



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ  
NÚCLEO DE MEDICINA TROPICAL E  
ESPECIALIZAÇÃO**

**CARACTERIZAÇÃO GENOTÍPICA DO VÍRUS VARICELA-ZOSTER EM CASOS DE  
VARICELA E HERPES ZOSTER EM BELÉM-PARÁ, BRASIL.**

**MARCOS ROGÉRIO MENEZES DA COSTA**

**Belém-Pará  
2013.**

**MARCOS ROGÉRIO MENEZES DA COSTA**

**CARACTERIZAÇÃO GENOTÍPICA DO VÍRUS VARICELA-ZOSTER EM CASOS DE  
VARICELA E HERPES ZOSTER EM BELÉM-PARÁ, BRASIL.**

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Doenças Tropicais do Núcleo de Medicina Tropical da Universidade Federal do Pará como requisito para obtenção do grau de Doutor em Doenças Tropicais.

**Orientador (a):** Dra. Rita Catarina Medeiros de Sousa

**Belém-Pará  
2013.**

Costa, Marcos Rogério Menezes da

Caracterização genotípica do Vírus Varicela-zoster em casos de varicela e herpes zoster em Belém-Pará, Brasil, 2013/Marcos Rogério Menezes da Costa. Belém: Universidade Federal do Pará, 2013.

87f.: il.; 30 cm

Tese (Doutorado de Patologia das Doenças Tropicais)

- Núcleo de Medicina de Doenças Tropicais, Universidade Federal do Pará, Belém, 2013.

1.Vírus Varicela-zoster 2. Varicela e herpes zoster 3. Anticorpos IgG e IgM 4.Genótipos 1 a 5.

I. Universidade Federal do Pará. II.Núcleo de Medicina de Doenças Tropicais. III.Título.

**MARCOS ROGÉRIO MENEZES DA COSTA****CARACTERIZAÇÃO GENOTÍPICA DO VÍRUS VARICELA-ZOSTER EM CASOS DE VARICELA E HERPES ZOSTER, EM BELÉM-PARÁ, BRASIL.**

Tese apresentada para obtenção do título de Doutor em Doenças Tropicais pelo Núcleo de Medicina Tropical da Saúde da Universidade Federal do Pará.

Banca examinadora:

---

Membro: Prof. Dra. Rita Catarina Medeiros de Sousa - Orientadora  
Instituição: Universidade Federal do Pará

---

Membro: Prof. Dra. Máisa de Sousa - Avaliadora  
Instituição: Universidade Federal do Pará

---

Membro: Prof. Dra. Rosa Helena Porto Gusmão - Avaliadora  
Instituição: Universidade do Estado do Pará

---

Membro: Prof. Dr. Fernando Tavares - Avaliador  
Instituição: Instituto Evandro Chagas, SVS, MS

---

Membro: Prof. Dra. Daniele Barbosa de Almeida Medeiros - Avaliadora  
Instituição: Instituto Evandro Chagas, SVS, MS

---

Membro: Prof. Dr. Márcio Roberto Teixeira Nunes – Avaliador (Suplente)  
Instituição: Instituto Evandro Chagas, SVS, MS

Aprovado em: \_\_\_ / \_\_\_ / \_\_\_\_\_

Conceito: \_\_\_\_\_

**Belém – Pará  
2013**

“Só existem dois dias no ano que nada pode ser feito. Um se chama ontem e o outro se chama amanhã, portanto hoje é o dia certo para amar, acreditar, fazer e principalmente viver.”

Tenzin Gyatso, o 14º Dalai Lama

A Deus, pai e criador;  
Aos meus pais, Carlos e Erinete, meus fãs e heróis;  
Aos meus irmãos, grandes companheiros;  
À minha esposa e meus filhos.

## AGRADECIMENTOS

É com satisfação que expresso meus sinceros agradecimentos à **Profa. Dra. Rita Catarina Medeiros de Sousa**, que além de orientadora é uma grande amiga que, com conhecimento, tranquilidade e serenidade, conduziu-me neste trabalho.

À minha co-orientadora **Dra. Talita Antônia Furtado Monteiro**, que me recebeu como um filho incentivando-me com sábias palavras, conselhos e conhecimento desde a iniciação científica até hoje.

À diretora do Instituto Evandro Chagas **Dra. Elisabeth Conceição de Oliveira Santos**, que contribuiu com a estrutura e apoio técnico para realização desta pesquisa.

Ao **Prof. Dr. Francisco Lúzio de Paula Ramos, Dra. Consuelo Silva de Oliveira, Ana Yecê das Neves Pinto e a todos do Serviço de Atendimento Médico Unificado do IEC**, que dedicaram seu tempo e seus conhecimentos, auxiliando-me no andamento deste trabalho.

Ao **Dr. Alexandre da Costa Linhares, Dra. Joana D'Arc Pereira Mascarenhas, Dra. Maria de Lourdes Contente Gomes, Dra. Olinda Macêdo, Dr. Wyller Alencar de Melo, Dr. Ronaldo Barros de Freitas, Dra. Ivone Benchimol Gabbay**, e todos da Seção de Virologia do Instituto Evandro Chagas pelas informações, análises, apoio técnico e estrutural, além das sugestões referendadas neste trabalho.

À **Dra. Daniele Barbosa de Almeida Medeiros**, grande amiga que sempre com atenção e solidariedade contribui muito com seu conhecimento em minha graduação, mestrado e de maneira fundamental na elaboração deste projeto.

À amiga **Msc. Jane Haruko Lima Kaiano**, que com sua dedicação e capacidade, participou de forma primordial para o sucesso dos testes de biologia molecular deste trabalho.

À amiga **Msc. Darleise de Souza Oliveira**, que com seu conhecimento e serenidade, contribuiu muito para a análise filogenética e dos resultados deste trabalho.

Aos amigos **Alessandra Polaro, Antonio de Moura, Akim Felipe Nobre, Igor Brasil Costa e Wellington Trindade de Souza**, e a todos do laboratório de EBV, que sempre se disponibilizaram e foram fundamentais nas etapas de coleta, processamento e análise do material desta pesquisa.

A todos os **pacientes atendidos no SAMU do IEC**, que concordaram em colaborar para a realização deste trabalho.

Ao **Prof. Dr. Antonio Carlos R. Vallinoto**, e todos que fizeram parte de minha dissertação de mestrado, pela dedicação e conhecimento compartilhado, que contribuiu para o desenvolvimento deste estudo.

A todos os professores e funcionários do Programa de Pós-graduação em Doenças Tropicais, do Núcleo de Medicina Tropical, Universidade Federal do Pará, pelo suporte dispensado durante o curso.

Ao **CNPQ** pelo suporte financeiro concedido por meio de financiamento do projeto e bolsa de doutorado.

À **Universidade Federal do Pará** pelo apoio prestado à realização deste trabalho.

## SUMÁRIO

LISTA DE ILUSTRAÇÕES.....	viii
LISTA DE QUADROS E TABELAS.....	ix
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS.....	x
RESUMO.....	xii
ABSTRACT.....	xiii
<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
<b>2 JUSTIFICATIVA.....</b>	<b>3</b>
<b>3 REFERENCIAL TEÓRICO.....</b>	<b>4</b>
3.1 BREVE HISTÓRICO.....	4
3.2 O VÍRUS VARICELA-ZOSTER.....	4
<b>3.2.1 Classificação viral.....</b>	<b>4</b>
<b>3.2.2 Morfologia viral.....</b>	<b>6</b>
<b>3.2.3 Organização genômica.....</b>	<b>6</b>
3.3 REPLICAÇÃO VIRAL.....	10
<b>3.3.1 Os genes e suas funções.....</b>	<b>10</b>
3.4 ESTÁGIOS DE REPLICAÇÃO.....	13
3.5 PATOGÊNESE E PATOLOGIA.....	15
3.6 EPIDEMIOLOGIA.....	18
<b>3.6.1 Epidemiologia dos genótipos do VVZ.....</b>	<b>20</b>
3.7 IMUNIDADE.....	22
3.8 TRANSMISSÃO.....	24
3.9 TRATAMENTO.....	25
3.10 DIAGNÓSTICO.....	25

3.11	VACINAS.....	26
<b>4</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>29</b>
4.1	OBJETIVO GERAL.....	29
4.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	29
<b>5</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>30</b>
5.1	MATERIAL.....	30
5.1.1	Área de estudo.....	30
5.1.2	População de estudo.....	30
5.2	MÉTODOS.....	31
5.2.1	Identificação, Processamento e Armazenamento das Amostras.....	31
5.2.2	Sorologia.....	31
5.2.2.1	Detecção de Anticorpos IgG e IgM para o Vírus Varicela-zoster.....	31
5.3	BIOLOGIA MOLECULAR.....	32
5.3.1	Amplificação do DNA Viral por Reação em Cadeia da Polimerase.....	32
5.3.2	Eletroforese em gel de agarose.....	33
5.3.3	Purificação do produto da PCR.....	34
5.3.4	Sequenciamento de Nucleotídeos.....	35
5.3.5	Alinhamento das Sequências Nucleotídicas.....	35
5.3.6	Análise Filogenética.....	36
<b>6</b>	<b>MÉTODOS ESTATÍSTICOS.....</b>	<b>37</b>
<b>7</b>	<b>ASPECTOS ÉTICOS E DE BIOSSEGURANÇA.....</b>	<b>38</b>
<b>8</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>39</b>
8.1	FREQUÊNCIA DE ANTICORPOS IgG E IgM ANTI-VVZ QUANTO AO SEXO E FAIXA ETÁRIA EM CASOS DE VARICELA.....	39

8.2	FREQUÊNCIA DE ANTICORPOS IgG E IgM ANTI-VVZ QUANTO AO SEXO E FAIXA ETÁRIA EM CASOS DE HERPES ZOSTER.....	41
8.3	SEQUÊNCIAS NUCLEOTÍDICAS ESPECÍFICAS UTILIZADAS PARA GENOTIPAGEM DO VVZ.....	43
8.4	CLASSIFICAÇÃO GENOTÍPICA E IDENTIFICAÇÃO DAS CEPAS.....	46
<b>9</b>	<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>48</b>
<b>10</b>	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>55</b>
	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>56</b>
	<b>ANEXOS .....</b>	<b>67</b>

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1</b> Proposta de um novo sistema para nomenclatura do VVZ, adotada em 25 de Julho de 2008, Londres, Reino Unido.....	<b>5</b>
<b>Figura 2</b> Componentes da partícula viral do VVZ.....	<b>6</b>
<b>Figura 3</b> Representação esquemática do genoma do VVZ mostrando as ORFs.....	<b>8</b>
<b>Figura 4</b> Resumo das funções de replicação realizados pelos produtos dos genes VVZ.....	<b>14</b>
<b>Figura 5</b> Análise de variação genotípica utilizando dados de três ORFs do VVZ...	<b>44</b>
<b>Figura 6</b> Análise de variação genotípica utilizando dados da ORF22 para discriminar os genótipos das amostras de VVZ deste estudo.....	<b>45</b>
<b>Figura 7</b> Análise filogenética utilizando o método de agrupamento de vizinhos ( <i>Neighbour-joining</i> - NJ) baseada no polimorfismo nucleotídico da ORF22 (447 pb) envolvendo 13 amostras dos municípios de Belém, Ananindeua e Marituba.....	<b>47</b>

**LISTA DE QUADROS E TABELAS**

<b>Quadro 1</b>	Nomenclatura genotípica do VVZ utilizada atualmente.....	10
<b>Quadro 2</b>	Descrição dos produtos virais e funções conhecidas dos genes do VVZ.....	11
<b>Quadro 3</b>	Iniciadores utilizados na PCR para amplificação de seqüências das ORFs: 22, 38 e 54 do VVZ.....	32
<b>Tabela 1</b>	Prevalência de anticorpos IgG para o VVZ quanto ao sexo.....	39
<b>Tabela 2</b>	Distribuição por faixa etária de anticorpos IgG para o VVZ.....	40
<b>Tabela 3</b>	Prevalência de anticorpos IgM para o VVZ quanto ao sexo.....	40
<b>Tabela 4</b>	Distribuição por faixa etária de anticorpos IgM para o VVZ.....	41
<b>Tabela 5</b>	Prevalência de anticorpos IgG para o VVZ quanto ao sexo.....	41
<b>Tabela 6</b>	Distribuição por faixa etária de anticorpos IgG para o VVZ.....	42
<b>Tabela 7</b>	Prevalência de anticorpos IgM para o VVZ quanto ao sexo.....	42
<b>Tabela 8</b>	Distribuição por faixa etária de anticorpos IgM para o VVZ.....	43
<b>Tabela 9</b>	Descrição dos genótipos segundo a Conferência de Londres/2008.....	46

## LISTA DE ABREVIATURAS

VVZ – Vírus varicela-zoster

ORF – região de Leitura Aberta

SNP – polimorfismos nucleotídicos únicos

PCR – reação em cadeia da polimerase

DNA – ácido desoxiribunucleíco

IgG – imunogloblina G

IgM – imunoglobulina M

A – adenosina

C – citosina

G – guanina

T – timina

% - porcentagem

nm- nanômetros

Kb – quilobases

Km<sup>2</sup> – quilômetros quadrados

°C – graus centígrados

RPM – Rotações por minuto

g - Gravidade

µl – microlitros

ml – mililitros

µm – micromol

V – Volts

mA – mili-Âmperes

nt - Nucleotídeo

pb – pares de base

vOka – cepa vacinal Oka

ELISA – imunoensaio enzimático

## RESUMO

O vírus Varicela-zoster (VVZ) pode causar varicela durante a infecção primária, estabelecendo posteriormente uma infecção latente. Na ocorrência de reativação do vírus, pode surgir o herpes zoster. A análise da presença de anticorpos IgG e IgM é fundamental para verificar a prevalência deste vírus na Região Metropolitana de Belém. O estudo de polimorfismos nucleotídicos específicos é utilizado para definir os genótipos do VVZ. A análise das ORFs 22, 38 e 54 permitiu identificar os genótipos do VVZ de acordo com a classificação estabelecida na conferência de 25 de julho de 2008 em Whitechapel, Londres/Reino Unido, em que as cepas de VVZ detectadas e caracterizadas por sequenciamento dos SNPs foram agrupadas em classes de 1 a 5. Avaliar a prevalência de anticorpos e descrever os genótipos circulantes foi o objetivo deste estudo. A frequência de anticorpos IgG e IgM nos casos de varicela foi 68,2% e 48,2%, respectivamente. Os casos de herpes zoster apresentaram prevalência de anti-VVZ IgG e IgM de 87,5% e 12,5%, respectivamente. Os genótipos 1 ou 3 e 5 estavam presentes nas 13 amostras sequenciadas, sendo que a cepa Européia (classe 1 ou 3) foi encontrada em amostras de todos os municípios estudados. A identificação das cepas VVZ circulantes é de extrema importância em virtude da associação de determinados genótipos a quadros clínicos mais severos e para avaliar a implantação da vacina no Programa Nacional de Imunização.

**Palavras-chaves:** *Vírus Varicela-zoster*. DNA. Varicela e herpes zoster. Genótipos

## ABSTRACT

Varicella zoster virus (VZV) can cause chickenpox during primary infection, subsequently establishing a latent infection. In case of reactivation of the virus, the herpes zoster may occur. Analysis of the presence of IgG and IgM is critical to determine the prevalence of this virus in the Metropolitan Region of Belém. The study of specific nucleotide polymorphisms is used to define the genotypes of VZV. Analysis of ORFs 22, 38 and 54 identified genotypes of VZV according to the classification established in conference July 25, 2008 in Whitechapel, London / UK, where the strains of VZV detected and characterized by sequencing of SNPs were grouped into classes 1 through 5. To evaluate the prevalence of antibodies and describe the circulating genotypes was the aim of this study. The frequency of IgM and IgG antibodies in cases of chickenpox was 68.2% and 48.2%, respectively. Cases of herpes zoster showed prevalence of anti-VZV IgG and IgM of 87.5% and 12.5%, respectively. The genotypes 1 or 3 and 5 were present in 13 samples sequenced, and the European strain (class 1 or 3) was found in samples from all the cities studied. The identification of strains circulating VZV is extremely important because of the association of specific genotypes with clinical harshest and to assess the implementation of the vaccine in the National Immunization Program.

