>, particularmente herpesvirus poderia representar apenas a reativação de formas latentes desses vírus, reativadas frente à presença do VZV, ou outros patógenos, sem eventualmente estar associado a um real papel patogênico em relação às manifestações clínicas observadas, apesar de casos de MEM por EBV serem descritos na literatura<sup>160,161</sup>.

O HAdv também tem conhecido potencial linfotrópico, de latência e infecção lítica em SNC<sup>162</sup>, ocorrendo em coinfeção com o vírus HHV-6, conforme descrito por Dupuis et al (2011)<sup>114</sup>. Porém, na literatura consultada, não identificamos relatos prévios de coinfeção de HAdv com VZV em pacientes com MEM aguda.

Entre os pacientes procedentes do LSL observamos apenas um caso de coinfeção (amostra VZV017), neste caso com o HIV, também detectado em LCR. Estudos acerca da presença e patogenia do HIV em LCR são encontrados na literatura, no entanto, em relação ao caso identificado em nosso estudo, infelizmente não dispusemos de informações clínicas completas que nos permitissem maiores conclusões sobre esse achado no caso em questão<sup>163,164</sup>.

Duas plataformas comerciais para identificação concomitante de até 14 patógenos diferentes estavam disponíveis no momento do estudo fonte (inicial). Estas foram utilizadas na identificação dos casos de VZV utilizados em nossa casuística, a

saber: FilmArray® Meningitis/Encephalitis (ME) Panel e XGEN UMLTI N9®. As plataformas comerciais são sistemas automatizados de extração, amplificação e detecção de diversos patógenos associados a quadros de MEM de forma simultânea, realizando esta tarefa mais rapidamente e com alta especificidade e sensibilidade analítica. Úteis em serviços de emergência, estas plataformas são de elevado custo e nem sempre acessíveis a todos os locais, especialmente em regiões mais afastadas<sup>165,166</sup>.

Considerando o diagnóstico preciso e acessível da etiologia do quadro de MEM como fator importante para orientação do tratamento antimicrobiano específico<sup>167</sup>, nosso estudo propôs a implementação de uma PCR em tempo real *in house* como método diagnóstico alternativo, em especial na rede pública de saúde, podendo constituir uma opção diagnóstica acessível e de maior custo-benefício para os laboratórios locais, e desta forma contribuir para uma melhoria na notificação dos casos identificados<sup>108,109</sup>. O desempenho do nosso teste *in-house* para VZV foi plenamente satisfatório e sua sensibilidade analítica foi < 5 cópias por reação. Dentro dessa expectativa, os resultados observados em nosso estudo em relação ao teste de PCR em tempo real *in house* mostrou-se uma técnica aplicável e de acordo com parâmetros descritos na literatura<sup>143,168</sup>. Acreditamos que o teste de PCR em tempo real *in-house* validado em nosso estudo possa ser aplicado de forma efetiva e de baixo custo na detecção do DNA de VZV em LCR nos casos de MEM infecciosa aguda, nos serviços de atendimento a esses casos, em diferentes regiões do país.

Por se tratar de um vírus de alta soroprevalência<sup>91</sup>, seria de grande valor acompanhar as dinâmicas de circulação do vírus e seu direto impacto na saúde pública brasileira, possibilitando melhor manejo clínico dos casos diagnosticados<sup>167,169</sup> e melhor orientação quanto às políticas de vacinação em nosso meio. Uma investigação etiológica limitada pode levar à manutenção de tratamentos empíricos, estes baseados em achados líquóricos e na sintomatologia do paciente, nem sempre adequados para a melhor definição etiológica<sup>108,157</sup>.

Quando tratamos de meningites assépticas (virais), dados públicos sobre incidência no Brasil são de difícil obtenção. Dados públicos fornecidos pela Secretaria de Saúde do Estado de São Paulo (SES) e pelo Ministério da Saúde (SINAN) classificam estes casos apenas como “meningites virais”. Dados do SINAN apontam um número de mais de 72 mil casos de meningites virais entre 2012 e 2021.

Sabidamente, o VZV está entre os principais agentes de MEM assépticas em diferentes casuísticas e em diferentes localidades<sup>114,116,117</sup>. No Brasil, dados epidemiológicos sobre casos de MEM são escassos, sendo também objeto de constantes subnotificações<sup>108,112,169</sup>.

Na cidade de São Paulo, a contabilização de casos notificados de MEM é realizada pela COVISA. Entre os anos de 2010 e 2019 foram notificados cerca de 23 mil casos, 189 destes causados pelo VZV. Estes dados, no entanto, não são de domínio público, sendo necessária a solicitação destes por canais de comunicação das repartições específicas. Até a finalização deste trabalho, não foi obtida resposta em relação a dados dos anos de 2020, 2021 e 2022.

Os casos de MEM são de notificação compulsória, de acordo com a Portaria Nº 2.472, de 31 de agosto de 2010<sup>\*\*\*</sup>, e dentre as informações que podem ser fornecidas no processo de notificação está a etiologia do quadro de MEM asséptica, podendo em grande parte das vezes não ser preenchida. Isso pode, possivelmente, estar atrelada à limitada investigação etiológica.

Conforme já mencionado, estima-se que o real número de casos, assim como casos de MEM por VZV, deva estar subestimado em nossa população<sup>92,93</sup>. Fator importante nesse cenário é a notificação compulsória apenas de casos graves de varicela, como indica a Portaria Nº 264, de 17 de fevereiro de 2020<sup>†††</sup>. Como já descrito, indivíduos imunossuprimidos tem maiores chances de desenvolver complicações relacionadas à varicela, embora estas sejam descritas também em indivíduos imunocompetentes<sup>52</sup>.

---

<sup>\*\*\*</sup> Brasil. Ministério da Saúde. Define as terminologias adotadas em legislação nacional, conforme disposto no Regulamento Sanitário Internacional 2005 (RSI 2005), a relação de doenças, agravos e eventos em saúde pública de notificação compulsória em todo o território nacional e estabelecer fluxo, critérios, responsabilidades e atribuições aos profissionais e serviços de saúde. Portaria n.2.472, 31 outubro 2010. Diário Oficial da União (2010 Set 1). Sec.1:50. Disponível em: <https://pesquisa.in.gov.br/imprensa/jsp/visualiza/index.jsp?jornal=1&pagina=50&data=01/09/2010>

<sup>†††</sup> Brasil. Ministério da Saúde. Altera a Portaria de Consolidação nº 4/GM/MS, de 28 de setembro de 2017, para incluir a doença de Chagas crônica, na Lista Nacional de Notificação Compulsória de doenças, agravos e eventos de saúde pública nos serviços de saúde públicos e privados em todo o território nacional. Portaria n.264, 17 fevereiro 2020. Diário Oficial da União (2020 Fev 19). Sec.1:97. Disponível em: <https://www.in.gov.br/web/dou/-/portaria-n-264-de-17-de-fevereiro-de-2020-244043656>



Em relação à investigação referente à presença do vírus vacinal em nosso meio, em nossa casuística, não foram detectados casos associados ao vírus vacinal. Em todas as amostras nas quais foi possível realizar essa diferenciação, foi detectada a presença exclusiva de isolado selvagem. É plausível se supor que a ausência do encontro de vírus vacinal nas amostras analisadas em nossa casuística esteja associada à faixa etária da população estudada (17-79 anos) e pela recente introdução da vacinação no Brasil, em 2012. Também a baixa cobertura vacinal para esse vírus, na população em geral, deva ser importante fator a contribuir para não termos identificados a cepa vacinal em nosso estudo.

Vale comentar, no entanto que em todos os casos nos quais a diferenciação não foi possível (PCR para discriminação de cepa vacinal ou selvagem negativa), tratava-se de casos de pacientes já em tratamento (protocolos bem estabelecidos e geralmente com uso de Aciclovir), de início anterior à coleta da amostra recebida e analisada em nosso laboratório.

Sete amostras recebidas, todas do grupo HC-FMUSP, pelas condições acima citadas, apresentaram carga viral indetectável na PCR em tempo real *in house*. No entanto, é interessante destacar que em dois casos foi possível a diferenciação da origem do isolado, apesar da baixa carga viral presente na amostra (amostras VZV007 e VZV009).

Importante acrescentar que nosso estudo é o segundo estudo brasileiro a avaliar a presença do vírus vacinal no Brasil. O primeiro estudo sobre o tema foi conduzido por Bastos et al (2019)<sup>123</sup>, que realizaram a caracterização molecular e filogenética de isolados do VZV de acordo com SNPs presentes nas ORFs 21, 22 e 50, encontrando apenas sequências compatíveis com isolados selvagens. Nossos estudos confirmam esse achado. No entanto, um monitoramento epidemiológico contínuo relativo à dinâmica dos vírus vacinal e selvagem em nosso meio, seria recomendável, pois à semelhança do que tem sido observado em outros países, é de se supor que haja alguma modificação no cenário identificado até este momento, ao longo do tempo e à medida que a taxa de indivíduos vacinados aumente na população.