**Key words:** *Varicella-zoster virus*. DNA. Varicella and herpes zoster. Genotypes

## 1. INTRODUÇÃO

O Vírus Varicela-zoster (VVZ) é um Herpesvirus humano que pode causar varicela (catapora) durante a infecção primária, estabelecendo posteriormente uma infecção latente. Em diversas situações em que ocorre um declínio da imunidade celular específica contra o VVZ, pode ocorrer reativação da replicação viral, com possibilidade de manifestação clínica através do herpes zoster (HOPE-SIMPSON, 1965). Aproximadamente 15% da população apresentam reativação do VVZ durante a vida (HAMBLETON & GERSHON, 2005).

A varicela é uma doença comum na infância e tem distribuição universal. A maioria dos casos ocorre em menores de 15 anos de idade e praticamente todos os adultos já foram infectados pelo VVZ (CDC – CENTERS DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 1999; ROUSH et al., 2008). Embora considerada autolimitada, complicações como infecções bacterianas secundárias, pneumonia, meningite e encefalite podem ocorrer, muitas vezes com necessidade de hospitalização e potencial evolução para óbito (HENNINGER & SEWARD, 2006). Em muitos países, 2% a 4% das crianças são hospitalizadas por complicações da varicela. A mortalidade em crianças está em torno de 0,00 - 0,05 mortes por 100.000 casos de catapora, principalmente em casos de infecção primária (SENGUPTA et al., 2008). Devido ao elevado contágio, a varicela está associada a absenteísmo escolar da criança doente, o que implica frequentemente na perda de dias de trabalho e de produtividade de pais e cuidadores (CDC – CENTERS DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 1999). A vacina contra varicela, constituída de vírus vivo atenuado, está disponível desde a

década de 70, quando foi desenvolvida no Japão (TAKAHASHI et al., 1974; TAKAHASHI et al., 2008). A vacina tem alta eficácia (85% na prevenção contra a varicela e 95% de prevenção contra doença grave) e é bastante segura e bem tolerada por crianças saudáveis. Eventos adversos sérios são raros e ocorrem na maioria dos casos em imunodeprimidos (HAMBLETON & GERSHON et al., 2005).

Em 1986 o genoma do VVZ foi totalmente seqüenciado (DAVISON & SCOTT, 1986). Em 2008 foi realizada a conferência de Londres que definiu uma nomenclatura comum para a classificação genotípica do vírus (BREUER et al., 2010).

## 2. JUSTIFICATIVA

Dados referentes à genotipagem do VVZ são fornecidos a partir de pesquisas em vários países. A padronização de uma nomenclatura oficial, que deve ser adotada por todos, facilita o intercâmbio de informações, além de permitir melhorias nos programas de vacinação pelo conhecimento de outras cepas causadoras de surtos e de cepas ainda desconhecidas (BREUER et al., 2010).

No Brasil, a maioria dos estudos envolvendo varicela e herpes-zoster considera apenas os aspectos sintomatológicos (CARVALHO & MARTINS, 1999; CLEMENS et al., 1999; SES/CVE-SP, 2003; YU et al., 2001; BALDACCI & VICO, 2001). No início da década de 90, a varicela foi considerada a principal causa de morte dentre todas as doenças preveníveis por vacinas nos Estados Unidos (EUA), Canadá, Alemanha e Reino Unido (CDC – CENTERS DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 1999; NACI, 2002; BRISSON Et al., 2001; ZIEBOLD et al., 2001; RAWSON et al., 2001). Além disso, poucos estudos tratam da identificação molecular de cepas de VVZ no Brasil, não existindo nenhum trabalho desse nível na região Norte.

Desta forma, esta investigação permitirá o conhecimento de cepas circulantes do VVZ em Belém-Pará, Brasil e disponibilizará informações importantes, tais como o tempo que determinada cepa circula na região e que tipo de cepa está presente em determinada faixa etária ou associada à determinada patologia, que poderão servir de subsídio para sua associação com a varicela e herpes-zoster e inclusão da vacina no Programa Nacional Imunização.

### 3. REFERENCIAL TEÓRICO

#### 3.1. BREVE HISTÓRICO

A varicela foi originalmente descrita por Fernel, em 1538. Herbeden estabeleceu as diferenças entre varicela e outras doenças eruptivas em 1867. A palavra varicela tem origem latina e significa “varíola leve” e catapora tem origem na língua tupi (“tatapor”) e significa “fogo que salta” (GORDON, 1962). Em 1892, Von Bokay levantou a hipótese de que a varicela e o zoster seriam causados pelo mesmo agente e, em 1925, essa hipótese foi confirmada por Kundratitz, que inoculou o conteúdo das vesículas de pessoas com zoster em indivíduos que não haviam tido varicela e verificou que estes desenvolveram varicela e não herpes zoster (GERSHON et al., 1978).

O VVZ foi isolado em cultura de amostras do líquido vesicular de pacientes com varicela em 1952, porém devido às dificuldades para o cultivo, somente em 1974, na Universidade de Osaka, conseguiu-se desenvolver a vacina de vírus vivos atenuados (TAKAHASHI et al., 1974) .

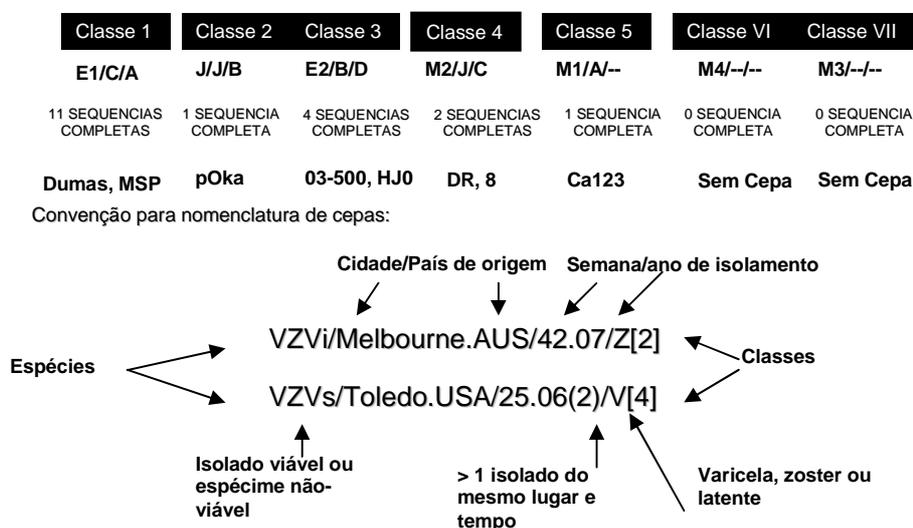
#### 3.2. O VÍRUS VARICELA-ZOSTER

##### 3.2.1. Classificação viral

A VVZ é um herpesvírus da subfamília *Alphaherpesvirinae*, gênero *Varicellovirus*, cuja característica mais marcante é a capacidade de estabelecer latência. Recentemente, foi estabelecida uma definição quanto à nomenclatura dos

genótipos do VVZ a partir de quatro princípios: uma nova nomenclatura diferente das três anteriormente estabelecidas; a estrutura filogenética das linhagens do VVZ; a ordem em que as sequências completas do genoma foram publicadas ou inseridas nos bancos de dados; e a descrição da procedência das cepas (BREUER et al., 2010).

A **figura 1** mostra um resumo de como funciona a definição das classes genotípicas do VVZ. Os grandes grupos realizados são designados como classes, a origem geográfica e temporal do vírus deve ser identificada; as classes são estabelecidas por algarismos arábicos; classes provisórias são designadas por algarismos romanos. As cepas de referência para cada classe são indicadas em **negrito**; cepas adicionais de referência são necessárias para as classes 2, 5, VI e VII.

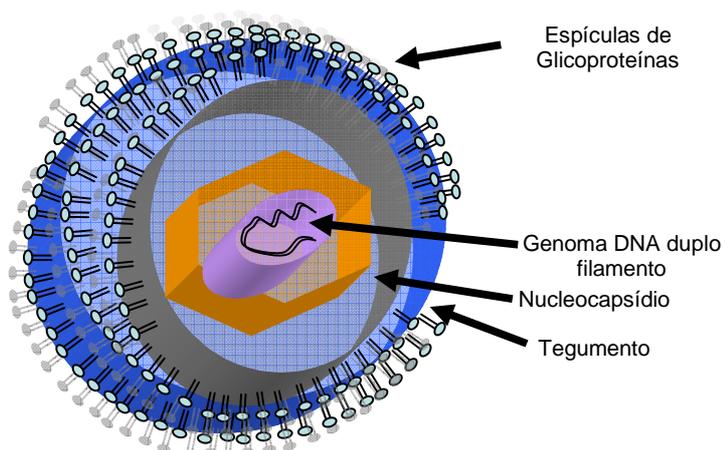


**Figura 1:** Proposta de um novo sistema para nomenclatura do VVZ, adotada em 25 de Julho de 2008, Londres, Reino Unido.

Adaptado de Breuer et al., 2010.

### 3.2.2. Morfologia viral

A partícula intacta do VVZ mede de 180–200 nm de diâmetro com seu genoma linear de dupla fita de DNA que está contido em um cerne de 75 nm dentro de um nucleocapsídeo (**Figura 2**). Um tegumento protéico separa o capsídeo do envelope lipídico, que é composto pela maioria das glicoproteínas virais (DAVISON & SCOTT, 1986).



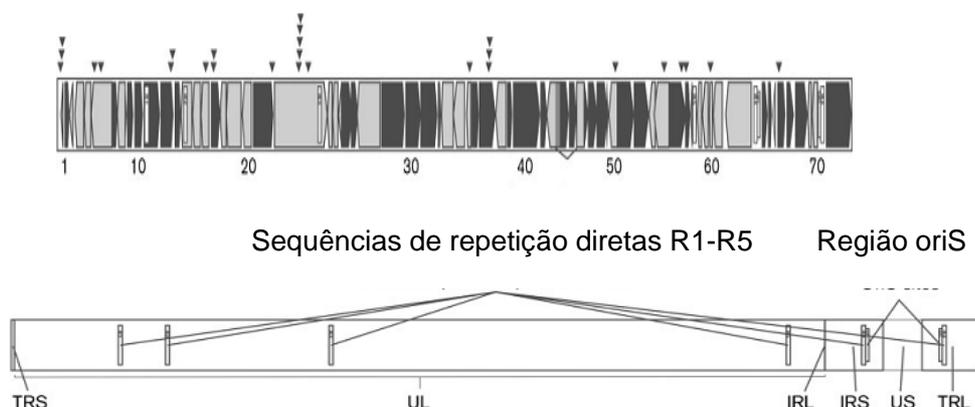
**Figura 2:** Componentes da partícula viral do VVZ.

Adaptado de Davison & Scott, 1986 (modificada).

### 3.2.3 Organização genômica

O genoma do VVZ foi um dos primeiros genomas herpesvírus humano a ser totalmente seqüenciado, o que foi feito na RMC Virology Unit, Glasgow, Reino Unido (DAVISON & SCOTT, 1986). A cepa Dumas, que foi originalmente

isolada de um paciente com varicela na Holanda tem um genoma de aproximadamente 125 kb de comprimento. Os fragmentos de leitura aberta (ORFs) numerados de 0-71 foram identificados, dos quais 69 são originais e três são duplicados (**Figura 3**). Tal como outros Herpesvirus, o VVZ tem regiões únicas longas e curtas, uma região de repetição terminal (TR) e outra invertida (IR), dentro das quais se encontram os genes duplicados. Genomas de diversas cepas do VVZ diferem em tamanho por até 500 pares de bases; tais diferenças são devidas à variação no comprimento das cinco regiões de repetição em *tandem* (R1-R5) e da origem de replicação viral oriS (TYLER et al., 2007). R1, R2 e R3 recaem sobre ORFs 11, 14 e 22, respectivamente, e estão incluídos nas regiões de codificação desses genes (DAVISON & SCOTT, 1986). R4, R5 e a origem da replicação oriS recaem em regiões não codificantes. R4 e oriS são duplicadas, ocorrendo entre as ORFs 62 e 63 e entre ORF 70 e 71 (GOMI et al., 2002).



**Figura 3:** Representação esquemática do genoma do VVZ mostrando as ORFs.

ORFs numeradas da esquerda para direita. ↓ Indica a posição dos polimorfismos nucleotídicos únicos (SNPs) úteis na genotipagem de cepas. As formas em preto representam ORFs que são transcritas no final do ciclo replicativo do VVZ. IR: repetição invertida; TR: repetição terminal; UL: região única longa; US: região única curta.

Adaptado de Breuer et al., 2010.

Nas décadas de 80 e 90 a genotipagem do VVZ foi realizada principalmente por análise de polimorfismo através de endonucleases de restrição (RFLP). Entretanto, foi o desenvolvimento de ferramentas de tipagem de SNP, que conduziu a uma melhor compreensão da epidemiologia molecular e evolução do VVZ. SNPs são regiões que contêm variações únicas de pares de bases (COLLINS, 1997). No caso do VVZ, a partir de 2000, suas SNPs foram caracterizadas a partir de metodologias de genotipagem publicados por dois grupos, um norte americano e outro inglês (BARRETT-MUIR et al, 2001;. FAGA et al, 2001;. LOPAREV et al, 2004;. MUIR et al., 2002).

As três metodologias de SNP baseadas em genotipagem diferem em suas abordagens. O método de SNP disperso, desenvolvido pelo Grupo de Breuer, no Reino Unido, baseia-se em ensaios de mobilidade heteroduplex para identificar 92 polimorfismos em 37 ORFs distribuídos uniformemente pelo genoma do VVZ. Este grupo de pesquisa identificou três genótipos filogeneticamente distintos circulando no Reino Unido e um quarto no Japão (BREUER et al., 2010; BARRETT-MUIR et al, 2001; MUIR et al, 2002).

O grupo norte americano (de Iowa), liderada por Grose, seqüenciou cinco genes de glicoproteínas, dentre estes a ORF que codifica a maior proteína de transativação imediata (IE62). Sessenta e um polimorfismos, 21 nas glicoproteínas e 40 na ORF 62, foram identificados (FAGA et al., 2001). A análise filogenética dessas regiões identificou quatro classes (PETERS et al., 2006).

Um terceiro grupo de pesquisa, liderado por Schmid no CDC, localizou um fragmento de 447 pb na ORF 22, região denominada de “*up stream*” C-terminal, o qual foi suficientemente polimórfico para permitir a identificação de quatro subtipos virais (LOPAREV et al., 2004). O uso das endonucleases de restrição *PstI* e *BglI*, permitiu identificar os sítios de clivagem para estas enzimas na ORF 38 e ORF 54, respectivamente. Em 2007, a análise destas três ORFs permitiu a classificação dos genótipos do VVZ por distribuição geográfica em: E-Europeu, J-Japonês e M- Mosaico (KOSKINIEMI et al., 2007).

Ao todo, esses três grupos de pesquisa identificaram cinco subtipos virais distintos, embora nenhum grupo tenha identificado todos os cinco. De acordo com a conferência de 25 de julho de 2008 em Whitechapel, Londres/Reino Unido, as cepas de VVZ detectadas e caracterizadas por sequenciamento dos SNPs seriam agrupadas em

classes de 1 a 5, em substituição aos genótipos preconizados na classificação do CDC (BREUER et al., 2010). As diferentes nomenclaturas utilizadas por cada grupo são apresentados no **Quadro 1**.

Nomenclatura	Baseado em:	Protótipo de cepas no <i>Genbank</i>				
		Dumas	pOka	11	8,DR	CA123
Iowa-Canadá	Glicoproteínas	A	B	D	C	-
Reino Unido	SNPs dispersos	C	J	B	A2/J2	A
CDC	ORF22	E1	J	E2	M2	M1
<b>Nova</b>	<b>Genoma completo</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>

**Quadro 1.** Nomenclatura genotípica do VVZ utilizada atualmente.

Adaptado de Breuer et al., 2010.

### 3.3 REPLICAÇÃO VIRAL

#### 3.3.1 Os genes e suas funções

Estudos para esclarecer diversas funções dos genes do VVZ durante sua replicação contribuíram para definir sua interação com a célula do hospedeiro. Existem, no entanto, numerosos produtos de genes virais, cujas funções ainda não foram identificadas, ou que não desempenham um papel importante na replicação viral nos sistemas em que foram testados. A descrição das funções e produtos virais dos genes do VVZ está contida no **Quadro 2**. (MOCARSKI, 2007).

Produto gênico	Abreviatura	ORF	Função principal
<b>Capsídeo</b>			
<i>Major capsid protein</i> (principal proteína do capsídeo)	MCP	40	Estrutura do capsídeo, hexâmero, pentâmero
<i>Triplex monomer</i> (monômero triplex)	TRI1	20	TRI1 e TRI2 associado para formar o complexo TRI, estrutura do capsídeo
<i>Triplex dimer</i> (dímero triplex)	TRI2	41	Complexo TRI
<i>Small capsid protein</i> (pequena proteína do capsídeo)	SCP	23	Transporte do capsídeo
<i>Portal protein</i> (Proteína portal)	PORT	54	Pentâmero para encapsulação do DNA
<i>Portal capping protein</i> (proteína de nivelamento portal)	PCP	34	Cobertura do portal em virions maduros
<b>Tegumento e saída para o citoplasma</b>			
<i>Virion protein kinase</i> (proteína kinase do virion)	VPK	47	Regulação de fosforilação
<i>largest protein tegument</i> (maior proteína do tegumento)	LTP	22	Desencapsulamento, envoltório secundário
<i>LTP protein binding</i> (proteína ligadora da LTP)	LTPbp	21	Indefinida
<i>Encapsidation and egress protein</i> (encapsulação e saída da proteína)	EEP	53	Saída do núcleo
<i>Cytoplasmic egress tegument protein</i> (proteína do tegumento para saída citoplasmática)	CETP	49	Envelopamento secundário, saída citoplasmática
<i>CETP binding protein</i> (proteína ligadora de CETP)	CETPbp	44	Indefinida
<i>Cytoplasmic egress facilitator- 1</i> (mediador 1 de saída citoplasmática)	CEF1	7	Saída citoplasmática
<i>Encapsidation chaperone protein</i> (proteína chaperone de encapsulação)	ECP	46	TERbp chaperone
<i>Capid transport tegument protein</i> (Proteína tegumentar de transporte do capsídeo)	CTTP	43	Transporte do capsídeo no núcleo
<i>Cytoplasmic egress facilitator- 2</i> (mediador 2 de saída citoplasmática)	CEF2	38	Saída, interage com CETPbp
Produto gênico	Abreviatura	VVZ (ORF)	Função principal
<b>Envelope</b>			
Glicoproteína B	gB	31	Ligação com heparan, fusão
Glicoproteína H	gH	60	Associação gH, fusão
Glicoproteína L	gL	37	Associação gL, fusão
Glicoproteína M	gM	50	Associação gN
Glicoproteína N	gN	9 <sup>a</sup>	Associação gM

			continuação
Produto gênico	Abreviatura	ORF	Função principal
<b>Regulação</b>			
<i>Multifunctional regulator of expression</i> (Regulador de expressão multifuncional)	MRE	4	Transcrição, regulação do transporte de RNA
<b>Replicação do DNA, recombinação e metabolismo</b>			
DNA polimerase	POL	28	Síntese de DNA
<i>DNA polymerase processivity subunit</i> (Subunidade de processamento da DNA polimerase)	PPS	16	Processamento POL
<i>Helicase-primase ATPase subunit</i> (Subunidade ATPase helicase-primase HP)	HP1	55	HP1, HP2 e HP3 associados para formar HP, desenovelamento e síntese de primer
<i>Helicase-primase RNA pol subunit B</i> (Subunidade B RNA pol helicase primase)	HP2	6	HP2
<i>Helicase primase subunit 3</i> Subunidade C helicase primase	HP3	52	HP3
<i>Single strand DNA binding strand</i> Proteína ligadora de DNA fita simples	SSB	29	Forquilha DNA, recombinação
<i>Alkaline deoxyribonuclease</i> (Deoxiribonuclease alcalina)	NUC	48	Recombinação
<i>Deoxyuridine triphosphatase</i> (Deoxiuridina trifosfatase)	dUTPase	8	Redução de dUTP
Uracil-DNA glicosidase	UNG	59	Remove uracil do DNA
<i>Ribonucleotide reductase large subunit</i> (Subunidade maior ribonucleotídeo redutase)	RR1	19	Enzima ativa somente em vírus com RR2
<b>Montagem do capsídeo, encapsidação do DNA e saída do núcleo</b>			
<i>Maturational protease</i> (Protease de maturação)	PR	33	Montagem do capsídeo, encapsidação e junção do DNA
<i>Assembly protein</i> (Proteínas de montagem)	AP (NP)	33(33.5)	Proteína de montagem do capsídeo
<i>Capsid transport nuclear protein</i> (Proteína nuclear de transporte do capsídeo)	CTNP	26	Transporte do capsídeo para locais de replicação do DNA
<i>Terminase ATPase subunit 1</i> (Subunidade 1 ATPase Terminase)	TER1	42 45	TER1 e TER2 formam TER, maquinaria de empacotamento
<i>Terminase DNA binding subunit 2</i> (Subunidade 2 ligadora de DNA terminase)	TER2	30	TER2
<i>Terminase binding protein</i> (Proteína ligadora de terminase)	TERbp	25	Associação a TER
<i>Nuclear egress membrane protein</i> (Saída do núcleo de proteínas de membrana)	NEMP	24	Saída do núcleo, envelopamento primário
<i>Nuclear egress lamina protein</i> (Saída do núcleo de proteína lamina)	NELP	27	Saída do núcleo

**Quadro 2.** Descrição dos produtos virais e funções conhecidas dos genes do VVZ.

Adaptado de MOCARSKI, 2007.

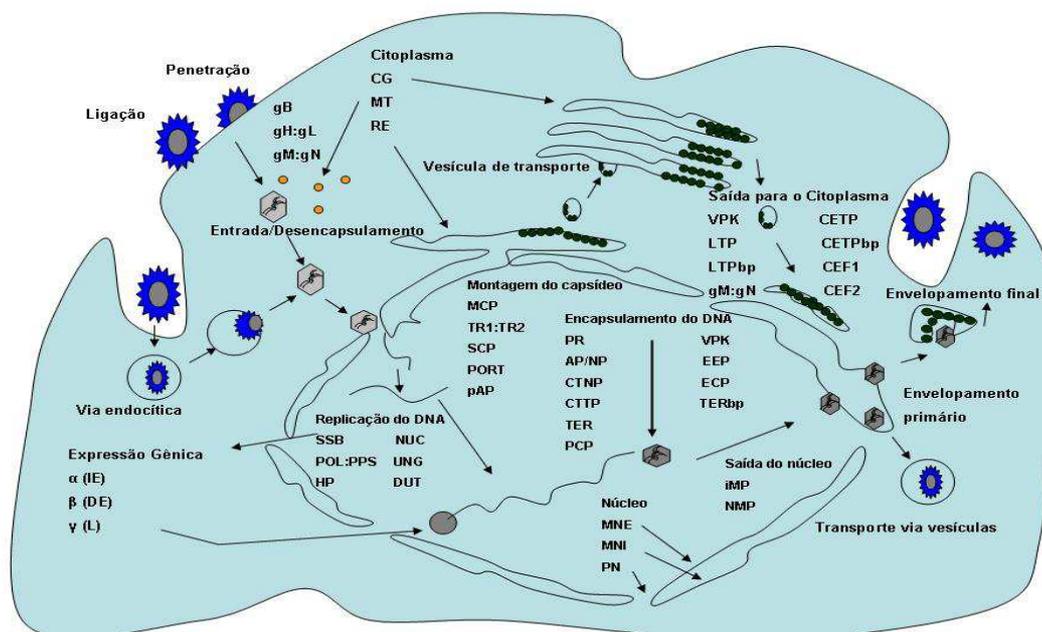
### 3.4 ESTÁGIOS DE REPLICAÇÃO

A principal via de entrada do vírus emprega fusão direta na superfície da célula (ligação e penetração), que é dependente das glicoproteínas gB e do gH, as quais formam o complexo gL. Segue-se o processo através do transporte do nucleocapsídeo ao longo dos microtúbulos de poros nucleares, onde o DNA viral é liberado no interior do núcleo celular. Como mecanismo de entrada alternativo, em certos tipos celulares a endocitose é seguida de fusão do envelope viral com a membrana da vesícula endocítica, **Figura 4** (MOCARSKI, 2007).

O desencapsulamento do vírus requer a participação das glicoproteínas de fusão do envelope (gB, gH, gL e, em alguns casos, gM/gN), bem como a LTP/LTPbp para direcionar a ancoragem aos poros nucleares e liberação do DNA viral no núcleo. Após a entrada e desencapsulamento, uma proteína nuclear reguladora (MRE) está envolvida no controle da transcrição e pós-transcricional. A replicação do DNA depende da ligação de várias proteínas da forquilha de replicação no núcleo (SSB, POL/PPS, HP), bem como proteínas de funções acessórias (NUC, UNG, DUT) (MOCARSKI, 2007).

A montagem do capsídeo utiliza as proteínas MCP, TRI1/TRI2, SCP e PORT. Capsídeos pré-formados translocam para os locais de replicação do DNA, onde PRO, AP/NP (AP e NP são proteínas relacionadas), CTNP, TER, TERbp e PCP, com possíveis funções acessórias EEP, ECP e CTPP completam a encapsidação do DNA viral. A saída nuclear é controlada pelo NEMP e NELP. A principal via de saída do citoplasma e o envoltório (final) secundário são controlados por VPK, LTP/LTPbp, CETP, e CETPbp, com possíveis proteínas acessórias CEF1, CEF2 e gM/gN. Os nucleocapsídeos são

transportados em microtubulos (MT) e glicoproteínas do envelope acompanham o transporte de vesículas para os locais onde ocorrerá o envelopamento final. Vias de maturação alternativa de formação de vesículas na membrana nuclear externa com o vírion maduro seguindo vias de transporte de vesícula ou a liberação de nucleocapsídeos diretamente através de poros nucleares para o citoplasma para o transporte a locais de envolvimento final também é possível. O corpúsculo Golgi (CG), os microtúbulos e o retículo endoplasmático (RE) são identificados no citoplasma, e poros nucleares (PN), membrana nuclear interna (MNI) e membrana nuclear externa (MNE) são identificados no núcleo. A via de transporte celular da vesícula do RE ao CG também é designada. A exocitose ocorre após o transporte do vírion maduro de uma vesícula exocítica para fusão com a membrana celular (MOCARSKI, 2007).



**Figura 4:** Resumo das funções de replicação realizadas pelos produtos dos genes VVZ.

Adaptado de MOCARSKI, 2007.

### 3.5 PATOGÊNESE E PATOLOGIA

O VVZ é transmitido por via respiratória, replicando-se na mucosa do trato respiratório superior. Na infecção aguda, traduzida clinicamente pela varicela, a doença é precedida por um período de incubação de 2 a 3 semanas, provavelmente representado, em parte, pelo sucesso da imunização ativa e passiva. Durante esse período; a viremia ocorre em duas fases, culminando com a distribuição do vírus ao longo da epiderme e o aparecimento de sintomas constitucionais tais como: febre, mal-estar geral e anorexia. A infecção dos queratinócitos epidérmicos pelo VVZ resulta em uma lesão vesicular típica da varicela (ARVIN, 1996; GROSE, 1981; GERSHON & SILVERSTEIN, 2002). É a partir dessas vesículas pruriginosas que partículas virais envelopadas infecciosas são lançadas no ar. A formação de crostras sobre a última safra de vesículas marca o final do contágio. A possível infecciosidade de indivíduos com varicela antes do aparecimento de vesículas sugere uma maneira alternativa de distribuição do vírus nesta fase, tal como o trato respiratório, porém este é um estágio de difícil identificação (GOLD, 1966; TSOLIA et al., 1990).

As principais complicações de varicela incluem ataxia cerebelar, encefalite, pneumonite e infecção bacteriana secundária (em particular da pele e pulmões). A síndrome de Reye's é uma das complicações mais temidas da varicela, mas desapareceu com o fim do uso do ácido acetilsalicílico como droga antipirética em crianças. As complicações de varicela são 25 vezes maiores em adultos do que em crianças. Indivíduos imunocomprometidos e os recém-nascidos também têm um elevado risco de doença grave e fatal (BRASIL, 2008).

Mais rara, a síndrome da varicela congênita (que consiste de cicatrizes na pele, anormalidades nos membros, danos cerebrais e má formação ocular) afeta cerca de 2% dos filhos nascidos de mulheres que contraíram varicela no primeiro ou segundo mês de gravidez (ENDERS et al., 1994; GERSHON & SILVERSTEIN, 2002; HARGER et al., 2002).

O herpes zoster surge quando há reativação do VVZ latente que evolui de um gânglio sensorial via axônio neuronal para a epiderme desencadeando a fase conhecida como dermatoma, que corresponde à doença localizada (THOMAS et al., 2000). Apesar de a transmissão aparentemente ocorrer na juventude, a viremia também pode acontecer durante a reativação do VVZ, como detectada pela presença do ácido desoxirribonucléico (DNA) viral em células mononucleares do sangue periférico (PBMC) de alguns pacientes com zoster dermatomal e dor associada ao zoster (JUNKER et al., 1991; CHOO et al., 1995; GUESS et al., 1986).

O zoster caracteriza-se por apresentar lesões de pele localizadas, unilaterais, e de erupção vesicular dolorosa. Em si, representa considerável morbidade. A complicação tardia dessa fase é a nevralgia pós-herpética, uma condição extremamente dolorosa para a qual há pouco tratamento efetivo. Indivíduos imunocomprometidos podem apresentar disseminação cutânea ou zoster visceral, ocasionalmente com desfecho fatal (GRANT et al., 2002; STRATMAN., 2002).

Uma forma associada à paralisia facial periférica denominada *zoster sine herpette* (ZHS), sem prurido, tem sido descrita. Nesta doença, a dor ocorre de maneira inexplicável, com distribuição dermatomal em associação com a reativação do VVZ (GILDEN et al., 1992).

A paralisia facial periférica em crianças pode ser causada por uma série de doenças, incluindo anomalia congênita, trauma, otite média, doença de Lyme e lesões neoplásicas do osso temporal ou glândula parótida. Outras infecções virais podem estar associadas com paralisia facial (FURUTA et al., 2005).

O Vírus Herpes Simples tipo 1 (HSV-1) (SMITH et al., 1987), o Vírus Epstein-Barr (MORI et al., 2002), o Citomegalovírus (TRAAVIK et al., 1983), o *Herpesvírus Humano 6* (TAKASAKI et al., 1993), e o Vírus da Caxumba (MANNING & ADOUR, 1972; ENDO et al., 2001) vêm sendo reportados causando paralisia facial periférica em crianças.

Furuta et al., (2001) detectaram um elevado número de cópias de DNA do VVZ, através da técnica de *PCR TaqMan*, na saliva de pacientes com Síndrome de Ramsay Hunt que apresentavam zoster próximo a orelha e dos que tinham reativação do VVZ podendo causar paralisia facial periférica aguda na ausência de zoster, ZHS, sugerindo que a reativação viral no gânglio geniculado poderia migrar dentro do epitélio orofaríngeo sem produzir zoster no local (MORI et al., 2002; GROSE et al., 2002).

Alguns estudos têm mostrado com muita frequência a reativação do HSV-1, sendo considerado como uma das muitas causas de paralisia de *Bell's* em adultos (BARINGER, 1996; GROSE et al., 2002). Furuta et al., 2005, mostraram que o ZHS é uma causa subjacente da paralisia de *Bell's* em adultos. Esta forma de paralisia poderia ser confirmada em associação com VVZ por análises sorológicas e moleculares apropriadas (FURUTA et al., 1997). Entretanto, existem poucos estudos de associação de causa virológica para paralisia facial periférica em crianças.