Em relação aos dados de epidemiologia molecular, relativos à classificação filogenética dos clados predominantes em nosso meio, trata-se campo pouco explorado em nosso país. Com seus diversos genótipos agrupados em clados, conforme classificação do ENVZV, o VZV possui baixa variação intraclado e interclado

(em torno de 0,05%) e mostra-se um vírus de distribuição global, evidenciada pela distribuição dos clados em diferentes continentes<sup>30,33</sup>.

Na etapa de MS, obtivemos uma eficiência de 40%, com sequenciamento de DNA de isolados de VZV em 12 amostras de LCR. A maioria das amostras sequenciadas (75%) pertenciam ao grupo LSL e correspondiam a pacientes que não haviam recebido nenhum tratamento antiviral empírico anterior à data da coleta, diferente dos casos procedentes do HCFMUSP. Após a inclusão de alguns casos procedentes do HCFMUSP, conseguimos informações, a partir dos prontuários desses pacientes, que confirmaram que em alguns casos, a amostra que recebemos para análise, havia sido coletada alguns dias após início empírico de tratamento antiviral. Não podemos, ainda, deixar de considerar o fato de o LCR ser um material com baixa celularidade e carga viral quando comparado a amostras de raspado de lesão de pele, espécime muito utilizada em outros estudos. Os alvos gênicos estudados podem ser outro fator a ser ponderado, visto que muitos trabalhos fazem o uso de diferentes e/ou mais numerosas regiões alvo do genoma do VZV<sup>41,125,127,130</sup>.

Em nosso estudo, as sequências de VZV obtidas a partir da MS apresentaram similaridade superior a 99% com sequência protótipos de VZV disponíveis no GenBank. Neste estudo, cinco amostras apresentaram proximidade filogenética com sequências de clado 1; três amostras proximidade com sequências de clado 2; uma amostra proximidade com sequências de clado 3; duas amostras proximidade com sequências de clado 5; e um amostra proximidade com sequências de clado 6.

Em nossa reconstrução por NJ os protótipos KX352207.1 e KX352209.1, classificados previamente como clado 5; e KX262865.1 e KX262866.1, classificados previamente como clado 1, se agruparam à protótipos de clado 2, em mesmo ramo que se agruparam as amostras VZV004, VZV016 e VZV030 (clado 2). Os protótipos DQ452050 e KP771898.1, pertencentes ao clado 4, se agruparam com demais protótipos de clado 2.

Que seja de nosso conhecimento, estas são as primeiras descrições dos clados 2 e 6 no Brasil e do clado 2 na América Latina.

Os clados predominantes no continente americano são os clados 1, 3 e 5<sup>34</sup>. Na América Latina, poucos estudos sobre o tema são encontrados na literatura. Condori-Yujra et al (2018)<sup>132</sup> reportaram os clados 1 e 6 em amostras peruanas. Rodríguez-

Castillo<sup>133</sup> reportaram amostras de genótipo Europeu (clados 1 ou 3), Mosaico M1 (clado 5) e M4 (clado 6) e Garcés-Ayala<sup>134</sup> o clado VIII em amostras mexicanas. Dayan et al (2004)<sup>131</sup> não encontraram variações entre sequências de amostras ambulatoriais e de pacientes internados, estas pertencentes ao genótipo Europeu (clados 1 ou 3) em amostras argentinas.

No Brasil, Costa et al (2016)<sup>122</sup> e Bastos et al (2019)<sup>123</sup> reportaram os clados 1, 3 e 5 nas cidades de Ananindeua, Belém e Marituba, no estado do Pará, e Manaus, no estado do Amazonas, respectivamente. Ainda, podemos destacar o estudo multicêntrico de Quinlivan et al (2002)<sup>30</sup>, no qual 4 amostras brasileiras de varicela foram identificadas como genótipo A (clados 1 ou 5) e 1 amostra identificada como genótipo C/A (clados 1, 4 ou 5).

Realizamos, como análise complementar à classificação filogenética, a análise de variabilidade genética nos trechos sequenciados, no que tange à detecção de mutações sinônimas e não-sinônimas. Foram detectadas em nossas sequências ambos os tipos de mutações, algumas apresentando, ainda, troca de classe de AAs. No entanto, as mutações aqui detectadas já são relatadas na literatura, conforme algoritmo de busca da ferramenta online *Protein Blast* nos informa, apresentando sequências de AAs já depositadas e com similaridade de 100%. O impacto das trocas de classe de AA nos produtos proteicos e sua respectiva conformação tridimensional não foi objeto de análise.

Vale ressaltar que a detecção de mutações e processos de recombinação no genoma do VZV é fenômeno descrito, apesar de raro<sup>39</sup>. Os polimorfismos apresentados pelas sequências de VZV nos informam muito mais a evolução dos caracteres filogenéticos do que a associação destes com outras formas de apresentação da doença do VZV, tema ainda pouco discutido.

Considerando, ainda, ampliar a região de análise de sequências de VZV ou caracterizar molecularmente as amostras que não obtiveram sucesso na etapa de MS, procedeu-se ao sequenciamento massivo paralelo, por meio da metodologia *based pair* (Illumina®). A oportunidade de se utilizar esta metodologia surgiu a partir de outro projeto de pós-graduação, desenvolvido em nosso grupo pela MsC Noely Evangelista Ferreira. O referido projeto utiliza amostras advindas do mesmo projeto inicial, também fonte das amostras utilizadas neste estudo. O referido projeto paralelo

buscava, a partir da técnica de SMP, identificar patógenos em amostras de LCR de pacientes com quadros de MEM de etiologia indeterminada.

As amostras de nosso estudo que possuíam material bruto suficiente foram submetidas à um processo de ultrafiltração e novo processo de extração. Apesar de ser realizada em outro sistema, o princípio da técnica foi o mesmo (extração por *beads* magnéticas), o que não levou a prejuízos na obtenção de material genético. A composição dos tamanhos de fragmentos das bibliotecas evidenciados nas Figuras 18 e 19 mostram uma pequena proporção de fragmentos fora da faixa de interesse pré-estabelecida e queda na concentração do *pool* de bibliotecas antes e após a seleção dos tamanhos de fragmentos.

Na etapa de SMP, apenas três amostras obtiveram cobertura genômica e quantidade de *reads* suficientes para análises de AAs e análises moleculares, das quais uma (VZV012) apresentou alinhamento de AA compatível com sequências virais e altas quantidades de *reads*. No entanto, outras famílias virais (Figura 20) foram identificadas após o alinhamento de nucleotídeos. Por não constituir objetivo do presente estudo, essas sequências não foram analisadas ou discutidas no presente estudo.

É notável que, dentre as sequências obtidas para a amostra VZV012, o alinhamento de AAs nos revelasse a presença do gênero *Lymphocryptovirus*, cuja uma das principais espécies é o EBV. Este fato corrobora a presença de uma coinfeção também identificada através da plataforma comercial XGEN UMLTI N9® (Biometrix Diagnóstica, Brasil).

A amostra de VZV012, sequenciada por SMP, não foi alvo de análise de variabilidade genética pois as sequências obtidas representam trechos gênicos não contínuos, não sendo possível comparar estes com demais sequências protótipo. Outro fator a ser considerado é quantidade de leitura gerada em cada trecho, fator variável, e que nos informa se o resultado gerado é fidedigno ou possível erro de sequenciamento.

Em resumo, em apenas três amostras, dentre as 28 amostras de LCR disponíveis para avaliação exploratória de VZV por SMP, foi possível obter-se quantidade de *reads* suficientes para análises de AAs e análises moleculares, das quais apenas uma (VZV012) apresentou alinhamento compatível com VZV.

Concluimos, portanto, em nosso estudo, que o método de SMP adaptado não atendeu às expectativas de complementação diagnóstica em relação ao MS para uma mais ampla caracterização molecular das amostras, conforme pretendíamos inicialmente.

Este é o primeiro estudo brasileiro a utilizar a metodologia de SMP para o estudo do VZV. Ressalta-se que, apesar de uma técnica promissora e com potencial de ser empregada na rotina diagnóstica, como já reportado na literatura<sup>170,171,172,173</sup>, esta possui uma limitada sensibilidade comparada à demais técnicas de amplificação molecular, como reportado por Perlejewski et al (2020)<sup>174</sup>. Além da restrição metodológica, é importante citar a escassez de matéria viral presente no LCR em relação à outras fontes como lesões de pele, como já discutido anteriormente.

Em resumo, acreditamos que o conjunto dos dados aqui discutidos possam ter adicionado informações capazes de contribuir em relação a algumas questões relacionadas ao curso clínico e a reativação de VZV a nível de SNC, assim como possam ter contribuído com dados relativos à epidemiologia molecular do VZV em nosso meio.

Importante, no entanto, comentarmos sobre as limitações de nosso estudo. Em primeiro lugar, por se tratar de uma análise retrospectiva de casos, algumas informações clínicas e relativas ao passado vacinal dos pacientes incluídos não foram disponíveis para alguns pacientes.

Em segundo lugar, a inclusão de algumas amostras coletadas após início da terapia antiviral, deve ter determinado uma queda da carga viral do VZV, o que limitou nossa capacidade de análise molecular dessas amostras.