O diagnóstico apropriado da reativação de VVZ pode ser realizado por testes de imunoenensaio enzimático (ELISA) em soros de pacientes pediátricos com paralisia facial periférica (FURUTA et al., 2005).

### 3.6. EPIDEMIOLOGIA

A varicela apresenta distribuição mundial, incidindo, com maior freqüência, no final do inverno e na primavera (WHARTON, 1996; CARVALHO & MARTINS, 1999; MANDELL et al., 2000; PICKERING, 2000; REIS et al., 2003). Apesar de ter grande amplitude, esse agravo é menos prevalente em crianças nas regiões de clima equatorial e tropical, o que se traduz em um maior número de adultos suscetíveis, gerando implicações epidemiológicas diversas para a doença nestas localidades (OOI et al., 1992; CLEMENS et al., 1999; BELLESI et al., 2000; YU et al., 2001; RAWSON et al., 2001; REIS et al., 2003; CHONG et al., 2004).

No Brasil, a varicela não é uma doença de notificação compulsória, embora os surtos devam ser notificados às secretarias municipais e estaduais de saúde. Estudo realizado no país, em 1997, avaliou a prevalência da infecção pelo vírus varicela zoster em 975 amostras de soro de adultos jovens de 20 a 29 anos, doadores de sangue de cinco capitais brasileiras: Fortaleza, Salvador, São Paulo, Curitiba e Porto Alegre. A soroprevalência global de anticorpos anti-VVZ foi de 94%, enquanto nas regiões de clima tropical (Fortaleza e Salvador, 89%) foi significativamente menor que nas regiões de clima temperado (97%) (BRASIL, 2008).

Outro estudo conduzido entre 1992 e 1994 em escolas públicas do município de São Paulo indicou que o contato com o VVZ ocorre nos primeiros anos da infância. Cerca de 40% das crianças com 1 ano apresentaram anticorpos anti-varicela zoster; essa proporção aumentou rapidamente até o terceiro ano, manteve-se ascendente e alcançou 90% aos 10 anos (CLEMENS et al., 1999).

Estudo realizado em quatro cidades brasileiras (Rio de Janeiro, Porto Alegre, Fortaleza e Manaus), mostrou que os índices de soroprevalência de anticorpos contra o VVZ (anti-VVZ) em populações de baixo nível sócio-econômico foram de 68,8%, 89,1%, 90,5% e 95,4%, respectivamente, em pessoas com idades entre 1 e 5 anos, 6 e 10 anos, 11 e 15 anos e 16 a 20 anos. Em populações de nível sócio-econômico médio-alto, os índices correspondentes foram de 43,2%, 80,7%, 91,4% e 95,5%, respectivamente (BRASIL, 2008).

No período de 1998 a 2007, foram registradas no SIH-SUS 36.623 internações por varicela, com uma média anual de 3.662,3 casos (desvio padrão= 2.102,9). O número de internações variou de 1.488 (em 2000) a 7.791 (em 2003), enquanto que, para o número de óbitos, essa variação foi de 8 (em 2002) a 44 (em 2006). O maior número de hospitalizações concentra-se na faixa etária de 1 a 4 anos, seguidos dos menores de 1 ano e de 5 a 9 anos. Embora o maior número absoluto de hospitalizações seja observado entre crianças, grupo que se espera o maior número de casos da doença, proporcionalmente, os adultos, apresentam o maior risco de evoluir com complicações, hospitalização e óbito. A taxa de letalidade entre os casos hospitalizados aumenta com a idade, chegando a 2,6% na faixa etária de 15 a 49 anos e 4,6% na faixa etária de 50 anos ou mais (BRASIL, 2008).

O número de casos notificações no SINAN NET (Ministério da Saúde) aponta 154.778 casos no ano de 2007, e 25.594 notificações em 2008. A faixa etária com maior número de notificações foi a de 1 a 4 anos, representando 40% dos casos em 2007 e 39% em 2008 (BRASIL, 2010).

Em Belém, nos anos de 1997 e 1998, foram testados 525 soros testados, sendo 61% de indivíduos do sexo feminino e 39% de indivíduos do sexo masculino. Anticorpos IgG para VVZ foram detectados em 63,2% dos soros analisados. Para as faixas etárias de 0 a 4, 5 a 14, 15 a 24 e > 25 anos, foram registradas frequências de positividade de 22,2%, 51,7%, 72,9% e 92,5%, respectivamente. A prevalência de anticorpos da classe IgG para varicela-zoster em Belém é a menor até então registrada comparada a populações de outras seis cidades brasileiras. É possível que as diferenças observadas estejam relacionadas à amostragem de Belém, constituída principalmente de indivíduos de nível sócio-econômico mais elevado (CLEMENS et al., 1999; BELLESÍ et al., 2000).

Estudo realizado utilizando amostras de comunidades indígenas do Pará evidenciaram a presença de anticorpos IgG anti-VVZ em 83% da população. Estes resultados são semelhantes ao encontrado em achados em outras populações indígenas (COSTA, 2006).

### **3.6.1 Epidemiologia dos Genótipos do VVZ**

Loparev et al., (2007b) identificaram SNPs que discriminam os genótipos E1 e E2 nas ORF21, ORF22 [região2], e ORF50. Análise de SNP em qualquer destas regiões é suficiente para discriminar cepas E1 de outras europeias. Duas posições adicionais em ORF38 (69349) e ORF54 (95241), originalmente usadas para confirmar os eventos

adversos da vacina Oka, também fornecem informações para genotipagem. Estes dois marcadores não são úteis para vacina Oka especificamente, mas servem para distinguir algumas cepas J, M1, M2 e M4 (LOPAREV et al., 2007a) de outros genótipos. Um subconjunto de isolados de genótipo J (por exemplo, pOka, que foi a fonte para a vacina de vírus Oka) contém um sítio de restrição *Pst*I na ORF38 e ORF54 incluindo a sequência de um local de restrição *Bgl*I comum a genótipos J, M1, M2, M4. (LOPAREV et al., 2004).

O genótipo E foi identificado em cepas obtidas de pacientes da Alemanha, Islândia, República Checa, Polónia, Rússia Europeu, Bielorrússia, Ucrânia, Lituânia, Letônia, Moldávia e Estônia (LOPAREV et al., 2004). Este genótipo também foi o mais prevalente na Ásia, Rússia, Cazaquistão, leste da Austrália, Canadá, os Estados Unidos, Jordânia, Chile e Nicarágua, mostrando-se altamente cosmopolita. Com base na análise dos isolados obtidos a partir de vários locais geográficos distintos, o genótipo E mostrou um grupo de bases conservadoras no perfil dos SNPs da ORF22 e todas as cepas E também apresentaram o padrão de marcador *Pst*I *Bgl*I. Uma observação surpreendente foi a descoberta do domínio geográfico de cepas do genótipo M em áreas tropicais e subtropicais, como a África (Congo, República do Tchad, Marrocos) e na Ásia (Índia, Bangladesh, Nepal e China). (LOPAREV et al., 2004).

Além das cepas J comuns no Japão, Austrália e alguns países do leste asiático, os padrões *Bgl*I+ também são comumente isoladas em climas tropicais (por exemplo, na África equatorial, Índia, Bangladesh, no sul da China, América Central e norte da Austrália). Em contraste, vírus *Bgl*I- são comuns em climas temperados. Dois isolados *Pst*-*Bgl*I- também foram observados na Austrália (LOPAREV et al., 2004, 2007a, 2007b; SAUERBREI et al., 2004; SERGEEV et al., 2006).

Assim para dominância geográfica foram observados os genótipos E1 e E2 (Europa), M1 (África) e (Japão) J. O predomínio de cepas genótipo E na América do Norte e Austrália provavelmente foi estabelecida durante a colonização europeia nos séculos XVI e XVII. Mudanças relativamente recentes na imigração e/ou padrões de viagens internacionais para certas regiões geográficas (principalmente Europa, Austrália e Estados Unidos) têm ocasionado a co-circulação de uma variedade de genótipos de VVZ (KOSKINIEMI et al., 2007; LOPAREV et al., 2004, 2007a; NORBERG et al., 2006; QUINLIVAN et al., 2002; SENGUPTA et al., 2007).

Um genótipo proposto como recombinante de VVZ de amostras do Brasil descrito por Muir et al., (2002) foi classificado como uma cepa do genótipo M. De 10 isolados, obtidos de forma independente no Brasil, testados por Loparev et al., (2004), 8 cepas tipo M e 2 do genótipo E tinham padrões de SNP semelhantes aos descritos por Muir et al., (2002).

### 3.7. IMUNIDADE

A susceptibilidade à infecção pelo VVZ é universal. Esta confere imunidade permanente, embora, raramente, possa ocorrer um segundo episódio de varicela. Infecções subclínicas são raras. A imunidade passiva transferida para o feto pela mãe que já teve varicela assegura, na maioria das vezes, proteção de até 4 a 6 meses de vida extrauterina. A imunidade ao VVZ é complexa e ainda não totalmente esclarecida. Anticorpos surgem após a erupção da varicela e persistem durante muitos anos. Com base na experiência com a imunização passiva, verifica-se que os anticorpos podem

desempenhar um papel na imunidade ao vírus varicela, e anticorpos de neutralização podem ser demonstrados *in vitro* (ARVIN, 1996).

A transferência passiva de anticorpos de VVZ da mãe para o feto protege o recém-nascido de varicela grave quando exposto dias a semanas após o parto. Da mesma forma, o tratamento prévio de recém-nascidos com anticorpos anti varicela-zoster reduz a gravidade da infecção em recém-nascidos depois do início da varicela em suas mães por se beneficiar de transferência passiva de anticorpos maternos. Por conseguinte, na falta de células T maduras, os recém-nascidos dependem de transferência passiva de anticorpos IgG maternos para modificar a gravidade da doença, sugerindo que os anticorpos são parcialmente eficazes contra herpesvírus (PINQUIER, et al., 2009).

O VVZ infecta vários tipos de células do hospedeiro durante a infecção aguda, incluindo células T, células B, monócitos e células dendríticas (COLLINS,1997; GROSE,1981). A infecção das células T pelo vírus é considerada um dos principais mecanismos pelos quais o vírus se dissemina, subsequentemente infectando queratinócitos e outras células (GROSE,1981; GOLD, 1966 ). Durante a fase de viremia acredita-se que o VVZ infecte predominantemente as células T (ENDERS, et al., 1994; HARGER et al., 2002).

As respostas das células T são importantes para controlar o vírus e prevenir a reativação viral. Respostas específicas de proliferação de células T contra o vírus podem encontrar-se prejudicadas em indivíduos imunossuprimidos com doença grave (GERSHON & STEINBERG, 1979; PATEL et al., 1979), enquanto que respostas proliferativas das células T nas primeiras 72 horas de manifestação da doença

mostraram-se associadas com doença mais branda (ARVIN et al., 1996). Curiosamente, os títulos de anticorpos específicos VVZ não parece estar correlacionada com a gravidade clínica da doença (ARVIN et al., 1996; GERSHON & STEINBERG, 1979). No entanto, esta possibilidade e as associações entre a frequência e respostas de células T funcionais com carga viral aguda na infecção primária VVZ ainda não foram investigadas em detalhe (MALAVIGE et al., 2008).

Estudos que sugerem que, em indivíduos com infecção latente pelo VVZ, a re-exposição á varicela resulta em reforço da imunidade anti-VVZ e diminuição do risco de zoster (WAGENPFEIL et al., 2004).

### 3.8. TRANSMISSÃO

A propagação viral na população se faz de pessoa a pessoa, através do contato direto ou de secreções respiratórias (disseminação aérea de partículas virais através de aerossóis) e, raramente, através do contato com lesões da pele. Indiretamente, é transmitida através de objetos contaminados com secreções de vesículas e de membranas mucosas de pacientes infectados. A transmissibilidade ocorre 1 a 2 dias antes da erupção até 5 dias após o surgimento do primeiro grupo de vesículas (BRASIL, 2008).

### 3.9. TRATAMENTO

O tratamento geralmente é sintomático, com uso de anti-histamínicos sistêmicos, banhos de permanganato de potássio e água boricada 2%. Havendo infecção secundária, recomenda-se o uso de antibióticos sistêmicos. Varicela em crianças é uma doença benigna, que em geral não necessita de tratamento antiviral específico. Em situações especiais, em que há complicações graves de varicela, a utilização do aciclovir é indicada (BRASIL, 2011).

Não existem ensaios clínicos controlados que tenham examinado a eficácia de imunoglobulinas anti vírus varicela-zoster, também conhecido como IGVZ, em adultos saudáveis, bebês ou recém-nascidos (KOREN et al., 2002; SAUERBREI, 2011). Estudos em pacientes imunocomprometidos mostram que a gravidade da doença clínica e as suas complicações podem ser reduzidos em 75% com o uso de imunoglobulinas (ZAIA et al., 1983). Os riscos associados com a imunização passiva com imunoglobulina anti vírus varicela-zoster são mínimos (KOREN et al., 2002; SAUERBREI, 2011).

### 3.10. DIAGNÓSTICO

O diagnóstico é baseado principalmente no quadro clínico-epidemiológico. O vírus pode ser isolado de lesões vesiculares durante os primeiros 3 a 4 dias de erupção. Exames laboratoriais não são utilizados com frequência para confirmação ou descarte

dos casos de varicela, exceto quando é necessário fazer o diagnóstico diferencial em casos graves. (HAMBLETON & GERSHON, 2005; BRASIL, 2008).

Os testes sorológicos são os mais utilizados e, dentre eles, a aglutinação pelo látex ou o imunoensaio ELISA apresentam bons resultados, além de estarem comercialmente disponíveis. A identificação do VVZ pode ser feita pelo teste direto de anticorpo fluorescente ou por cultura em tecido, por meio de efeito citopático específico, porém esse método é de alto custo e sua disponibilidade é limitada. A reação em cadeia da polimerase (PCR) é considerada como padrão ouro para diagnóstico de infecção pelo VVZ, utilizando material genético viral extraído de sangue, da saliva e de conteúdo direto do líquido da vesícula (HAMBLETON & GERSHON, 2005; BRASIL, 2008).

### 3.11 VACINAS

Trata-se de uma vacina de vírus vivo atenuado, desenvolvida em 1974. O vírus original foi isolado de um menino japonês saudável, de sobrenome Oka, com varicela natural; foi, em seguida, atenuado em cultura de células de pulmão embrionário humano, de células embrionárias de cobaia e de células diplóides humanas. A cepa atenuada original japonesa é conhecida como cepa Oka e dela se originaram as outras cepas vacinais utilizadas hoje em todo o mundo (GERSHON et al., 1999). No Brasil existem três produtos licenciados, contendo a própria cepa Oka (Aventis Pasteur-AP), a cepa Oka/Merck (Merck Sharp Dohme - MSD) ou a cepa Oka/RIT (GlaxoSmithKline - GSK) (BRICKS et al., 2006).

Em geral é possível afirmar que a vacina anti-VVZ dá uma proteção de cerca de 80% contra qualquer forma clínica de doença e de mais de 95% contra doença grave nos primeiros sete a dez anos de seguimento (CDC, 1999; CHARTRAND, 2000). Uma excelente demonstração da efetividade da vacina contra a varicela foi o estudo de um surto de varicela em um centro de cuidados infantis, onde 148 crianças sem história prévia de varicela foram avaliadas: 81 (55%) tiveram a doença. Nove (14%) das 66 crianças previamente vacinadas e 72 (88%) das não vacinadas adoeceram; a varicela foi considerada moderada ou grave em 53 (74%) das 72 crianças não vacinadas em comparação com nenhuma das nove crianças vacinadas ( $p > 0,001$ ). A efetividade da vacina contra todas as formas da doença foi de 86% e contra doença moderada ou grave foi de 100% (IZURIETA et al., 1997). Após uma dose da vacina, o índice de soroconversão em crianças com idades de 1 a 12 anos é de 97%. Além disso, existe excelente correlação entre essa resposta humoral e o desenvolvimento de imunidade celular, avaliada por proliferação linfocitária (WHITE, 1996). Em pessoas com mais de 13 anos de idade, o índice de soroconversão após uma dose é de apenas 78%. A administração de uma segunda dose, quatro a oito semanas após, eleva o índice a 99% (CDC, 1999; ARBETER, 1996).

Estudos sorológicos indicaram que o resultado do método de ELISA para medir o nível específico da imunidade para a varicela é um correlato aproximado de proteção contra o vírus. Com base neste estudo, aproximadamente 15% das crianças que recebem uma dose da vacina contra varicela não apresentaram níveis de anticorpos que as protegem de adquirir a doença (LI et al., 2002). Isto é compatível com outros estudos que indicaram que uma dose da vacina para varicela é aproximadamente 80%

a 85% eficaz contra a doença, sendo assim, 15% a 20% das crianças vacinadas correm o risco de adquirir varicela se forem expostos ao VVZ, ou porque não desenvolveram nenhuma resposta imune ou porque a vacinação forneceu somente uma proteção parcial (TUGWELL et al., 2004; LOPEZ et al., 2006; VASQUEZ et al., 2001; IZURIETA et al., 1997; CLEMENTS et al., 1999).

Alguns estudos clínicos sugeriram que uma segunda dose da vacina para varicela poderia fornecer a proteção aumentada a um encontro à doença, elevando a proporção de crianças com títulos de anticorpos protetores e melhorando a resposta imune celular (KUTER et al., 2004; NGAI et al., 1996; CHAVES et al., 2007).

A maioria dos estudos publicados indicou que a cada ano após a vacinação cerca de 1 a 3% das crianças vacinadas podem desenvolver uma erupção discreta conhecida como síndrome *varicela-like* leve, após exposição significativa ao vírus da varicela. A frequência e a gravidade desses casos não aumentam com o passar do tempo após a vacinação. Comparada com a varicela natural, a síndrome *varicela-like* em vacinados é consideravelmente mais benigna. O número de lesões de peles (pápulas ou vesículas) é inferior a 50, em comparação com cerca de 300 na varicela natural. Menos de 10% das crianças têm febre, em comparação com cerca de 90% das crianças com varicela natural. A síndrome *varicela-like* acontece com mais frequência nas crianças que tiveram uma resposta imune pós-vacinal muito baixa (CDC, 1999; CLEMENTS, 1999).

## 4. OBJETIVOS

### 4.1. OBJETIVO GERAL

➤ Caracterizar genotipicamente o *vírus Varicela-zoster*, em casos de varicela e herpes zoster, em Belém-Pará, Brasil.

### 4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

➤ Determinar a prevalência de anticorpos anti-VVZ IgG e IgM nas amostras analisadas.

➤ Caracterizar os genótipos das amostras VVZ em classes de 1 a 5.

➤ Realizar a análise filogenética com base em SNPs observados nos genes das ORFs 22, 38, 54.

➤ Determinar a prevalência de diferentes tipos de cepas do vírus em pacientes com o VVZ em Belém-Pará, Brasil.

## **5. MATERIAL E MÉTODOS**

### **5.1 MATERIAL**

#### **5.1.1 Área de estudo**

As amostras para este estudo foram obtidas nos municípios de Belém, Ananindeua e Marituba localizados na região metropolitana de Belém-Pará. Estes municípios situam-se na Amazônia Oriental, entre os rios Pará e Guamá. O clima é tropical e úmido, apresentando níveis pluviométricos elevados de janeiro a abril. A cidade de Belém é a capital do estado, possui uma área de 1060 km<sup>2</sup>, sua população é estimada em 1.393.399 habitantes. O município de Ananindeua apresenta uma área de 185 km<sup>2</sup> com uma população de aproximadamente 471.744 habitantes. O município de Marituba apresenta uma área de 103 km<sup>2</sup> com uma população de 108.246 habitantes (CENSO, 2010).

#### **5.1.2 População de estudo**

O critério clínico para inclusão das amostras neste estudo foi a suspeita clínica e/ou aparecimento de sintomas de infecção por varicela ou herpes zoster. Este é um estudo do tipo transversal, prospectivo e analítico. Durante o período de novembro de 2008 a março de 2012, foram analisadas amostras de 49 indivíduos do sexo masculino e 44 do sexo feminino, clinicamente diagnosticados com varicela ou herpes zoster. Todas as amostras, oriundas de pacientes procedentes das redes pública e privada de

saúde, foram coletadas no Instituto Evandro Chagas (IEC), localizado em Ananindeua-Pará.

## 5.2 MÉTODOS

### 5.2.1 Identificação, Processamento e Armazenamento das Amostras

Amostras de *swab* nasal, oral ou de secreção de vesículas, além de soro de 93 indivíduos (85 casos de varicela e oito de herpes zoster) foram coletadas no dia do atendimento e encaminhadas para seção de virologia do IEC. A identificação das amostras foi feita de acordo com o registro da ficha clínico-epidemiológica adotada neste projeto, com a sigla VVZ seguido do número da ficha do paciente no IEC.

As amostras de sangue foram centrifugadas a 3000 rpm x g por 10 minutos para separação do soro, o qual foi armazenado a -20°C. As amostras de *swab* de saliva e vesículas foram mergulhadas em 100 µL de água destilada e esterilizada, sendo pressionado contra a parede do tubo, e em seguida foram adicionados 400 µL do mesmo tipo de água e a suspensão armazenada a -70°C.

### 5.2.2 Sorologia

#### 5.2.2.1 Detecção de Anticorpos IgG e IgM para o Vírus Varicela-zoster

O título dos anticorpos foi mensurado utilizando-se o método de ELISA (Novum Diagnóstica anti-VVZ IgG e IgM; Dietzenbach/Alemanha), em um espectrofotômetro (Labsystems, Multiscan EX).

### 5.3 BIOLOGIA MOLECULAR

#### 5.3.1 Amplificação do DNA Viral por Reação em Cadeia da Polimerase

Após o processamento das amostras de *swab* de saliva e/ou de vesículas rompidas em vários sítios anatômicos, o material foi utilizado diretamente na reação em cadeia da polimerase (PCR). Amostras de células diplóides humanas Hep-2 (Carcinoma epidermóide humano) foram usadas como controle negativo, enquanto que amostra comercial da vacina Varicela Biken<sup>®</sup> (SanofiPasteur) cepa vOka foi utilizada como controle positivo para identificação das ORFs 22, 38 e 54.

Das 93 amostras analisadas por esta técnica, 13 amostras de vesículas foram amplificadas. No **Quadro 3** estão descritos os oligonucleotídeos que foram utilizados neste estudo.

Região (pares de base)	Oligonucleotídeos	Orientação	Posição
ORF 22 447pb	p22R1f5'-GGGTTTTGTATGAGCGTTGG-3'	<i>Forward</i>	37837 até 37856
	p22R1r5'-CCCCCGAGGTTTCGTAATATC-3'	<i>Reverse</i>	38283 até 38264
ORF 38 350 pb	PstA 5'-TTGAACAATCACGAACCGTT-3'	<i>Forward</i>	69250 até 69269
	PstB 5'-CGGGTGAACCGTATTCTGAG-3'	<i>Reverse</i>	69599 até 69580
ORF 54 222 pb	Nla 5' -GGAACCCCTGCACCATTAAA-3'	<i>Forward</i>	95109 até 95128
	Fok 5'-TCCCTTCATGCCCGTTACAT-3'	<i>Reverse</i>	95330 até 95311

**Quadro 3:** Iniciadores utilizados na PCR para amplificação de seqüências das ORFs:

22, 38 e 54 do VVZ.

A reação de amplificação de 447 pares de base da região ORF 22 foi realizada em um termociclador *Gene Amp PCR System 9700* (Applied Biosystems) em uma

reação de volume de 50  $\mu\text{L}$  com *AmpliTaq Gold PCR Master Mix* (0,025 U da enzima *GoldTaq DNA polimerase*, tampão II 1X para PCR, 2,5 mM de  $\text{MgCl}_2$ , 200  $\mu\text{M}$  de cada deoxinucleotídeo trifosfato [Invitrogen]), 0,2  $\mu\text{M}$  de cada oligonucleotídeo, e 1 a 5  $\mu\text{L}$  do DNA do VVZ extraído. Cada etapa incluiu um aquecimento inicial de 96°C por 5 minutos para ativação da enzima, seguida por 40 ciclos de: 94°C por 1 minuto, 58°C por 2 minutos e 72°C por 2 minutos; após esta etapa foi realizada uma extensão final a 72°C por 7 minutos.

Para amplificação de 350 pares de base da região ORF 38 e 222 pares de base da ORF 54 foram utilizadas as mesmas condições de reação diferenciadas apenas pelos oligonucleotídeos: em um volume final de 50  $\mu\text{L}$  utilizou-se 2,5 U da enzima *Taq DNA polimerase* recombinante, 1,5 mM de  $\text{MgCl}_2$ , 200  $\mu\text{M}$  de cada deoxinucleotídeo trifosfato [Invitrogen]), 1  $\mu\text{M}$  de cada oligonucleotídeo, e 10  $\mu\text{L}$  do DNA do VVZ extraído. A reação foi colocada em termociclador para um aquecimento inicial de 96°C por 5 minutos para ativação da enzima, seguida por 40 ciclos de: 94°C por 1 minuto, 58°C por 2 minutos e 72°C por 2 minutos; após esta etapa é realizada uma extensão final a 72°C por 7 minutos.

### 5.3.2 Eletroforese em gel de agarose

Os produtos da PCR (10  $\mu\text{L}$ ) foram aplicados com azul de bromofenol em gel de agarose. Para análise do padrão das bandas foi utilizado um marcador de peso molecular com 123 pb (Invitrogen) diluído em tampão tris-borato-EDTA (TBE) 1X. A eletroforese horizontal foi realizada em gel de agarose contendo 1,8% contendo *Sybr*

*Safe* (Invitrogen) em TBE 1X a 100 V e 400 mA por 30 minutos. Os amplicons foram visualizados com o sistema de fotodocumentação *Gel Doc 1000* (Bio Rad).

### **5.3.3 Purificação do produto da PCR**

O produto da PCR foi purificado visando o seqüenciamento de nucleotídeos (nt). Utilizou-se o *kit QIAQuick PCR purification* (QIAGEN) diretamente do produto da PCR, segundo protocolo descrito pelo fabricante. Em todos os tubos para cada volume de PCR usado adicionou-se cinco vezes o volume do tampão PB. Após a homogeneização, a mistura foi transferida para a coluna de purificação aplicada ao tubo coletor de dois mililitros, a qual foi centrifugada (10.000 X g) por um minuto, e em seguida desprezou-se o sobrenadante. Em seguida adicionou-se 750 µL do tampão PE diluído a coluna, a qual foi centrifugada por um minuto para lavagem da mesma.

Novamente o sobrenadante foi descartado para remoção dos resíduos de reagentes e a coluna centrifugada por 60 segundos sem adição de qualquer reagente. Posteriormente, a coluna foi transferida a um tubo coletor e o DNA eluído em 50 µL do tampão EB (10 mM Tris-CL, pH 8,5). O material foi incubado a temperatura ambiente por um minuto e, logo após, centrifugado por um minuto para coleta e armazenamento do produto final a -20°C para ser usado na reação de seqüenciamento.

### 5.3.4 Sequenciamento de Nucleotídeos

O produto da PCR foi sequenciado para determinação do genótipo dos VVZ, através da detecção de mutação no sítio para enzima de restrição *Pst*I, a qual resulta na mudança de G por A na posição nucleotídica nt69349 (ORF 38). A mutação de C para T na posição nucleotídica nt95241 (ORF 54) causa a eliminação do sítio de restrição para enzima *Bgl*I. O produto do SNP da ORF 22 foi utilizado para análise de mutações nas posições nt37902, nt38019, nt38055, nt38081, nt38177 e nt38229.

Na reação de sequenciamento foi realizada uma mistura de 3.2 pmol de cada oligonucleotídeo correspondente e 10 ng do produto como fonte. Foram realizados 25 ciclos de 96°C por 10 segundos, 50°C por 5 segundos e 60°C por 4 minutos. Os produtos resultantes foram purificados com colunas giratórias (Princeton Separations, Adelphia, N. J.) e resuspendidos em tampão de supressão (Applied Biosystems).

Os polimorfismos nucleotídicos específicos do VVZ foram analisados em sequenciador automático, modelo ABI 377 (Applied Biosystems) empregando o método de terminação de cadeia descrito por Sanger e colaboradores (1977).

### 5.3.5 Alinhamento das Sequências Nucleotídicas

As seqüências nucleotídicas foram montadas através programa SeqMan (DNASTAR ® Lasergene), e alinhadas com seqüências de outras cepas do VVZ disponíveis no *GenBank* ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)) utilizando o programa Clustal X (Thompson et al., 1997). Quando necessário, as seqüências foram ajustadas manualmente com auxílio do programa BioEdit (Versão 7.0.5.2).

### 5.3.6 Análise Filogenética

As seqüências genômicas de cada ORF de cepas de VVZ foram comparadas entre si, bem como com seqüências de outros herpesvírus (*Virus Herpes simples 1 e 2*, *Virus Epstein-Barr* e *Citomegalovirus*) disponíveis no banco de dados do *GenBank* utilizando o programa *Pile Up of the UWGCG package* (DEVEREOUX et al., 1984).

As cepas Dumas (número de acesso no *GenBank*: X04370), HJ0 (número de acesso no *GenBank*: AJ871403), CA 123 (número de acesso no *GenBank*: DQ457052), DR ou Morroco 1 (número de acesso no *GenBank*: DQ452050), Var160 ou Mexico\_68 (número de acesso no *Genbank*: KC112914.1), pOka (Número de acesso no “*GenBank*”: AB097933) e vOka (Número de acesso no “*GenBank*”:AB097932) foram utilizadas para comparação das substituições nucleotídicas nas amostras analisadas neste estudo.

Para a análise filogenética, os métodos de agrupamento de vizinhos (*Neighbour-joining* - NJ) (SAITOU & NEI, 1987) e máxima parsimônia (MP) foram adotados. Nesses casos, a matriz de distância foi calculada a partir das seqüências alinhadas usando a fórmula de dois parâmetros de Kimura (KIMURA, 1980). Os métodos heurísticos e algorítmicos foram utilizados para a construção de uma árvore filogenética através do programa Mega 3.0 (KUMAR et al., 2004).

## 6. MÉTODOS ESTATÍSTICOS

O cálculo da prevalência de anticorpos anti-VVZ IgG e IgM nas amostras analisadas foi efetuado por meio do teste do qui-quadrado ( $\chi^2$ ), seguido de correção de Yates, usando o programa EPI INFO 2002 (Versão 3.5.2), da mesma maneira que o cálculo das frequências quanto ao sexo e faixa etária.

## **7. ASPECTOS ÉTICOS E DE BIOSSEGURANÇA**

O estudo não ocasionou qualquer risco ou prejuízo para os participantes ou seus responsáveis. O projeto envolvido no presente estudo foi previamente avaliado pelo Comitê de Ética em pesquisa do Instituto Evandro Chagas, Secretaria de Vigilância em Saúde, bem como pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP), quando cabível. Esta pesquisa foi submetida ao CEP do IEC sob número 0028/2009, com parecer de aprovação número 0004/2009 (anexo 1).

Em relação aos aspectos de biossegurança, no decorrer dos procedimentos foram utilizados equipamentos de proteção individual (EPIs) e todo material potencialmente infectante foi manipulado em laboratório de segurança NB2 com o uso de cabine de fluxo laminar tipo 2.

## 8. RESULTADOS

### 8.1 FREQUÊNCIA DE ANTICORPOS IgG E IgM ANTI-VVZ QUANTO AO SEXO E FAIXA ETÁRIA EM CASOS DE VARICELA

A frequência de anticorpos IgG anti-VVZ nas amostras analisadas foi de 68,2%, sendo maior no sexo masculino, com 53,4%. As análises mostraram que as diferenças na distribuição quanto ao sexo não diferiram significativamente em nível de 5% ( $\chi^2=0,34$ ;  $p=0,55$ ; **Tabela 1**). A maior prevalência (59,3%) foi observada na faixa etária de 5 a 14 anos (**Tabela 2**).