Em terceiro lugar, a eventual comparação de resultados de sequenciamento em amostras de LCR e lesão de pele provenientes de um mesmo paciente poderiam eventualmente ter acrescentado algum outro aspecto não explorado pelo nosso trabalho

E por fim, a análise das amostras por SMP foi apenas exploratória e não especificamente desenhada para os fins propostos em nosso estudo, o que pode ter comprometido os resultados obtidos através da metodologia utilizada. Ademais, as sequências obtidas não correspondiam a genoma completo, possibilitando apenas análises descritivas dos achados. Apesar dessa limitação metodológica, o

sequenciamento por SMP trouxe interessantes informações que poderão ser melhor exploradas em estudos futuros, envolvendo inclusive a descrição de outros copatógenos ou vírus comensais, identificados no LCR.

## 7 CONCLUSÃO

O teste de PCR em tempo real *in-house* validado apresentou desempenho satisfatório em termos de eficiência e sensibilidade analítica, constituindo-se uma técnica sensível, específica e acessível para aplicação na rotina laboratorial para identificação da etiologia viral de casos de MEM.

Nas amostras analisadas não fomos capazes de identificar a presença de vírus vacinal em nosso meio.

A análise de diferentes alvos gênicos de VZV foi capaz de identificar a presença dos clados 1, 2, 3, 5 e 6, sendo o clado 2 pela primeira vez descrito na América Latina e o clado 6 pela primeira vez descrito no Brasil.

Nas amostras analisadas, o método de SMP adaptado não atendeu às expectativas de complementação diagnóstica para classificação filogenética dos clados das amostras de VZV quando comparado ao MS.

No entanto, a análise complementar por SMP levantou a possibilidade da participação de outras famílias virais na história natural dos quadros de MEM, apesar das limitações apresentadas na aplicação do protocolo descrito.

## 8 REFERÊNCIAS

1. Arvin AM. Varicella-zoster virus. *Clin Microbiol Rev.* 1996;9(3):361- 81.
2. Wigg MD, Miranda MMFS. Viroses dermatrópicas. In: Santos NOS, Romanos MTV, Wigg MD, organizadoras. *Introdução à virologia humana.* 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2008. p. 177-211.
3. Gershon AA, Gershon MD. Pathogenesis and current approaches to control of varicella-zoster virus infections. *Clin Microbiol Rev.* 2013;26(4):728-43.
4. Farber S. Chemotherapeutic studies of tumors, including leukemia, in children. *Am J Dis Child.* 1950;79(5):961-2.
5. Farber S. The treatment of acute leukemia. *J Chronic Dis.* 1956;3(4):455-7.
6. Wood MJ. History of varicella zoster virus. *Herpes.* 2000;7(3):60-5.
7. Gatherer D, et al. ICTV virus taxonomy profile: *Herpesviridae* 2021. *J Gen Virol.* 2021;102(10):001673.
8. McGeoch DJ, Davison AJ. The molecular evolutionary history of the herpesviruses. In: Domingo E, Webster RG, Holland JF, editors. *Origin and evolution of viruses.* Cambridge: Acaemic Press; 1999. p. 441-465.
9. Cusabio. Herpesviruses [Internet]. Houston: Cusabio; c2022 [cited 2022 June 19]. Available from: <https://www.cusabio.com/infectious-diseases/herpesviruses.html>
10. Zerboni L, et al. Varicella-zoster virus infection of human dorsal root ganglia *in vivo.* 2005;102(18): 6490-5.
11. Selariu A, et al. ORF7 of varicella-zoster virus is a neurotropic factor. *J Virol.* 2012;86(16):8614-24.
12. Davison AJ, Scott JE. The complete DNA sequence of varicella-zoster virus. *J Gen Virol.* 1986;67(Pt 90):1759-816.
13. Kennedy PGE, et al. A comparison of herpes simplex virus type 1 and varicella-zoster virus latency and reactivation. *J Gen Virol.* 2015;96(Pt 7):1581-602.
14. Davison AJ, Scott JE. DNA sequence of the major inverted repeat in the varicella-zoster virus genome. *J Gen Virol.* 1985;66(Pt 2):207-20.
15. Tyler SD, et al. Genomic cartography of varicella-zoster virus: a complete genome-based analysis of strain variability with implications for attenuation and phenotypic differences. *Virology.* 2007;359(2):447-58.



16. Cohrs RJ, et al. Characterization of varicella-zoster virus gene 21 and 29 proteins in infected cells. *J Virol.* 2002;76(14):7228-38.
17. Baiker A, et al. The immediate-early 63 protein of varicella-zoster virus: analysis of functional domains required for replication in vitro and for T-cell and skin tropism in the SCIDhu model in vivo. *J Virol.* 2004;78(3):1181-94.
18. Cohen JI, et al. Varicella-zoster virus ORF4 latency-associated protein is important for establishment of latency. *J Virol.* 2005;79(11):6969-75.
19. Mocarski Jr ES. Comparative analysis of herpesvirus-common protein. In: Arvin A, Campadelli-Fiume G, Mocarski E, Moore PS, Roizman B, Whitley R, Yamanishi K, editors. *Human Herpesviruses: Biology, Therapy and Immunoprophylaxis.* Cambridge: Cambridge University Press; 2007. Chapter 4.
20. Che X, et al. ORF11 protein interacts with the ORF9 essential tegument protein in varicella-zoster virus infection. *J Virol.* 2013;87(9):5106-17.
21. Che X, et al. Identification and functional characterization of the Varicella zoster virus ORF11 gene product. *Virology.* 2011;412(1):156-66.
22. Folster JM, et al. Regulation of the expression of the varicella-zoster virus open reading frame 66 gene. *Virus Res.* 2011;155(1):334-42.
23. Grose C, et al. Aberrant virion assembly and limited glycoprotein C production in varicella-zoster virus-infected neurons. *J Virol.* 2013;87(17):9643-8.
24. Ali MA, et al. The insulin degrading enzyme binding domain of varicella-zoster virus (VZV) glycoprotein E is important for cell-to-cell spread and VZV infectivity, while a glycoprotein I binding domain is essential for infection. *Virology.* 2009;386(2):270-9.
25. Arcanjo K, et al. Biochemical characterization of heparan sulfate derived from murine hemopoietic stromal cell lines: a bone marrow-derived cell line S17 and a fetal liver-derived cell line AFT024. *J Cell Biochem.* 2002;87(2):160-72.
26. Steiner I, Kennedy PGE, Pachner AR. The neurotropic herpes viruses: herpes simplex and varicella-zoster. *Lancet Neurol.* 2007;6(11):1015-28.
27. Depledge DP, Sadaoka T, Ouwendijk WJD. Molecular aspects of varicella-zoster virus latency. *Viruses.* 2018;10(7):349-69.
28. Calcagnotto D. Taxas de evolução e relógios moleculares. In: Matioli SR, Fernandes FMC, editores. *Biologia molecular e evolução.* 2. ed. Ribeirão Preto: Holos; 2012. p. 61-73.
30. Quinlivan M, et al. The molecular epidemiology of varicella-zoster virus: evidence for geographic segregation. *J Infect Dis.* 2002;186(7):888-94.
31. Breuer J. VZV molecular epidemiology. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2010;342:15-42.

32. Schmidt-Chanasit J, Sauerbrei A. Evolution and world-wide distribution of varicella-zoster virus clades. *Infect Genet Evol.* 2011;11(1):1-10.
33. Barrett-Muir W, et al. Genetic variation of varicella-zoster virus: evidence for geographical separation of strains. *J Med Virol.* 2003;70(Suppl 1):S42-7.
34. Peters GA, al. A full-genome phylogenetic analysis of varicella-zoster virus reveals a novel origin of replication-based genotyping scheme and evidence of recombination between major circulating clades. *J Virol.* 2006;80(19):9850-60.
35. Loparev VN, Gonzalez A, Deleon-Carnes M, Tipples G, Fickenschner H, Torfason EG, et al. Global identification of three major genotypes of varicella-zoster virus: longitudinal clustering and strategies for genotyping. *J Virol.* 2004;78(15):8349-58;
36. Breuer J, et al. A proposal for a common nomenclature for viral clades that form the species varicella-zoster virus: summary of VZV Nomenclature Meeting 2008, Barts and the London School of Medicine and Dentistry. *J Gen Virol.* 2010;91(Pt 4):821-8.
37. Jensen NJ, et al. Revisiting the genotyping scheme for varicella-zoster viruses based on whole-genome comparisons. *J Gen Virol.* 2017;98(6):1434-8.
38. Breuer J. Molecular genetic insights into varicella zoster virus (VZV), the vOka vaccine strain, and the pathogenesis of latency and reactivation. *J Infect Dis.* 2018;218(Suppl 2):S75-80.
39. Grose C, et al. Complete DNA sequence analyses of the first two varicella-zoster virus glycoprotein E (D150N) mutant viruses found in North America: evolution of genotypes with na accelerated cell spread phenotype. *J Virol.* 2004;78(13):6799-807.
40. Zell R, et al. Sequencing of 21 varicella-zoster virus genomes reveals two novel genotypes and evidence of recombination. *J Virol.* 2011;86(3):1608-22.
41. Depledge DP, et al. High viral diversity and mixed infections in cerebral spinal fluid from cases of varicella zoster virus encephalitis. *J Infect Dis.* 2018;218(10):1592-1601.
42. Jin L, et al. Differentiation between wild-type and vaccines strains of varicella zoster virus (VZV) based on four single nucleotide polymorphisms. *Epidemiol Infect.* 2017;145(12):2618-25.
43. Marin M, Leung J, Gershon AA. Transmission of vaccine-strain varicella-zoster virus: a systematic review. *Pediatrics.* 2019;144(3):e20191305.
44. Moodley A, et al. Severe herpes zoster following varicella vaccination in immunocompetent young children. *J Child Neurol.* 2019;34(4):184-8.
45. Saringkarisate K, et al. Vaccine-strain varicella virus transmitted to a term infant following maternal postpartum vaccination. *J Pediatric Infect Dis Soc.* 2022;11(10):452-3.