**Tabela 1.** Prevalência de anticorpos IgG para o VVZ quanto ao sexo.

<b>Anticorpos IgG anti-VVZ</b>	<b>Negativos (%)</b>	<b>Positivos (%)</b>	$\chi^2$	<i>P</i>
<b><i>Feminino</i></b>	10 (37,0)	27 (46,6)		
<b><i>Masculino</i></b>	17 (63,0)	31 (53,4)		
<b><i>Total</i></b>	<b>27</b>	<b>58</b>	<b>0,34</b>	<b>0,55</b>

**Tabela 2.** Distribuição por faixa etária de anticorpos IgG para o VVZ.

<b>Faixa etária (anos)</b>	<b>Negativos (%)</b>	<b>Positivos (%)</b>	<b>Total</b>
<b>0-4</b>	10 (37)	00 (0,0)	10
<b>5-14</b>	11 (40,7)	32 (59,3)	43
<b>15-24</b>	02 (7,4)	08 (14,8)	10
<b>≥ 25</b>	04 (14,8)	14 (25,9)	18
<b>Total</b>	<b>27</b>	<b>54</b>	<b>81</b>

A presença de anticorpos IgM anti-VVZ foi de 48,2%. A frequência no sexo masculino foi de 63,4%. As análises mostraram que as diferenças na distribuição quanto ao sexo não diferiram significativamente em nível de 5% ( $\chi^2 = 1,05$ ;  $p=0,30$ ; **Tabela 3**). O grupo com idade de 5 a 14 anos mostrou prevalência de 72,5% (**Tabela 4**).

**Tabela 3.** Prevalência de anticorpos IgM para o VVZ quanto ao sexo.

<b>Anticorpos IgM</b>	<b>Negativos (%)</b>	<b>Positivos (%)</b>	$\chi^2$	<b>P</b>
<b>anti-VVZ</b>				
<b>Feminino</b>	22 (50,0)	15 (36,6)		
<b>Masculino</b>	22 (50,0)	26 (63,4)		
<b>Total</b>	<b>44</b>	<b>41</b>	<b>1,05</b>	<b>0,30</b>

**Tabela 4.** Distribuição por faixa etária de anticorpos IgM para o VVZ.

<b>Faixa etária (anos)</b>	<b>Negativos (%)</b>	<b>Positivos (%)</b>	<b>Total</b>
<b>0-4</b>	06 (14,6)	04 (10,0)	10
<b>5-14</b>	14 (34,1)	29 (72,5)	43
<b>15-24</b>	06 (14,6)	04 (10,0)	10
<b>≥ 25</b>	15 (36,6)	03 (7,5)	18
<b>Total</b>	<b>41</b>	<b>40</b>	<b>81</b>

## 8.2 FREQUÊNCIA DE ANTICORPOS IgG E IgM ANTI-VVZ QUANTO AO SEXO E FAIXA ETÁRIA EM CASOS DE HERPES ZOSTER

A frequência de anticorpos IgG anti-VVZ foi de 87,5%. O sexo feminino apresentou positividade de 100% (**Tabela 5**). A faixa etária de 35 a 44 anos apresentou a maior prevalência com 57,1% (**Tabela 6**).

**Tabela 5.** Prevalência de anticorpos IgG para o VVZ quanto ao sexo.

<b>VVZ IgG</b>	<b>Masculino</b>	<b>Feminino</b>	<b>Total</b>
<b>Negativos</b>	1	0	1
<b>Positivos</b>	0	7	7
<b>Total (%)</b>	<b>1 (12,5)</b>	<b>7 (87,5)</b>	<b>8</b>

**Tabela 6.** Distribuição por faixa etária de anticorpos IgG para o VVZ.

<b>Faixa etária (anos)</b>	<b>Negativos (%)</b>	<b>Positivos (%)</b>	<b>Total</b>
<b>35-44</b>	0 (0,0)	4 (57,1)	4
<b>45-54</b>	1 (100,0)	1 (14,3)	2
<b>55-64</b>	0 (0,0)	1 (14,3)	1
<b>≥ 65</b>	0 (0,0)	1 (14,3)	1
<b>Total</b>	<b>1</b>	<b>7</b>	<b>8</b>

Apenas uma amostra, do sexo feminino, apresentou anticorpos IgM anti-VVZ (Tabela 7), encontrando-se na faixa etária ≥ 65 (Tabela 8).

**Tabela 7.** Prevalência de anticorpos IgM para o VVZ quanto ao sexo.

<b>VVZ IgM</b>	<b>Masculino</b>	<b>Feminino</b>	<b>Total</b>
<b>Negativos</b>	0	6	6
<b>Positivos</b>	0	1	1
<b>Indeterminado</b>	1	0	1
<b>Total (%)</b>	<b>1 (12,5)</b>	<b>7 (87,5)</b>	<b>8</b>

**Tabela 8.** Distribuição por faixa etária de anticorpos IgM para o VVZ.

<b>Faixa etária (anos)</b>	<b>Indeterminado (%)</b>	<b>Negativos (%)</b>	<b>Positivos (%)</b>	<b>Total</b>
<b>35-44</b>	0 (0,0)	4 (66,7)	0 (0,0)	4
<b>45-54</b>	1 (100,0)	1 (16,7)	0 (0,0)	2
<b>55-64</b>	0 (0,0)	1 (16,7)	0 (0,0)	1
<b>≥ 65</b>	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (100,0)	1
<b>Total</b>	<b>1</b>	<b>6</b>	<b>1</b>	<b>8</b>

### 8.3 SEQUÊNCIAS NUCLEOTÍDICAS ESPECÍFICAS UTILIZADAS PARA GENOTIPAGEM DO VVZ

As amostras amplificadas e sequenciadas foram analisadas quanto a substituições nucleotídicas em 6 posições na ORF 22, 2 posições na ORF 38 e 2 posições na ORF 54. As amostras VVZ118686 e VVZ119611 apresentaram substituições nucleotídicas nas posições nt38081 (A→C) da ORF 22 e nt95241 (T→C), nt95300 (C→T) da ORF 54. As amostras VVZ118683, VVZ118684, VVZ118685, VVZ118845, VVZ119609, VVZ119701 e VVZ119954 apresentam mudança de nucleotídeo (G→A) na posição nt69424 da ORF 38 (**Figura 5**).

Amostra	ORF 22 Nucleotídeo						ORF38 Nucleotídeo		ORF54 Nucleotídeo	
	37902	38019	38055	38081	38177	38229	69349 <i>PstI</i>	69424	95241 <i>BglI</i>	95300
Dumas	A	G	T	A	G	A	A	G	T	C
CA 123	A	G	T	C	G	G	A	G	C	T
DR	A	G	C	C	A	A	A	G	C	C
pOka	G	G	C	C	A	A	G	G	C	C
vOka	G	G	C	C	A	A	G	G	C	C
VVZ116332	A	G	T	A	A	A	A	G	T	C
VVZ116787	A	G	T	A	A	A	A	G	T	C
VVZ117441	A	G	T	A	A	A	A	G	T	C
VVZ117568	A	G	T	A	A	A	A	G	T	C
VVZ118683	A	G	T	A	A	A	A	A	T	C
VVZ118684	A	G	T	A	A	A	A	A	T	C
VVZ118685	A	G	T	A	A	A	A	A	T	C
VVZ118686	A	G	T	C	A	A	A	G	C	T
VVZ118845	A	G	T	A	A	A	A	A	T	C
VVZ119609	A	G	T	A	A	A	A	A	T	C
VVZ119611	A	G	T	C	A	A	A	G	C	T
VVZ119701	A	G	T	A	A	A	A	A	T	C
VVZ119954	A	G	T	A	A	A	A	A	T	C

**Figura 5.** Análise de variação genotípica utilizando dados de três ORFs do VVZ. Números nas linhas superiores indicam ORF e a posição do SNP no genoma. As cepas a seguir foram definidas como referência: Dumas do genótipo europeu (E); CA 123 e DR do genótipo mosaico (M); pOka e vOka do genótipo japonês (J), para comparação dos pares de bases de posições onde ocorreram mudança de nucleotídeo. O SNP da ORF54 é o sítio usado em alguns protocolos para discriminar a cepa vacinal Oka de muitas cepas desconhecidas. A cor lilás indica mutação individual intra-específica; verde indica mutações comuns com a cepa de referência do genótipo E; amarela indica mutações em comum com a cepa Oka parental genótipo J; branco indica bases em comum para ambas cepas de referência E e J.

De acordo com a conferência de 25 de julho de 2008 em Whitechapel, Londres/Reino Unido, as cepas de VVZ detectadas e caracterizadas por biologia molecular foram agrupadas em classes (1 a 5) em substituição aos genótipos

preconizados na classificação do CDC (**Figura 6**). Vale ressaltar a mutação de A para C na posição nt38081 da ORF 22, encontrada nas amostras VVZ118686 e VVZ119611.

Amostra	Genótipo	ORF 22					
		Nucleotídeo					
		37902	38019	38055	38081	38177	38229
Dumas	1	A	G	T	A	G	A
VZVi/Philadelphia.USA/73/V[3]	3	A	G	T	A	G	A
CA 123	5	A	G	T	C	G	A
DR	2	A	G	C	C	A	A
pOka	2	G	G	C	C	A	A
vOka	2	G	G	C	C	A	A
Marrocos 1	4	A	G	C	C	A	G
México 68	4	A	A	C	C	A	A
VVZ116787	1 ou 3	A	G	T	A	G	A
VVZ117332	1 ou 3	A	G	T	A	G	A
VVZ117441	1 ou 3	A	G	T	A	G	A
VVZ117568	1 ou 3	A	G	T	A	G	A
VVZ118683	1 ou 3	A	G	T	A	G	A
VVZ118684	1 ou 3	A	G	T	A	G	A
VVZ118685	1 ou 3	A	G	T	A	G	A
VVZ118686	5	A	G	T	C	G	A
VVZ118845	1 ou 3	A	G	T	A	G	A
VVZ119609	1 ou 3	A	G	T	A	G	A
VVZ119611	5	A	G	T	C	G	A
VVZ119701	1 ou 3	A	G	T	A	G	A
VVZ119954	1 ou 3	A	G	T	A	G	A

**Figura 6.** Análise de variação genotípica utilizando dados da ORF22 para discriminar os genótipos das amostras de VVZ deste estudo. Números nas linhas superiores indicam a ORF 22 e a posição nucleotídica no genoma. As cepas do VVZ Dumas (1); pOka e vOka (2); VZVi/Philadelphia.USA/73/V[3] (3); DR, Morroco 1 e Mexico 68 (4); e CA123 (5) foram adotadas como referência para as cinco classes (1 a 5). A cor verde indica mutações comuns para a cepa de referência para o genótipo 1 e 3; amarelo indica mutações comuns com a cepa de referência Oka parental para o genótipo 2; lilás indica mutações individuais específicas para cepas; branco indica bases comuns entre as cepas.

#### 8.4 CLASSIFICAÇÃO GENOTÍPICA E IDENTIFICAÇÃO DAS CEPAS

As 13 cepas identificadas neste estudo foram classificadas em classes (1 ou 3 e 5). A descrição das cepas foi padronizada de acordo com o novo sistema de nomenclatura. Entretanto, pelo fato de não ter sido realizado a diferenciação das cepas Europeias (E1 e E2), pois seria necessária a análise de SNPs das ORFs 21 e 50, estratégia normatizada no ano de 2010, as amostras com genótipo E foram enquadradas nas classes 1 ou 3. O genótipo M foi associado à classe 5 (**Tabela 9**).

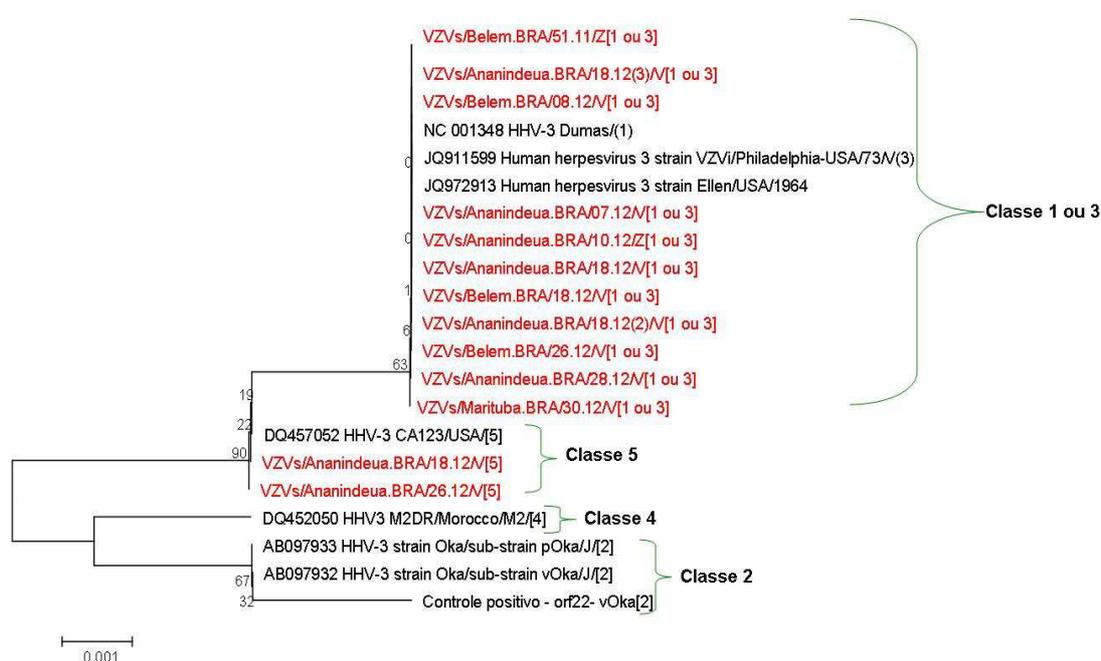
Amostra	VVZ IgG	VVZ IgM	Classificação	Nomenclatura das cepas
			(Genótipo)	
			Classe (CDC)	
VVZ116787	+	+	1 ou 3	VZVs/Belem.BRA/51.11/Z[1ou3]
VVZ117332	+	+	1 ou 3	VZVs/Ananindeua.BRA/07.12/V[1ou3]
VVZ117441	-	+	1 ou 3	VZVs/Belem.BRA/08.12/V[1ou3]
VVZ117568	-	i	1 ou 3	VZVs/Ananindeua.BRA/10.12/Z[1ou3]
VVZ118645	+	+	1 ou 3	VZVs/Ananindeua.BRA/18.12/V[1ou3]
VVZ118683	-	+	1 ou 3	VZVs/Belem.BRA/18.12/V[1ou3]
VVZ118684	+	+	1 ou 3	VZVs/Ananindeua.BRA/18.12(2)/V[1ou3]
VVZ118685	+	+	1 ou 3	VZVs/Ananindeua.BRA/18.12(3)/V[1ou3]
VVZ118686	-	+	5	VZVs/Ananindeua.BRA/18.12/V[5]
VVZ119609	+	+	1 ou 3	VZVs/Belem.BRA/26.12/V[1ou3]
VVZ119611	+	-	5	VZVs/Ananindeua.BRA/26.12/V[5]
VVZ119701	+	-	1 ou 3	VZVs/Ananindeua.BRA/28.12/V[1ou3]
VVZ119954	+	-	1 ou 3	VZVs/Marituba.BRA/30.12/V[1ou3]

i = Indeterminado, amostra com resultado de sorologia no *cut-off* do teste.

**Tabela 9.** Descrição dos genótipos segundo a Conferência de Londres/2008

Os genótipos 1 ou 3 foram encontrados em 11 amostras VVZ (9 casos de varicela e 2 casos de herpes zoster), com maior frequência no sexo masculino (63,9%) e com prevalência nas faixas etárias de 5 a 9 anos e 30 a 35 anos, enquanto que 2

amostras apresentaram o genótipo 5 (ambos casos de varicela), na faixa etária de 5 a 9 anos, presente apenas no sexo feminino. A análise filogenética mostra a distribuição das cepas dentro das classes de 1 a 5. Essas amostras são oriundas dos municípios de Ananindeua (sete casos de varicela e um de herpes zoster), Belém (três casos de varicela e um de herpes zoster) e Marituba (um caso de varicela) (**Figura 7**).



**Figura 7:** Análise filogenética utilizando o método de agrupamento de vizinhos (*Neighbour-joining* - NJ) baseada no polimorfismo nucleotídico da ORF22 (447 pb) envolvendo 13 amostras dos municípios de Belém, Ananindeua e Marituba. As cepas de referência utilizadas foram Dumas representando o genótipo 1; pOka e vOka referência do genótipo 2; VZVi/Philadelphia.USA/73/V[3] referência do genótipo 3; DR e Morroco 1 referência do genótipo 4; e CA 123 referência do genótipo 5. Os valores de *bootstrap* (2.000 pseudoréplicas) estão indicados nos nós da árvore.

## 9. DISCUSSÃO

Este é um estudo inédito de investigação genotípica do VVZ na Região Norte do Brasil, adotando SNPs para análise das diferenças entre as cepas dos genótipos 1 a 5, de acordo com a classificação de Breuer et al., (2010). A preferência por este método baseou-se no fato de que as técnicas de genotipagem geralmente utilizadas no laboratório devem ser de simples execução e capazes de atingir resultados satisfatórios em amostras com quantidade limitada de DNA, como por exemplo, a partir de vesículas e crostas.

Alguns estudos mostram que extração e purificação de ácido nucleico nem sempre é necessária para realização da PCR (PANDORI et al., 2006; BEZOLD et al., 2000). A amplificação do material torna-se rápida, sensível e com um custo efetivo menor, principalmente quando muitas amostras são analisadas (SAKAI et al., 2008). As amostras deste estudo foram imersas em solução de água destilada e armazenadas em freezer a -70°C, por vários meses sem deteriorização em qualidade, mesmo após vários ciclos de congelamento e descongelamento.

Leung et al., (2010) mostraram que a PCR de material direto de vesículas é extremamente sensível e específica para detecção do VVZ, e espécimes de saliva podem funcionar como uma ferramenta de suporte para o diagnóstico em determinados casos.

A análise das seqüências das ORFs 22, 38 e 54 foi realizada por sequenciamento e associou a semelhança das cepas encontradas nesta pesquisa com as classificadas dentro das classes 1 a 5. Do total de 13 cepas isoladas, apenas duas apresentaram genótipo 5.

Vários estudos demonstraram uma distribuição geográfica distinta dos principais genótipos do VVZ quando compararam as regiões de clima temperado com a tropical (BARRET-MUIR et al., 2003; DAYAN et al., 2004; LOLEKHA et al., 2001; LOPAREV et al., 2007a; QUINLIVAN et al., 2002; WAGENAAR et al., 2003). O domínio regional de genótipos específicos poderia ter sido estabelecido pelo clima e/ou outros fatores, como interações hospedeiro-vírus ou introdução de cepas, para população inócua ao VVZ, através da imigração ou viagens. Estratégias modernas de genotipagem podem ajudar a resolver essas questões. LOPAREV et al., (2007a) estabeleceram as regiões em que vários genótipos VVZ predominam, e esses dados, combinados com os padrões migratórios históricos humanos, contribuem para identificar os prováveis pontos de origem para esses genótipos. A presença de dois tipos diferentes de genótipos em nosso estudo pode estar associado a um ou mais destes fatores.

Dayan et al., (2004) , na Argentina, utilizaram a mesma técnica de análise da ORF 22, em amostras de *swab* de vesículas e encontrou apenas cepas do genótipo E em amostras de 13 crianças com varicela.

Os resultados deste estudo, realizado na região metropolitana de Belém, também mostram um predomínio do genótipo Europeu (classe 1 ou 3) em 11 amostras com VVZ, e diferem, portanto, do realizado por Barret-Muir e et al., (2003), no qual, de 10 amostras com VVZ coletadas no Brasil, oito cepas foram classificadas dentro do genótipo 5 e apenas duas como pertencentes a classe 1 ou 3.

O genoma do VVZ é muito estável e a variação na sequência do DNA observada ocorre geralmente como mutações pontuais individuais. Esta justificativa é plausível e indica que um pequeno número de variantes favorecidas ocorram independentemente entre as cepas do tipo selvagem, em mais de uma localização geográfica. A literatura

destaca que não se pode descartar a possibilidade de que o VVZ de genótipo M tenha surgido primeiramente nas regiões tropicais, quando sofreram mutações depois que ocorreram as migrações humanas para o clima temperado (LOPAREV et al., 2004).

Cepas J e E podem ter surgido independentemente da M como resultado do isolamento das ilhas japonesas e as explorações e colonização dos europeus em diversos continentes, respectivamente.

Os resultados dos testes sorológicos para detecção de anticorpos anti-VVZ IgM revelaram quais pacientes apresentavam infecção recente, observando-se que nove amostras genotipadas apresentaram resultados positivos para este teste. Três amostras com sorologia IgM negativa, coletadas entre o segundo e terceiro dia após os sintomas, foram sequenciadas em regiões das ORFs 22, 38 e 54 do VVZ, o que pode ser explicado pelo fato de que os anticorpos IgM surgem entre o sexto e décimo quinto dia após aparecimento dos sintomas (VIZOSO PINTO et al., 2010). As amostras deste estudo foram coletadas, em geral, entre o segundo e décimo dia após surgimento das vesículas, pela necessidade de detecção do DNA viral, principalmente deste tipo de material.

Os anticorpos anti-VVZ IgM no soro de pacientes não são marcadores confiáveis de infecção aguda para o diagnóstico de herpes zoster e até mesmo no soro de pacientes convalescentes apenas 38% das amostras apresentam reação positiva (SAKAI et al., 2008). Portanto, soropositividade IgM indica exposição a antígenos recente e não faz distinção entre a infecção primária, reinfeção ou reativação de infecção prévia. Teste de avidéz IgG pode revelar-se útil para diferenciar respostas imunológicas primárias e secundárias (DANGEL et al., 2006).

Amostras de soro, *swab* de vesícula e de saliva foram coletadas de um paciente que recebeu vacina contra o VVZ, em uma clínica da rede particular de saúde de Belém, e apresentou febre e algumas vesículas cerca de seis dias após a vacinação. As amostras foram coletadas quatro dias após o aparecimento dos sintomas, porém não foi possível detectar a presença de DNA viral nas amostras. Entretanto, a sorologia IgM apresentou-se positiva, o que sugere que provavelmente a infecção ocorreu antes da vacina.

A segurança da vacina tem sido descrita em estudos pré e pós-licenciamento de uso. A vacinação é de 80% a 85% efetiva na prevenção de varicela e apresenta 95% de eficácia na prevenção de doença severa (SCHIMD & JUMAAN et al., 2010). Uma pequena porcentagem de pacientes (< 5%) desenvolve pápulas e vesículas, normalmente no local da injeção cerca de seis semanas após a vacinação (WISE et al., 2000; SHARRAR et al., 2000).

A cepa vOka também pode estabelecer infecção em indivíduos vacinados, o que aparentemente reflete um quadro clínico de reativação deste tipo causando herpes zoster. Esta reativação normalmente ocorre na forma de dermatoma no local em que a vacina foi administrada (SAUERBREI et al., 2004; GERSHON et al., 2001; UEBE et al., 2002; SAUERBREI et al., 2003).

O Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos (Bio-Manguinhos) está construindo uma nova estrutura de vacinas virais, objetivando a produção da tríplice viral, onde também poderá ser produzida a vacina contra o VVZ, com possível clonagem do vírus ou transferência tecnológica (BUSS et al., 2005). Outra opção de vacina contra varicela é a combinação da vacina contra sarampo, caxumba, rubéola (MMR) e varicela (MMRV), disponibilizada em esquema de duas doses (SHINEFIELD et al., 2005).

MMRV substituiria MMR sem custos adicionais de administração, visto que o custo adicional seria equivalente a diferença da compra das duas vacinas. Estudos apontam que a redução do número de injeções contribuiu muito para o aumento da aceitação e cobertura da vacina (BUSS et al., 2005).

A análise das cepas circulantes no Brasil permitiria, por exemplo, a associação de quadros clínicos graves à infecção por determinada cepa. Além disso, estudos comparando as cepas vacinais com cepas VVZ circulantes no país possibilitariam uma avaliação mais detalhada em relação ao esclarecimento de sintomas pós-vacinal, pois permitiria avaliar se uma infecção está sendo causada pelo vírus vacinal ou se o indivíduo adquiriu incidentalmente o vírus selvagem próximo ao período de vacinação, associando o aparecimento de vesículas a vacina.

Na Índia, pesquisadores observaram em avaliações clínicas que estudantes com varicela apresentavam vesículas largas com tamanho maior que oito milímetros em diâmetro, semelhante ao que ocorre com pacientes adultos do sexo masculino infectados pelo genótipo classe VI do VVZ (KOLESNIK et al., 2012). Duas regiões do VVZ que têm sido utilizadas para investigar as transmissões hospitalares são a R1 na ORF 11 (MOLYNEAUX et al, 2006, TANG et al, 2005) e OriS (BREUER, et al., 2010). No entanto, os parâmetros precisos que informarão a sua utilização para a investigação de surtos ainda não estão estabelecidos. Os genótipos mais associados com hospitalizações de pacientes com varicela continuam desconhecidos, e a virulência de um genótipo pode ser influenciada mais pelo nível de resposta do hospedeiro e sua imunidade que por um genótipo específico.

Uma vigilância quanto aos tipos de genótipos do VVZ é importante, especialmente para monitoramento de eventos adversos futuros causados pela varicela

e a análise de polimorfismos no genoma do vírus em momentos diferentes permitiria estimar sua taxa evolucionária (KOLESNIK et al., 2012).

É evidente que estudos relacionados à descoberta dos genótipos do VVZ, bem como, o acompanhamento dos dados pré e pós-vacinais em pesquisas experimentais facilitariam a decisão para implantação da vacina pelo Programa Nacional de Imunização (PNI), visto que diversos trabalhos fornecem informações sobre a presença de genótipos em países que já utilizam a vacina contra o VVZ no calendário anual de imunização.

Neste estudo foi possível a genotipagem de apenas duas amostras de pacientes com herpes zoster. A análise genotípica em amostras de pacientes com herpes zoster poderia proporcionar uma avaliação mais detalhada de quanto tempo determinada cepa circula no país, além de avaliar as cepas mais associadas à reativação viral e surgimento do herpes zoster anos após a infecção primária pelo VVZ.

A infecção primária com VVZ ocorre geralmente durante a infância, por volta dos 10 anos de idade (GNANN & WHITLEY et al., 2002). O herpes zoster desenvolve-se a partir da reativação do VVZ e a cepa isolada em casos de zoster é a mesma encontrada em infecções por este vírus adquirida na infância. Portanto, uma cepa do VVZ isolado de uma paciente de 70 anos, na Coréia do Sul, com herpes zoster provavelmente circulou cerca de 60 anos atrás, na década de 40 (KIM et al., 2011). Neste estudo, a amostra de VVZ a partir de um caso de herpes zoster em adulto de 65 anos, oriundo de Belém-Pará, revelou cepa da classe 1 ou 3, sugerindo que a mesma já circula por, no mínimo, cerca de cinco décadas no Brasil. Outra amostra de paciente com herpes zoster também foi genotipada como 1 ou 3, este com idade de 45 anos, o qual sempre residiu em Ananindeua.

A análise das ORFs 21 e 50 é necessária para definição das cepas de genótipo Europeu (E1 e E2) em classe 1 ou 3. Outros estudos de genotipagem são necessários para acompanhar o possível impacto da vacinação na circulação de genótipos do VVZ no Brasil, além de possíveis associações com diferentes quadros clínicos e a possibilidade de análise da taxa evolucionária do vírus.

## 10. CONCLUSÃO

- As amostras do presente estudo pertencem as classes 1 ou 3 e classe 5.
- O genótipo Europeu (classe 1 ou 3) foi encontrada nos municípios de Ananindeua, Belém e Marituba.
- O genótipo 5 foi encontrado apenas no município de Ananindeua.
- Três amostras com sorologia IgM negativas tiveram genotipagem concluída, duas da classe 1 ou 3 e uma do genótipo 5.
- A PCR funcionou apenas com 13 amostras de material direto de vesículas, enquanto que em amostras de saliva não se obteve sucesso.
- Os espécimes clínicos de vesículas foram utilizados na PCR, com sucesso em 13 amostras, sem utilização de *kit* comercial para extração de DNA.
- A genotipagem do VVZ em amostras de pacientes com herpes zoster sugere a possibilidade de que o genótipo Europeu (classe 1 ou 3) circula há mais de 50 anos na região estudada.
- É necessária a investigação dos SNPs das ORFs 21 e 50 para diferenciação do genótipo Europeu E1 em classe 1 e E2 em classe 3.
- O estudo dos genótipos possibilita a análise de infecção pós-vacinal pelo VVZ, possibilitando distinção do vírus selvagem.
- Este é um estudo inédito no Brasil, pois é a primeira vez que o VVZ tem o genótipo definido por testes realizados em uma instituição de pesquisa nacional.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARBETER, A.M. Clinical trials of varicella vaccine in healthy adolescents and adults. **Infectious disease clinics of North America**, 10: p. 609-615, 1996.

ARVIN, A.M. Varicella-Zoster Virus. **Clinical Microbiology Reviews**, 9 (3): p. 361-381, 1996.

BALDACCI, E.R., VICO, E.S.R. Mortalidade por varicela em crianças atendidas em creche (São Paulo). **Pediatria**, 23 (3): p. 213-216, 2001.

BARINGER, JR. Herpes simplex virus and Bell palsy. **Annals of internal medicine**, 124: p. 63– 65, 1996.

BARRET-MUIR, W., HAWRAMI, K., CLARKE, J., BREUER, J. Investigation of varicella-zoster virus variation by heteroduplex mobility assay. **Archives of virology**, 17: p. 17-25, 2001.

BARRETT-MUIR, W., SCOTT, F.T., AABY, P., JOHN, J., MATONDO, P., CHAUDHRY, Q.L., SIQUEIRA, M., POULSEN, A., YAMINISHI, K., BREUER, J. Genetic variation of varicella-zoster virus: evidence for geographical separation of strains. **Journal of medical virology**, 70(1): p. 42-47, 2003.

BELLESI, N., MONTEIRO, T.A.F., LINHARES, A.C. Imunidade para varicela entre habitantes de Belém, Pará. **Revista Brasileira de alergologia e imunopatologia**, 23(3): p. 100-104, 2000.

BEZOLD, G., VOLKENANDT, M., GOTTLOBER, P., PETER, R.U. Detection of herpes simplex virus and varicella-zoster virus in clinical swabs: frequent inhibition of PCR as determined by internal controls. **The Journal of Molecular Diagnostics**, 5: p. 279-284, 2000.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica, Brasília. Varicela/Herpes zoster. **Doenças infecciosas e parasitárias: guia de bolso**, 7: p. 351-358, 2008.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica, Brasília. Varicela/Herpes zoster. **Doenças infecciosas e parasitárias: guia de vigilância epidemiológica**, 8: p. 419-427, 2010.

BREUER, J., GROSE, C., NORBERG, P., TIPPLES, G., SCHMID, D.S. 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, 24-25 July 2008. **The Journal of General Virology**, 91 (4): p. 821-828, 2010.

BRICKS, L.F., SATO, H.K., OSELKA, G.W. Vacinas contra varicela e vacina quádrupla viral. **Jornal de Pediatria**, 82 (3): p. 101-108, 2006.

BRISSON, M., EDMUNDS, W.J., LAW, B., GAY, N.J., WALLD, R., BROWNELL, M., ROOS, L., DE SERRES, G. Epidemiology of varicella zoster virus infection in Canada and the United Kingdom. **Epidemiology and Infection**, 127 (2): p. 305-314, 2001.

BUSS, P.M., TEMPORAO, J.G., CARVALHEIRO, J.R. Vacinas, Soros e Imunizações no Brasil, RJ: Editora Fiocruz, 2005.