46. Heath G, et al. Acute retinal necrosis caused by the zoster vaccine virus. *Clin Infect Dis*. 2017;65(12):2122-5.
47. Luan L, et al. Seroprevalence and molecular characteristics of varicella-zoster virus infection in Chinese children. *BMC Infect Dis*. 2019;19(1):643.
48. Baird NL, et al. Varicella zoster virus (VZV)-human neuron interaction. *Viruses*. 2013;5(9):2106-15.
49. Mahalingam R, et al. Current in vivo models of varicella-zoster virus neurotropism. *Viruses*. 2019;11(6):502.
50. Jiang HF, et al. ORF7 of varicella-zoster virus is required for viral cytoplasmic envelopment in differentiated neuronal cells. *J Virol*. 2017;91(12):e00127-17.
51. Dias AC, et al. Impact of vaccination on the incidence of varicella hospitalizations in a state in Southeast Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2019;52:e20190149.
52. Bozzola E, Bozzola M. Varicella complications and universal immunization. *J Pediatr (Rio J)*. 2016;92(4):328-30.
53. Bozzola E, et al. Neurological complications of varicella in childhood: case series and a systematic review of the literature. *Vaccine*. 2012; 30(39):5785-90.
54. Galvão LO, et al. Severe varicella in a child immunosuppressed with methotrexate. *An Bras Dermatol*. 2022;97(2):184-8.
55. Nagel MA, et al. Rapid and sensitive detection of 68 unique varicella zoster virus gene transcripts in five multiplex reverse transcription-polymerase chain reactions. *J Virol Methods*. 2009;157(1):62-8.
56. Antonioli L, et al. Epidemiology and clinical characteristics of herpes zoster in a tertiary care hospital in Brazil. *Braz J Infect Dis*. 2019;23(2):143-5.
58. Rivest P, et al. Severe complications associated with varicella: Province of Quebec, April 1994 to March 1996. *Can J Infect Dis*. 2001;12(1):21-6.
58. Smith CK, Arvin AM. Varicella in the fetus and newborn. *Semin Fetal Neonatal Med*. 2009;14(4):209-17.
59. Portella AVT, Souza LCB, Gomes JMA. Herpes-zoster and post-herpetic neuralgia. *Rev Dor*. 2013;14(3):210-5.
60. Schwab IR. Herpes zoster sine herpette: a potencial cause of iridoplegic granulomatous iridocyclitis. *Ophthalmology*. 1997;104(9):1421-5.
61. Ku SH, et al. A case of zoster sine herpette presenting with thoracic radicular pain diagnosed by polymerase chain reaction in skin exudate. *Dermatologica Sinica*. 2014;32(3):180-2.

63. Silva JR, et al. Neuroimmune-glia interactions in the sensory ganglia account for the development of acute herpetic neuralgia. *J Neurosci*. 2017;37(27):6408-22.
64. Spiegel R, et al. Severe meningoencephalitis due to late reactivation of varicella-zoster virus in an immunocompetent child. *J Child Neurol*. 2010;25(1):87-90.
65. Wutzler P, et al. Herpes zoster in the context of varicella vaccination – An equation with several variables. *Vaccine*. 2018, 36(46):7072-82.
66. Kumar V, Abbas AK, Aster JC, editores. Robbins: patologia básica. 9. ed. Rio de Janeiro: Editora Elsevier. 2013.
66. Pollak L, et al. Varicella zoster vs. herpes simplex meningoencephalitis in the PCR era. A single center study. *J Neurol Sci*. 2012;314(1-2):29-36.
67. Chartrand SA. Varicella vaccine. *Pediatr Clin North Am*. 2000;47(2):373-94.
68. Paul R, et al. Post chicken pox neurological sequelae: three distinct presentations. *J Neurosci Rural Pract*. 2010;1(2):92-6.
69. Puccioni-Sohler M. Encefalite Viral. In: Brasil Neto JP, Takayanagui OM, editores. Tratado de neurologia da Academia Brasileira de Neurologia. Rio de Janeiro: Elsevier; 2013. p. 742-47.
70. Bubak AN, et al. Varicella zoster virus differentially alters morphology and suppresses proinflammatory cytokines in primary human spinal cord and hippocampal astrocytes. *J Neuroinflammation*. 2018;15(1):318.
71. Nagel MA, Niemeyer CS, Bubak AN. Central nervous system infections produced by varicella zoster virus. *Curr Opin Infect Dis*. 2020;33(3):273-8.
72. Skripuletz T, et al. Varicella zoster virus infections in neurological patients: a clinical study. *BMC Infect Dis*. 2018;18(1):238.
73. Chiappini E, et al. Varicella-zoster virus acquired at 4 months of age reactivates at 24 months and causes encephalitis. *J Pediatr*. 2002;140(2):250-1.
74. Jhaveri R, et al. Varicella-zoster virus: an overlooked cause of aseptic meningitis. *Pediatr Infect Dis J*. 2003;22(1):96-7.
75. Fusco D, et al. VZV meningitis following varicella vaccine. *J Clin Virol*. 2010;48(4):275-7.
76. Halling G, et al. Focal encephalitis following varicella-zoster virus reactivation without rash in a healthy immunized young adult. *J Infect Dis*. 2014. 210(5):713-6.

78. Pasedag T, et al. Varicella zoster virus meningitis in a young immunocompetent adult without rash: a misleading clinical presentation. *Case Rep Neurol Med*. 2014;2014:686218.
79. Jordan CD, Korley F, Hamade B. Varicella-zoster virus encephalitis in an immunocompetent patient without a rash. *Am J Emerg Med*. 2016.34(11):2257.e1-2257.e2.
80. Harrington WE, et al. Vaccine oka varicella meningitis in two adolescents [published correction appears in *Pediatrics*. 2020;145(4):e20191522]. *Pediatrics*. 2019;144(6):e2019152.
81. Persson A, et al. Varicella-zoster virus CNS disease - viral load, clinical manifestations and sequels. *J Clin Virol*. 2009;46(3):249-53.
82. Gilden D, et al. Neurological disease produced by varicella zoster virus reactivation without rash. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2010;342:243-53.
83. Gilden D, et al. The value of cerebrospinal fluid antiviral antibody in the diagnosis of neurologic disease produced by varicella zoster virus. *J Neurol Sci*. 1998;159(2):140-4.
84. Grahn A, et al. Varicella-zoster virus (VZV) DNA in serum of patients with VZV central nervous system infections. *J Infect*. 2016;73(3):254-60.
86. Rimério CAT, et al. Human herpesvirus infections of the central nervous system: laboratory diagnosis based on DNA detection by nested PCR in plasma and cerebrospinal fluid samples. *J Med Virol*. 2015;87(4):648-55.
87. Kestenbaum LA, et al. Defining cerebrospinal fluid white blood cell count reference values in neonates and young infants. *Pediatrics*. 2010;125(2):257–64.
88. Seehusen DA, Reeves MM, Fomin DA. Cerebrospinal fluid analysis. *Am Fam Physician*. 2003;68(6):1103–8.
89. Guan H, et al. Detection of virus in CSF from the cases with meningoencephalitis by next-generation sequencing. *J Neurovirol*. 2016;22(2):240-5.
90. Xing XW, et al. Evaluation of next-generation sequencing for the diagnosis of infections of the central nervous system caused by the neurotropic herpes viruses: a pilot study. *Eur Neurol*. 2018;80(5-6):283-8.
91. Clemens SA, et al. Soroepidemiologia da varicela no Brasil - resultados de um estudo prospectivo transversal. *J Pediatr (Rio J)*. 1999;75(6):433-41.
92. Semenovitch I, Lupi O. A seroepidemiologic survey of the prevalence of varicella-zoster virus in the pediatric population in two university hospitals in Brazil. *Int J Dermatol*. 2003;42(3):193-6.

93. Reis AD, Pannuti CS, Souza VAUF. Prevalência de anticorpos para o vírus da varicela-zoster em adultos jovens de diferentes regiões climáticas brasileiras. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2003;36(3):317-20.
94. Wutzler P, et al. Varicella vaccination - the global experience. *Expert Rev Vaccines.* 2017;16(8):833-43.
95. Brasil. Ministério da Saúde. Varicela/Herpes Zoster: situação epidemiológica: dados [Internet]. Brasília: Ministério da Saúde; 2017. [ citado 2021 Ago 5]. Disponível em: <https://antigo.saude.gov.br/saude-de-a-z/guillain-barre/967-saude-de-a-a-z/varicela-herpes-zoster/11497-situacao-epidemiologica-dados>
96. Brasil. Ministério da Saúde. DATASUS: Meningite - casos confirmados notificados no sistema de informação de agravos de notificação – Brasil [Internet]. Brasília: Ministério da Saúde; 2022 [citado 2022 Dez 12] .Disponível em <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/deftohtm.exe?sinannet/cnv/meninbr.def>
97. Brasil. Ministério da Saúde. Catapora (Varicela): situação epidemiológica [Internet]. Brasília: Ministério da Saúde; 2017 [citado 2022 Dez 12]. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/c/catapora-varicela/situacao-epidemiologica>
98. Scotta MC, et al. Early impact of universal varicela vaccination on childhood varicela and herpes zoster hospitalizations in Brazil. *Vaccine.* 2017;36(2):280-4.
99. Brasil. Ministério da Saúde. DATASUS. Varicela e herpes zoster - Morbidade hospitalar do SUS - por local de internação - Brasil - 2017 a 2021 [Internet]. Brasília: Ministério da Saúde; 2022. [citado 2022 Dez 12]. Disponível em <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?sih/cnv/niuf.def>
100. Gershon AA. Live attenuated varicella vaccine. *Annu Rev Med.* 1987. 38:41-50.
101. Cristófani LM, et al. Administration of live attenuated varicella vaccine to children with cancer before starting chemotherapy. *Vaccine.* 1991;9(12):873-6.
102. Johnson BH, Palmer L, Gatwood J, Lenhart G, Kawai K, Acosta CJ. Annual incidence rates of herpes zoster among an immunocompetent population in the United States. *BMC Infect Dis.* 2015;15:502.
103. Warren-Gash C, Forbes H, Breuer J. Varicella and herpes zoster vaccine development: lessons learned. *Expert Rev Vaccines.* 2017;16(12):1191-201.
104. Kawai K, Gebremeskel BG, Acosta CJ. Systematic review of incidence and complications of herpes zoster: towards a global perspective. *BMJ Open.* 2014;4(6):e004833.
105. Pinchinat S, et al. Similar herpes zoster incidence across Europe: results from a systematic literature review. *BMC Infect Dis.* 2013;13:170.

106. Toniolo-Neto J, et al. Measuring herpes zoster disease burden in São Paulo, Brazil: a clinico-epidemiological single-center study. *Clinics (Sao Paulo)*. 2018;73:e243.
107. Oxman MN, et al. A vaccine to prevent herpes zoster and postherpetic neuralgia in older adults. *N Engl J Med*. 2005;352(22):2271-84.
108. Griep R. Subnotificação das doenças de notificação compulsória no contexto hospitalar [dissertação]. Florianópolis: Universidade Federal de Santa Catarina, Departamento de Engenharia de Produção e Sistemas; 2003.
109. Silva RGL, et al. A participação da universidade na produção de testes diagnósticos moleculares do novo coronavírus no Brasil: resposta aos desafios sanitários. *Cad Saude Publica*. 2020;36(6):e00115520.
110. Bastos MS, et al. Detection of herpesvirus, enterovirus, and arbovirus infection in patients with suspected central nervous system viral infection in the Western Brazilian Amazon. *J Med Virol*. 2014;86(9):1522-7.
111. Chesky M, et al. Polymerase chain reaction for the laboratory diagnosis of aseptic meningitis and encephalitis. *Arq Neuropsiquiatr*. 2000;58(3B):836-42.
112. Oliveira DB, et al. Etiological agents of viral meningitis in children from a dengue-endemic area, Southeast region of Brazil. *J Neurol Sci*. 2017;375:390-4.
113. Tique V, et al. Epidemiological surveillance oh herpes viral encephalitis in Cordoba, Colombia. *Rev Salud Publica*. 2016;18(4):581-91.
114. Dupuis M, et al. Molecular detection of viral causes of encephalitis and meningitis in New York State. *J Med Virol*. 2011;83(12):2172-81.
115. Arruti M, et al. Incidence of varicella zoster virus infections of the central nervous system in the elderly: a large tertiary hospital-based series (2007-2014). *J Neurovirol*. 2017;23(3):451-9.
116. Jarrin I, et al. Etiologies and management of aseptic meningitis in patients admitted to an internal medicine department. *Medicine (Baltimore)*. 2016;95(2):e2372.
117. Javali M, et al. Use of multiplex PCR based molecular diagnostics in diagnosis of suspected CNS infections in tertiary care setting - A retrospective study. *Clin Neurol Neurosurg*. 2017;161:110-6.
118. Huppatz C, et al. Etiology of encephalitis in Australia, 1990-2007. *Emerg Infect Dis*. 2009;15(9):1359-65.
119. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Cidades e Estados – São Paulo – código 35 [Internet]. Rio de Janeiro: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística; c2022 [citado 2022 Dez 11]. Disponível em: <https://www.ibge.gov.br/cidades-e-estados/sp.html>

120. São Paulo. Coordenadoria de Vigilância Sanitária - COVISA. [Internet]. São Paulo: Secretaria Municipal de Saúde; 2021. [citado 2021 Set 12]. Dados fornecidos por: gabinetecovisa@prefeitura.sp.gov.br.
121. Norberg P, et al. Recombination of globally circulating varicella-zoster virus. *J Virol*. 2015;89(14):7133-46.
122. Costa MRM, et al. Vírus da varicela-zoster: identificação dos genótipos em casos de varicela e herpes-zoster nos Municípios de Ananindeua, Belém e Marituba, Estado do Pará, Brasil. *Rev Pan-Amaz Saude*. 2016;7(3):31-41.
123. Bastos MS, et al. Genotypes of clinical varicella-zoster virus isolates from Manaus, Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2009;52:e20180166.
124. Bryant P, et al. Vaccine strain and wild-type clades of varicella-zoster virus in central nervous system and non-CNS Disease, New York State, 2004-2019. *J Clin Microbiol*. 2022;60(4):e0238121.
125. Leung J, et al. Varicella in Tshuapa Province, Democratic Republic of Congo, 2009-2014. *Trop Med Int Health*. 2019;24(7):839-48.
126. Liu J, et al. Genotyping of clinical varicella-zoster virus isolates collected in China. *J Clin Microbiol*. 2009;47(5):1418-23.
127. Sahay RR, et al. Clinico-epidemiological investigation on Varicella Zoster Virus indicates multiple clade circulation in Maharashtra state, Índia. *Heliyon*. 2018;4(8):e00757.
128. Boštíková V, Sleha R, Boštík P. Genotyping of varicella zoster virus clinical isolates from the Czech Republic. *Cent Eur J Public Health*. 2016;24(4):331-2.
129. Depledge DP, Breuer J. Varicella-Zoster Virus-Genetics, Molecular Evolution and Recombination. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2023;438:1-23.
130. Loparev VN, et al. Identification of five major and two minor genotypes of varicella-zoster virus strains: a practical two-amplicon approach used to genotype clinical isolates in Australia and New Zealand. *J Virol*. 2007;81(23):12758-65.
131. Dayan GH, et al. Varicella seroprevalence and molecular epidemiology of varicella-zoster virus in Argentina, 2002. *J Clin Microbiol*. 2004;42(12):5698-704.
132. Condori-Yujra FJ, et al. Genetic characterization of varicella Zoster virus isolated from complicated clinical cases in Peru in 2016 and 2017. *Rev Peru Med Exp Salud Publica*. 2018;35(3):533-4.
133. Rodríguez-Castillo A, et al. Genetic variation of varicella-zoster virus strains circulating in Mexico City. *J Clin Virol*. 2009;46(4):349-53.
134. Garcés-Ayala F, et al. Full-genome sequence of a novel varicella-zoster virus clade isolated in Mexico. *Genome Announc*. 2015;3(4):e00752-12.



135. Takahashi M, et al. Live vaccine used to prevent the spread of varicella in children in hospital. *Lancet*. 1974;2(7892):1288-90.
136. Young K. CDC advisers recommend new herpes zoster vaccine over zostavax [Internet]. [s.l.]: NEJM: Journal Watch; 2017 [cited 2021 Aug 29]. Available from: <https://www.jwatch.org/fw113469/2017/10/26/cdc-advisers-recommend-new-herpes-zoster-vaccine-over>
137. Centers for Disease Control and Prevention. Protect your patients with the new shingles vaccine [Internet]. Atlanta: Centers for Disease Control and Prevention; 2018. [cited 2019 Set 4]. Available from: <https://www.cdc.gov/shingles/downloads/shingles-factsheet-hcp.pdf>
138. Sartori AMC. A review of the varicella vaccine in immunocompromised individuals. *Int J Infect Dis*. 2004;8(5):259-70.
139. Harris PA, et al. The REDCap consortium: Building an international community of software platform partners. *J Biomed Inform*. 2019;95:103208.
140. Harris PA, et al. Research electronic data capture (REDCap) – a metadata-driven methodology and workflow process for providing translational research informatics support. *J Biomed Inform*. 2009;42(2):377–81.
141. Weidmann M, Armbruster K, Hufert FT. Challenges in designing a Taqman-based multiplex assay for the simultaneous detection of herpes simplex virus types 1 and 2 and varicella-zoster virus. *J Clin Virol*. 2008;42(4):326–34.
142. Tourinho RS, et al. Application of synthetic standard curves for absolute quantification of hepatitis A and E by real-time PCR. *J Genet Genome Res*. 2015;2(1):1-3.
143. Bustin SA, et al. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin Chem*. 2009;55(4):611-22.
144. Vance GH. College of american pathologists proposal for the oversight of laboratory-developed tests. *Arch Pathol Lab Med*. 2011;135(11):1432-5.
145. Emery SL, et al. Real-time reverse transcription-polymerase chain reaction assay for SARS-associated coronavirus. *Emerg Infect Dis*. 2004;10(2):311-6.
146. Campsall PA, et al. Detection and genotyping of varicella-zoster virus by TaqMan allelic discrimination real-time PCR. *J Clin Microbiol*. 2004;42(4):1409-13.
147. Gomi Y, et al. Comparison of the complete DNA sequences of the Oka varicella vaccine and its parental virus. *J Virol*. 2002;76(22):11447-59.
148. Sauerbrei A, Wutzler P. Different genotype pattern of varicella-zoster virus obtained from patients with varicella and zoster in Germany. *J Med Virol*. 2007;79(7):1025-31.

149. LaRussa P, et al. Restriction fragment length polymorphism of polymerase chain reaction products from vaccine and wild-type varicella-zoster virus isolates. *J Virol.* 1992;66(2):1016-20.
150. LaRussa P, et al. Polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism analysis of varicella-zoster virus isolates from the United States and other parts of the world. *J Infect Dis.* 1998;178(Suppl 1);S64-6.
151. Kibbe WA. OligoCalc: an online oligonucleotide properties calculator. *Nucleic Acids Res.* 2007;35(Web Server issue):W43-6.
152. Gouy M, et al. Seaview version 5: a multiplatform software for multiple sequence alignment, molecular phylogenetic analyses, and tree reconciliation. *Methods Mol Biol.* 2021;2231:241-260.
153. Deng X, et al. An ensemble strategy that significantly improves de novo assembly of microbial genomes from metagenomic next-generation sequencing data. *Nucleic Acids Res.* 2015;43(7):e46.
154. Okonechnikov K, et al. Unipro UGENE: a unified bioinformatics toolkit. *Bioinformatics.* 2012;28(8):1166-7.
155. Yoon SH, et al. A large-scale evaluation of algorithms to calculate average nucleotide identity. *Antonie Van Leeuwenhoek.* 2017;110(10):1281-6.
156. Shikova E, et al. Varicella zoster virus infection in neurological patients in Bulgaria. *J Neurovirol.* 2021;27(2):272-8.
157. Lenfant T, et al. Neurological complications of varicella zoster virus reactivation: Prognosis, diagnosis, and treatment of 72 patients with positive PCR in the cerebrospinal fluid. *Brain Behav.* 2022;12(2):e2455.
158. Spernovasilis N, et al. Varicella-zoster virus meningitis with hypoglycorrhachia in a young immunocompetent adult without rash: a case report and literature review. *IDCases.* 2018;12:104-6.
159. Rottenstreich A, Oz ZK, Oren I. Association between viral load of varicella zoster virus in cerebrospinal fluid and the clinical course of central nervous system infection. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2014;79(2):174-7.
160. Dyachenko P, et al. Epstein-barr virus-associated encephalitis in a case-series of more than 40 patients. *Wiad Lek.* 2018;71(6):1224-30.
161. Zhang N, et al. Epstein-Barr Virus and Neurological Diseases. *Front Mol Biosci.* 2022;8:816098.
162. Zhang Y, et al. Modeling adenovirus latency in human lymphocyte cell lines. *J Virol.* 2010;84(17):8799-810.
163. Cinque P, et al. Varicella-zoster virus (VZV) DNA in cerebrospinal fluid of patients infected with human immunodeficiency virus: VZV disease of the

- central nervous system or subclinical reactivation of VZV infection? *Clin Infect Dis.* 1997;25(3):634-9.
164. De La Blanchardiere A, et al. Neurological complications of varicella-zoster virus infection in adults with human immunodeficiency virus infection. *Scand J Infect Dis.* 2000;32(3):263-9.
  165. Tansarli GS, Chapin KC. Diagnostic test accuracy of the BioFire® FilmArray® meningitis/encephalitis panel: a systematic review and meta-analysis. *Clin Microbiol Infect.* 2020;26(3):281-90.
  166. Joy BK, et al. Hunting for mpox (monkeypox) mimickers: Use of the Biofire meningitis/encephalitis panel on lesion swabs to support alternative viral diagnoses. *J Clin Virol.* 2023;159:105356.
  167. Beaman MH. Community-acquired acute meningitis and encephalitis: a narrative review. *Med J Aust.* 2018;209(10):449-54.
  168. Portilho MM, et al. Usefulness of in-house real time PCR for HBV DNA quantification in serum and oral fluid samples. *J Virol Methods.* 2018;256:100-6.
  169. Leon LL, et al. Arbovirus, herpesvirus, and enterovirus associated with neurological syndromes in adult patients of a university hospital, 2017-2018. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2021;54:e0127.
  170. Zhu Y, et al. Metagenomic next-generation sequencing vs. traditional microbiological tests for diagnosing varicella-zoster virus central nervous system infection. *Front Public Health.* 2022;9:738412.
  171. Xing XW, et al. Evaluation of next-generation sequencing for the diagnosis of infections of the central nervous system caused by the neurotropic herpes viruses: a pilot study. *Eur Neurol.* 2018;80(5-6):283-8.
  172. Fang M, et al. Fulminant central nervous system varicella-zoster virus infection unexpectedly diagnosed by metagenomic next-generation sequencing in an HIV-infected patient: a case report. *BMC Infect Dis.* 2020;20(1):159.
  173. Hong NTT, et al. Performance of metagenomic next-generation sequencing for the diagnosis of viral meningoencephalitis in a resource-limited setting. *Open Forum Infect Dis.* 2020;7(3):ofaa046.
  174. Perlejewski K, et al. Next-generation sequencing in the diagnosis of viral encephalitis: sensitivity and clinical limitations. *Sci Rep.* 2020;10(1):16173.

**ANEXO A - Sequências protótipos de VZV, as respectivas ORFs à quais foram alinhadas, autor, ano de deposição da sequência no GenBank, região geográfica de obtenção e o tipo de amostra biológica utilizada**

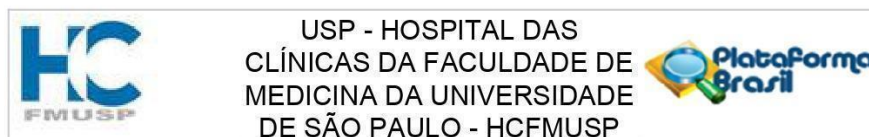
SEQUÊNCIA REFERÊNCIA	ORF 22	ORF 38	ORF 54	ORF 62	AUTOR	ANO	LOCAL	AMOSTRA	CLADO
AY548170.1	X	X	X	X	Santos	2000	Canadá	Cultura de isolado de lesão	1
DQ479953.1	X	X	X	X	Peters	2006	Canadá	Cultura de isolado de lesão	1
DQ479954.1	X	X		X	Peters	2006	Canadá	Cultura de isolado de lesão	1
DQ479961.1	X	X	X	X	Peters	2006	Canadá	Cultura de isolado de lesão	1
DQ479962.1	X	X	X	X	Peters	2006	Canadá	Cultura de isolado de lesão	1
DQ674250.1	X	X	X	X	Loparev	2006	NI	NI	1
EU154348.1	X	X	X	X	Loparev	2009	Norte e sul da Europa	Cultura de lesão e raspado de lesão	1
JN704693.1	X	X	X	X	Zell	2012	Alemanha	Isolado vacinal e lesão cutânea	1
KP771918.1	X	X	X	X	Norberg	2015	Suécia	Lesão cutânea	1
KX262865.1	X	X	X	X	Depledge	2016	Reino Unido	Lesão cutânea	1
KX262866.1	X	X	X	X	Depledge	2016	Reino Unido	Lesão cutânea	1
KX352184.1	X				Costa	2016	Brasil	Lesão cutânea	1 ou 3
KX352187.1		X			Costa	2016	Brasil	Lesão cutânea	1
NC_001348.1	X	X	X	X	Davison	1986	Reino Unido	DNA de plasmídeo	1
X04370.1	X	X	X	X	Davison	1986	Reino Unido	DNA de plasmídeo	1
AB097933.1	X	X	X	X	Gomi	2002	Japão	Cultura de isolado de lesão	2
DQ008354.1	X	X	X	X	Tillieux	2008	NA	Isolado vacinal	2
DQ008355.1	X	X	X	X	Tillieux	2008	NA	Isolado vacinal	2
KC847290.1	X	X	X	X	Li	NI	NI	NI	2
KU926315.1	X	X	X	X	Jeon	2016	Coreia do Sul	Cultura de isolado de lesão	2
KY037796.1	X	X	X	X	Jensen	2017	NI	NI	2
LT984493.1				X	Hübschen	2018	Laos	NI	2
LT984494.1				X	Hübschen	2018	Laos	NI	2
LT984497.1				X	Hübschen	2018	Laos	NI	2
LT984498.1				X	Hübschen	2018	Laos	NI	2
LT984499.1				X	Hübschen	2018	Laos	NI	2
LT984500.1				X	Hübschen	2018	Laos	NI	2
LT984501.1				X	Hübschen	2018	Laos	NI	2
LT984502.1				X	Hübschen	2018	Laos	NI	2
LT984508.1				X	Hübschen	2018	Laos	NI	2
MZ465817.1	X				Wei	2021	China	NI	2
MZ465876.1	X				Wei	2021	China	NI	2
MZ465891.1	X				Wei	2021	China	NI	2
MZ465905.1	X				Wei	2021	China	NI	2
AJ871403.1	X	X	X	X	Fickenscher	NI	Alemanha	NI	3
DQ479955.1	X	X	X	X	Peters	2006	Canadá	Cultura de isolado de lesão	3
JQ911599.1	X	X	X	X	Madupu	2012	EUA	NI	3
JX977134.1	X				Rodriguez-Castillo	NI	México	Lesão cutânea	3
JX977136.1	X				Rodriguez-Castillo	NI	México	Lesão cutânea	3
KP771891.1	X	X	X	X	Norberg	2015	Suécia	Lesão cutânea	3
KP771910.1	X	X	X	X	Norberg	2015	Suécia	Lesão cutânea	3
KP771916.1	X	X	X	X	Norberg	2015	Suécia	Lesão cutânea	1 ou 3
KX352173.1	X				Costa	2016	Brasil	Lesão cutânea	1 ou 3
KX352174.1	X				Costa	2016	Brasil	Lesão cutânea	1 ou 3

Legenda: \*NI = não informado

SEQUÊNCIA REFERÊNCIA	ORF 22	ORF 38	ORF 54	ORF 62	AUTOR	ANO	LOCAL	AMOSTRA	CLADO
KX352175.1	X				Costa	2016	Brasil	Lesão cutânea	1 ou 3
KX352176.1	X				Costa	2016	Brasil	Lesão cutânea	1 ou 3
KX352177.1	X				Costa	2016	Brasil	Lesão cutânea	1 ou 3
KX352178.1	X				Costa	2016	Brasil	Lesão cutânea	1 ou 3
KX352179.1	X				Costa	2016	Brasil	Lesão cutânea	1 ou 3
KX352180.1	X				Costa	2016	Brasil	Lesão cutânea	1 ou 3
KX352182.1	X				Costa	2016	Brasil	Lesão cutânea	1 ou 3
KX352185.1	X				Costa	2016	Brasil	Lesão cutânea	1 ou 3
KX352190.1		X			Costa	2016	Brasil	Lesão cutânea	1 ou 3
KX352191.1		X			Costa	2016	Brasil	Lesão cutânea	1 ou 3
KX352192.1		X			Costa	2016	Brasil	Lesão cutânea	1 ou 3
KX352193.1		X			Costa	2016	Brasil	Lesão cutânea	1 ou 3
KX352195.1		X			Costa	2016	Brasil	Lesão cutânea	1 ou 3
KX352197.1		X			Costa	2016	Brasil	Lesão cutânea	1 ou 3
KX352198.1		X			Costa	2016	Brasil	Lesão cutânea	1 ou 3
KX352199.1			X		Costa	2016	Brasil	Lesão cutânea	1 ou 3
KX352200.1			X		Costa	2016	Brasil	Lesão cutânea	1 ou 3
KX352201.1			X		Costa	2016	Brasil	Lesão cutânea	1 ou 3
KX352202.1			X		Costa	2016	Brasil	Lesão cutânea	1 ou 3
KX352203.1			X		Costa	2016	Brasil	Lesão cutânea	1 ou 3
KX352204.1			X		Costa	2016	Brasil	Lesão cutânea	1 ou 3
KX352205.1			X		Costa	2016	Brasil	Lesão cutânea	1 ou 3
KX352206.1			X		Costa	2016	Brasil	Lesão cutânea	1 ou 3
KX352208.1			X		Costa	2016	Brasil	Lesão cutânea	1 ou 3
KX352210.1			X		Costa	2016	Brasil	Lesão cutânea	1 ou 3
KX352211.1			X		Costa	2016	Brasil	Lesão cutânea	1 ou 3
DQ452050.1	X	X	X	X	Loparev	2007	NI	NI	4
KP771898.1	X	X	X	X	Norberg	2015	Suécia	Lesão cutânea	4
DQ457052.1	X	X	X	X	Loparev	2007	Canadá	Lesão cutânea	5
JN704705.1	X	X	X	X	Zell	2012	Alemanha	Isolado vacinal e lesão cutânea	5
KF130962.1	X				Sachithanandham	NI	India	NI	5
KF130963.1	X				Sachithanandham	NI	India	NI	5
KF130964.1	X				Sachithanandham	NI	India	NI	5
KF130965.1	X				Sachithanandham	NI	India	NI	5
KP771904.1	X	X	X	X	Norberg	2015	Suécia	Lesão cutânea	5
KP771906.1	X	X	X	X	Norberg	2015	Suécia	Lesão cutânea	5
KX352183.1	X				Costa	2016	Brasil	Lesão cutânea	5
KX352207.1			X		Costa	2016	Brasil	Lesão cutânea	5
KX352209.1			X		Costa	2016	Brasil	Lesão cutânea	5
MH499466.1	X	X	X	X	Yadav	2018	India	NI	5
KP771914.1	X	X	X	X	Norberg	2015	Suécia	Lesão cutânea	6
KP771890.1	X	X	X	X	Norberg	2015	Suécia	Lesão cutânea	9

Legenda: \*NI = não informado

## ANEXO B - Parecer consubstanciado da CEP – emenda de projeto



### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

#### DADOS DA EMENDA

**Título da Pesquisa:** Avaliação das características etiológicas, clínicas e epidemiológicas de casos de meningites, encefalites e meningoencefalites atendidos no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

**Pesquisador:** Maria Cassia Jacintho Mendes Correa

**Área Temática:**

**Versão:** 5

**CAAE:** 67203417.0.0000.0068

**Instituição Proponente:** Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

#### DADOS DO PARECER

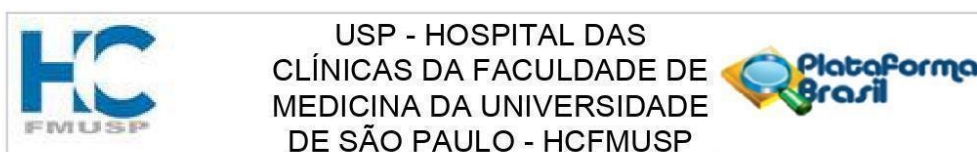
**Número do Parecer:** 4.889.673

#### Apresentação do Projeto:

Será realizada a coleta de dados através dos prontuários médicos com utilização de ficha de coleta específica (Anexo I) que avaliará as seguintes variáveis:

- 1 -Variáveis associadas ao hospedeiro: sexo, idade, peso, naturalidade, procedência, presença de comorbidades como hipertensão arterial sistêmica e diabetes mellitus, infecciosas, antecedente de outras doenças infecciosas, imunodepressão ou utilização de medicamentos imunodepressores, internação prévia, antecedentes de viagens ou outras exposições agentes infecciosos, resultados de exames imediatamente antes do início do tratamento (hemoglobina, neutrófilo, plaquetas, INR, atividade de protombina, albumina, AST, ALT, fosfatase alcalina, gama-GT e bilirrubina total), valores de creatinina, glicemia, Na/K séricos
- 2 -Variáveis associadas à doença neurológica: agente etiológico envolvido, métodos diagnósticos utilizados para diagnóstico, características do Líquor; resultados de exames de imagem, desfecho clínico
- 3 -Variáveis associadas ao tratamento: utilização de tratamento empírico ao início do atendimento; data do início e término do tratamento; duração do tratamento; medicamentos utilizados
- 4 -Variáveis associadas aos exame de LCR: celularidade, proteinorraquia; glicorraquia, gram e micológico direto; culturas para bactérias, micobactérias e fungos; pesquisa de antígeno de

**Endereço:** Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5º andar  
**Bairro:** Cerqueira Cesar **CEP:** 05.403-010  
**UF:** SP **Município:** SAO PAULO  
**Telefone:** (11)2661-7585 **Fax:** (11)2661-7585 **E-mail:** cappesq.adm@hc.fm.usp.br



Continuação do Parecer: 4.889.673

Cryptococcus neoformans por aglutinação de partículas de látex; pesquisa de VDRL (Venereal Disease Research Laboratory); pesquisa por biologia molecular de: enterovírus, parecovirus, vírus da parotidite infecciosa, Listeria, HIV, IFN A e B, JCV, BKV, VZV, CMV, EBV, HHV6, Parvovirus B19, ZIKA vírus, Chikungunya vírus e dengue HSV 1 e 2, adenovírus, Toxoplasma gondii, Angiostrongylus, esquistossoma mansoni, Candida e Histoplasma.

#### **Objetivo da Pesquisa:**

##### Objetivo Primário:

Avaliar as características etiológicas, clínicas e epidemiológicas de casos de meningites, encefalites e meningoencefalites atendidos no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

##### Objetivo Secundário:

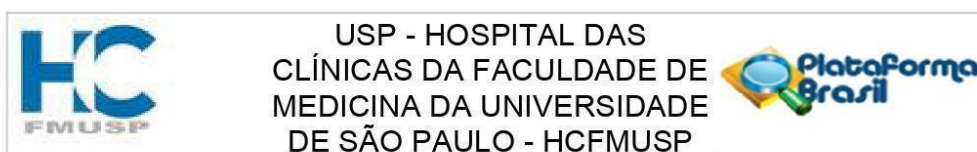
1. Determinar a etiologia infecciosa dos casos de meningites, encefalites ou meningoencefalites agudas entre os casos de pacientes atendidos no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo;
2. Avaliar as características clínicas e epidemiológicas desses casos de meningites, encefalites ou meningoencefalites agudas atendidas neste serviço;
3. Avaliar a associação das características etiológicas, clínicas e epidemiológicas com diferentes desfechos clínicos durante o seguimento e acompanhamento destes casos;
4. Estabelecer um algoritmo para o diagnóstico das meningoencefalites com base na prevalência dos diferentes agentes infecciosos identificados;
5. Caracterização molecular de isolados do VZV identificados;
6. Diferenciação entre isolado vacinal e selvagem nos indivíduos com presença de VZV em LCR;
7. Caracterização molecular dos isolados de VZV e identificação dos clados presentes;
8. Estabelecer um biorrepositório que possibilite a realização de:
  - a) futuros estudos de genética dos agentes etiológicos envolvidos e do hospedeiro;
  - b) estudos de patogênese;
  - c) avaliação de novos testes de diagnóstico e biomarcadores.

#### **Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

##### Riscos:

Os riscos associados a esta pesquisa são mínimos, uma vez que não será realizado nenhum novo procedimento ou coleta, além das coletas e procedimentos já previstos em seu atendimento de

**Endereço:** Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5º andar  
**Bairro:** Cerqueira Cesar **CEP:** 05.403-010  
**UF:** SP **Município:** SAO PAULO  
**Telefone:** (11)2661-7585 **Fax:** (11)2661-7585 **E-mail:** cappelq.adm@hc.fm.usp.br



Continuação do Parecer: 4.889.673

rotina. A única novidade em relação a seu atendimento será a aplicação de um questionário e a utilização de informações de seu prontuário.

**Benefícios:**

Poderá ter um benefício direto dessa pesquisa no seu atendimento, caso algum dos agentes investigados através dessa pesquisa, seja o responsável pela doença que nesse momento acomete você. Ou poderá não ter nenhum benefício direto, caso o agente seja identificado através de outras formas ou caso nenhum agente seja identificado, fato que eventualmente poderá ocorrer. Mas, certamente sua participação ajudará para o

avanço do conhecimento científico nesta área.

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

Trata-se de emenda solicitando análise aprofundada dos dados já coletados no estudo principal, que será realizada no âmbito da pós graduação, desenvolvida por um aluno do programa de mestrado em Doenças Infecciosas e Parasitárias da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Inclusive já consta no projeto inicial o estabelecimento de biorrepositório para estudos futuros, o que traduz na não necessidade de contatar os participantes do estudo para aplicação de novo TCLE.

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Os termos de apresentação obrigatória estão claros e bem definidos, incluindo os da emenda apresentada para análise dos dados já coletados.

**Recomendações:**

Não há recomendações.

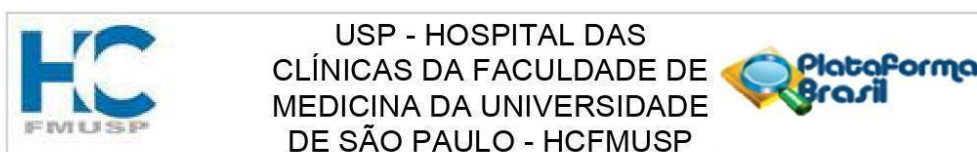
**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Estamos cientes e de acordo com o objetivo da emenda para a realização de exames adicionais no material já analisado no projeto original.

. O objetivo da atual emenda é obter autorização para o aprofundamento da caracterização molecular de isolados do varicela-zoster (VZV), já identificados em amostras de LCR já coletadas no estudo principal. Essa nova análise deverá diferenciar a presença de isolado vacinal ou selvagem do VZV, assim como identificar os diferentes clados virais, nas amostras já coletadas e analisadas. Tal análise servirá de base para o desenvolvimento da dissertação de mestrado do aluno Heuder Gustavo Oliveira Paião. O título proposto para a referida dissertação é: "Caracterização molecular de isolados do vírus Varicela Zoster em amostras de líquido cefalorraquidiano de pacientes com quadro de meningite, encefalite ou meningoencefalite aguda".

**Endereço:** Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5º andar  
**Bairro:** Cerqueira Cesar **CEP:** 05.403-010  
**UF:** SP **Município:** SAO PAULO  
**Telefone:** (11)2661-7585 **Fax:** (11)2661-7585 **E-mail:** cappesq.adm@hc.fm.usp.br





Continuação do Parecer: 4.889.673

O pesquisador responsável apresentou também o relatório final do projeto principal, do qual estamos cientes. O relatório apresenta elementos que permitem a identificação e a compreensão dos achados principais do estudo.

**Considerações Finais a critério do CEP:**

**Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:**

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_1797570 E4.pdf	22/07/2021 18:31:18		Aceito
Outros	FORMULARIOPARASUBMISSAODEEMENDAS.pdf	22/07/2021 18:28:04	Maria Cassia Jacintho Mendes Correa	Aceito
Outros	RelatorioFinal.docx	22/07/2021 18:26:44	Maria Cassia Jacintho Mendes Correa	Aceito
Outros	PROJETOALUNO.docx	22/07/2021 18:25:41	Maria Cassia Jacintho Mendes Correa	Aceito
Solicitação Assinada pelo Pesquisador Responsável	SolicitacaoJustificativaemenda.pdf	22/07/2021 18:24:29	Maria Cassia Jacintho Mendes Correa	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	ProjetoCOMMARCACOESGRIFADAS.docx	22/07/2021 18:22:17	Maria Cassia Jacintho Mendes Correa	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_emendadob.doc	22/07/2021 18:20:33	Maria Cassia Jacintho Mendes Correa	Aceito
Folha de Rosto	Folha_meningites.pdf	18/04/2017 11:42:55	Maria Cassia Jacintho Mendes Correa	Aceito

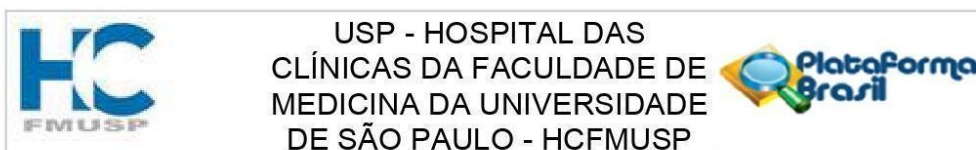
**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

**Endereço:** Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5º andar  
**Bairro:** Cerqueira Cesar **CEP:** 05.403-010  
**UF:** SP **Município:** SAO PAULO  
**Telefone:** (11)2661-7585 **Fax:** (11)2661-7585 **E-mail:** cappesq.adm@hc.fm.usp.br



Continuação do Parecer: 4.889.673

SAO PAULO, 06 de Agosto de 2021

---

**Assinado por:**  
**ALFREDO JOSE MANSUR**  
**(Coordenador(a))**

**Endereço:** Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5º andar  
**Bairro:** Cerqueira Cesar      **CEP:** 05.403-010  
**UF:** SP      **Município:** SAO PAULO  
**Telefone:** (11)2661-7585      **Fax:** (11)2661-7585      **E-mail:** cappesq.adm@hc.fm.usp.br

**ANEXO C - Cobertura genômica das sequências compatíveis com VZV obtidas por SMP compreendendo regiões não contínuas do genoma viral**

<b>Nucleotídeo inicial</b>	<b>Nucleotídeo final</b>	<b>Nucleotídeo inicial</b>	<b>Nucleotídeo final</b>
1469	1709	75591	75781
3616	3866	77487	77562
5820	6064	79465	79715
7574	7747	81846	82030
10826	10942	82144	82345
11056	11160	83139	83380
11387	11600	85668	85917
12499	12600	88646	88714
14166	14464	90942	91165
15028	15226	91599	91919
16677	16927	92177	92380
16944	17126	93545	93930
34958	35207	93531	95694
37731	37981	97738	97974
38012	38334	98863	99284
42924	43241	101038	101264
48288	48448	101302	101463
48815	48873	104375	104554
50195	50440	105543	105754
55860	56207	105936	106252
58117	58356	106243	106473
59045	59294	106489	106591
61276	61508	106951	107286
63368	63618	107409	107763
63998	64239	107915	108338
66717	66909	108799	109048
67889	68085	110484	110667
72320	72588	110789	111245
72933	73152	117043	117292
73701	74302	118974	119224
74975	75495		

Legenda: \*Posições nucleotídicas determinadas a partir de alinhamento com a sequência “estirpe Dumas” (código de acesso X04370.1)