CARVALHO, E.S., MARTINS, R.M. Varicela: aspectos clínicos e prevenção. **Jornal de Pediatria**, 75 (1): p. 126-134, 1999.

CENSO 2010. Disponível em <http://www.censo2010.ibge.gov.br>. Acesso em: 15/12/2011.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). Prevention of varicella. Update recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP). **Morbidity and Mortality Weekly Report Recommendations and Report**, 48: p. 1-5, 1999.

CHARTRAND, S.A. Varicella vaccine. **Pediatrics clinics of North America**, 47:373-94, 2000.

CHAVES, S.S., GARGIULLO, P., ZHANG, J.X., CIVEN, R., GURIS, D., MASCOLA, L., SEWARD, J.F. Loss of vaccine-induced immunity to varicella over time. **The New England Journal of Medicine**, 356: p. 1121-1129, 2007.

CHONG, C.Y., LIM, S.H., WYM, NG., TEE, N., LIN, RVTP. Varicella screening and vaccination for healthcare workers at KK Women's and Children's Hospital. **Annals of the Academy of Medicine, Singapore**, 33: p. 243-247, 2004.

CHOO, P.W., DONAHUE, J.G., MANSON, J.E., PLATT, R. The epidemiology varicella and its complications. **The Journal of Infectious Disease**, 172: p. 706, 1995.

CLEMENS, S.A.C., AZEVEDO, T., FONSECA, J.C., SILVA, A.C., SILVEIRA, T.R., CLEMENS, R. Soroepidemiologia da varicela no Brasil – resultados de um estudo prospectivo transversal. **Jornal de Pediatria**, 75: p. 433-41, 1999.

CLEMENTS, D.A., MOREIRA, S.P., COPLAN, P.M., BLAND, C.L., WALTER, E.B. Post licensure study of varicella vaccine effectiveness in a daycare setting. **Pediatric Infectious Disease Journal**, 18: p. 1047-50, 1999.

COLLINS, F.S. Sequencing the human genome. **Hospital practice (Minneapolis)**, 32: p. 35-54, 1997.

COSTA, M.R.M., RAMOS, C.S., MONTEIRO, T.A.F. Prevalência de IgG do vírus varicela-zoster (VVZ) em indígenas da tribo Araweté, em Altamira, Pará, de janeiro-fevereiro de 2001. **Revista Paraense de Medicina**, 20 (4): p. 23-28, 2006.

DANGEL, V., BADER, U., ENDERS, G. Improvement of cytomegalovirus avidity testing by adjusting the concentration of CMV-specific IgG in test samples. **Journal of clinical virology**, 35(3): p. 303-309, 2006.

DAVISON, AJ; SCOTT, JE. The complete DNA sequence of varicella-zoster virus. **The Journal of general virology**, 67: p. 1759–1816, 1986.

DAYAN, G.H., PANERO, M.S., DEBBAG, R., URQUIZA, A., MOLINA, M., PRIETO, S., DEL CARMEN PEREGO, M., SCAGLIOTTI, G., GALIMBERTI, D., CARROLI, G., WOLFF, C., SCHMID, D.S., LOPAREV, V., GURIS, D., SEWARD, J. Varicella seroprevalence and molecular epidemiology of varicella-zoster virus in Argentina. **Journal of clinical microbiology**, 42 (12): p. 5698-5704, 2004.

DEVEREUX, J., HAEBERLI, P., SMITHIES, O. A comprehensive set of sequence analysis programs of the VAX. **Nucleic Acids Research**, 12: p. 387-395, 1984.

ENDERS, G., MILLER, E., CRADOCK-WATSON, J., BOLLEY, I., RIDEHALGH, M. Consequences of varicella and herpes zoster in pregnancy: prospective study of 1739 cases. **Lancet**, 343: p. 1548-1551, 1994.

ENDO, A., IZUMI, H., MIYASHITA, M., OKUBO, O., HARADA, K. Facial palsy associated with mumps parotitis. **The Pediatric infectious disease journal**, 20: p. 815–816, 2001.

FAGA, B., MAURY, W., BRUCKNER, D.A., GROSE, C. Identification and mapping of single nucleotide polymorphisms in the varicella-zoster virus genome. **Virology**, 280: p. 1-6, 2001.

FURUTA, Y., OHTANI, F., SAWA, H., FUKUDA, S., INUYAMA, Y. Quantitation of Varicella-zoster virus DNA in patients with Ramsay Hunt syndrome e zoster sine herpette. **Journal of clinical microbiology**, 39 (8): p. 2856-2859, 2001.

FURUTA, Y., FUKUDA, S., SUZUKI, S., TAKASU, T., INUYAMA, Y., NAGASHIMA, K. Detection of varicella-zoster virus DNA in patients with acute peripheral facial palsy by the polymerase chain reaction, and its use for early diagnosis of zoster sine herpette. **Journal of medical virology**, 52: p. 316 –319, 1997.

FURUTA, Y., OHTANI, F., AIZAWA, H., FUKUDA, S., KAWABATA, H., BERGSTROM, T. Varicella-zoster virus reactivation is an important cause of acute peripheral facial paralysis in children. **The Pediatric infectious disease journal**, 24(2): p. 97-101, 2005.

GERSHON, A.A., STEINBERG, S.P., SILBER, R. Varicella-zoster viremia. **The Journal of Pediatrics**, 92: p. 1033-1036, 1978.

GERSHON, A.A., STEINBERG, S.P. Cell-mediated immunity to varicella-zoster virus measured by virus inactivation: mechanism and blocking of their action by specific antibody. **Infection and Immunity**, 25: p. 164-69, 1979.

GERSHON, A.A., TAKAHASHI, M., WHITE, C.J. **Varicella vaccine**. In: PLOTKIN, S.A., ORESTEIN, W, editors. Vaccines. Third edition. Philadelphia: Saunders, 1999. p. 475-507.

GERSHON, A.A. The current status of live attenuated varicella vaccine. **Archives of virology**, (17): p. 1-6, 2001.

GERSHON, A., SILVERSTEIN, S. Varicella-zoster virus. In: RICHMAN, D., WHITLEY, R., HAYDEN, F., (ed). **Clinical virology, American Society Microbiology - ASM Press**, Washington, D.C. 2<sup>nd</sup> ed., 2002.

GILDEN, D., DUELAND, A., DEVLIN, M., MAHLINGHAM, R., COHRS, R. Varicella-zoster virus reactivation without rash. **The Journal of Infectious Disease**, 166: p. 30-34, 1992.

GNANN, J.W., WHITLEY, R.J. Clinical practice. Herpes zoster. **The New England Journal of Medicine**, 347: p. 340-346, 2002.

GOLD, E. Serologic and virus-isolation studies of patients with varicella or herpes zoster infection. **The New England journal of medicine**, 274: p. 181-85, 1966.

GOMI, Y., SUNAMACHI, H., MORI, Y., NAGAIKE, K., TAKAHASHI, M., YAMANISHI, K. Comparison of the complete DNA sequences of the Oka varicella vaccine and its parental virus. **Journal of virology**, 76 (22): p. 11447-11459, 2002.

GORDON, J.E. Chicken pox: an epidemiologic review. **North American Journal of Medical Sciences**, 244: p. 362-370, 1962.

GRANT, R.M., WEITZMAN, S.S., SHERMAN, C.G., SIRKIN, W.L., PETRIC, M., TELLIER, R. Fulminant disseminated varicella-zoster virus infection without skin involvement. **Journal of clinical virology**, 24: p. 7-12, 2002.

GROSE, C., BONTHIUS, D., AFIFI, A.K. Chickenpox and the geniculate ganglion: facial nerve palsy, Ramsay Hunt syndrome and acyclovir treatment. **The Pediatric infectious disease journal**, 21: p. 615– 617, 2002.

GROSE, C.H. Variation on a theme by Fenner: the pathogenesis of chickenpox. **Pediatrics**, 68 (5): p. 735-737, 1981.

GUESS, H.A., BROUGHTON, D.D., MELTON, L.J., KURLAND, L.T. Population studies of varicella complications. **Pediatrics**, 78 (S1): p. 723, 1986.

HAMBLETON, S., GERSHON, A.A. Preventing Varicella-zoster disease. **Clinical Microbiology Reviews**, 18 (1): p. 70-80, 2005.

HARGER, J.H., ERNEST, J.M., THURNAU, G.R., MOAWAD, A., MOMIROVA, V., LANDON, M.B., PAUL, R., MODOVNIK, M., DOMBROWSKI, B. SIBAI, B., VAN DORTEN, P. Risk factors and outcome of varicella-zoster virus pneumonia in pregnant women. **The Journal of infectious disease**, 185: p. 422-427, 2002.

HEININGER, U., SEWARD, J.F. Varicella. **Lancet**, 368: p. 1365-76, 2006.

HOPE-SIMPSON, R.E. The nature of herpes zoster: along term study and a new hypothesis. **Proceedings of the Royal Society of Medicine**, 58: p. 9-20, 1965.

IZURIETA, H.S., STREBEL, P.M., BLAKE, P.A. Postlicensure effectiveness of varicella vaccine during an outbreak in a child care center. **JAMA**, 278: p. 1495-1499, 1997.

JUNKER, A.K., ANGUS, E., THOMAS, E.E. Recurrent Varicella-Zoster Virus infections in apparently immunocompetent children. **Pediatric Infectious Diseases**, 10: p. 569, 1991.

KIM, K., CHOI, Y.J., SONG, K., PARK, W.B., JEON, J., PARK, S., KIM, H.B., KIM, N.J., OH, M. Genotype of varicella-zoster virus isolates in South Korea. **Journal of Clinical Microbiology**, 49 (5): p. 1913-1916, 2011.

KIMURA, M. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitution through comparative studies of nucleotide sequences. **Journal of General Virology**, 77: p. 1761-1768, 1980.

KOLESNIK, M., BONNEKOH, B., TAMMER, I., GOLLNICK, H., SAUERBREI, A. Varicella Outbreak in an Indian Couple Living in Germany Caused by VZV Clade VI Acquired during a Trip to The Netherlands. **Case Reports in Medicine**, 2012: 838241, doi: 10.1155/2012/838241, 2012.

KOREN, G., MONEY, D., BOUCHER, M., AOKI, F., PETRIC, M., INNOCECION, G., WOLOSK, M., REMPLER, V., PELLAND, F., GEIST, R., HO, T., BRA-OZ, B., LOEBSTEIN, R. Serum concentrations, efficacy, and safety of a new, intravenously administered varicella zoster immune globulin in pregnant women. **British Journal of Clinical Pharmacology**, 42: p. 267-74, 2002.

KOSKINIEMI, M., LAPPALAINEN, M., SCHMID, D.S., RUBTCOVA, E., LOPAREV, V.N. Genotypic analysis of varicella-zoster virus and its seroprevalence in Finland. **Clinical and Vaccine Immunology**, 14 (9): p. 1057-1061, 2007.

KUMAR, S., TAMURA, K., NEI, M. MEGA 3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. **Briefings in Bioinformatics**, 5: p. 150-163, 2004.

KUTER, B., MATTHEWS, H., SHINEFIELD, H. Ten year follow-up of healthy children who received one or two injections of varicella vaccine. **Pediatric Infectious Disease Journal**, 23: p. 132-137, 2004.

LEUNG, J., HARPAZ, R., BAUGHMAN, A.L., HEATH, K., LOPAREV, V., VAZQUEZ, M., WATSON, B.M., SCHMID, D.S. **Clinical Infectious Diseases**, 51 (1): p. 23-32, 2010.

LI, S., CHAN, I.S., MATTHEWS, H. Inverse relationship between six week postvaccination varicella antibody response to vaccine and likelihood of long term breakthrough infection. **Pediatric Infectious Disease Journal**, 21: p. 337-342, 2002.

LOLEKHA, S., TANTHIPHABLA, W., SORNCHAI, P., KOSUWAN, P., SUTRA, S., WARACHIT, B., CHUP-UPPRAKARN, S., HUTAGALUNG, Y., WEIL, J., BOCK, H.L. Effect of climatic 26 factors and population density on varicella zoster virus epidemiology within a tropical country. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, 64: p. 131-136, 2001.

LOPAREV, V.N., GONZALEZ A., CARNES, M.D., TIPPLES, G., FICKENSCHER, H., TORFASON, E.G., SCHMID, D.S. Three major genotypes of varicella-zoster virus: geographical clustering and strategies for genotyping. **Journal of virology**, 78: p. 8349–8358, 2004.

LOPAREV, V.N., MARTRO, E., RUBTCOVA, E., RODRIGO, C., PIETTE, J.C., CAUMES, E., VERNANT, J.P., SCHMID, D.S., FILLET, A.M. Toward universal varicella-zoster virus (VZV) genotyping: diversity of VZV strains from France and Spain. **Journal of Clinical Microbiology**, 45: p. 559-563, 2007a.

LOPAREV, V.N., RUBTCOVA, E.N., BOSTIK, V., GOVIL, D., BIRCH, C.J., DRUCE, J.D., SCHMID, D.S. 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. **Journal of Virology**, 81: p. 12758-12765, 2007b.

LOPEZ, A.S., GURIS, D., ZIMMERMAN, L. One dose of varicella does not prevent school outbreaks: is it time for a second dose? **Pediatrics**, 117: p. 1070-1077, 2006.

MALAVIGE, G.N., JONES, L., KAMALADASA, S.D., WIJEWICKRAMA, A., SENEVIRATNE, S.L., BLACK, A.P., OGG, G.S. Viral load, clinical disease severity and cellular immune responses in primary varicella zoster virus infection in Sri Lanka. **PLoS ONE**, 3 (11): p. 3789, 2008.

MANDELL, G.L., DOUGLAS, R.G., BENNET, J.E. **Principles and practice of infectious diseases**. 5 ed. New York: Churchill Livingstone, 2000.

MANNING, J.J., ADOUR, K.K. Facial paralysis in children. **Pediatrics**, 49: p. 102–109, 1972.

MOCARSKI J.R., E.S. In: ARVIN, A., CAMPADELLI-FIUME, G., MOCARSKI,E., MOORE, P.S., ROIZMAN, B., WHITLEY, R., YAMANISHI, K., editors. Comparative analysis of herpesvirus-common protein. **Human Herpesviruses: Biology, Therapy, and Immunoprophylaxis**. Cambridge: Cambridge University Press, Chapter 4, 2007.

MOLINEAUX , P.J., PARKER, S., KHAN, I.H, MILLAR, C.G., BREUER, J. Use of genomic analysis of varicella-zoster virus to investigate suspected varicella-zoster transmission within a renal unit. **Journal of clinical virology**, 36: p. 76-78, 2006.

MORI, T., NAGAI, K., ASANUMA, H. Reactivation of varicella-zoster virus in facial palsy associated with infectious mononucleosis. **The Pediatric infectious disease journal**, 21: p. 709-711, 2002.

MUIR, W.B., NICHOLS, R., BREUER, J. Phylogenetic analysis of varicella-zoster virus: evidence of intercontinental spread of genotypes and recombination. **Journal of Virology**, 76: p. 1971-1979, 2002.

NACI – NATIONAL ADVISORY COMMITTEE ON IMMUNIZATION. AN ADVISORY COMMITTEE STATEMENT (ACS). NACI update to statement on varicella vaccine. **Canada communicable disease report**, 28 (3): p. 1-7, 2002.

NGAI, AL, STAEHLE BO, KUTER, BJ. Safety and immunogenicity of one vs. two injections of Oka/Merck varicella vaccine in healthy children. **Pediatric Infectious Disease Journal**, 15: p. 49-54, 1996.

NORBERG, P., LILJEQVIST, J.A., BERGSTROM, T., SAMMONS, S., SCHMID, D.S., LOPAREV, V.N. Complete genome phylogenetic approach to varicella-zoster virus evolution: genetic divergence and evidence for recombination. **Journal of Virology**, 80: p. 9569-9576, 2006.

OOI, P.L., GOH, K.T., DORAISINGHAM, S., LING, A.E. Prevalence of varicella-zoster virus infection in Singapore. Southeast. **The Southeast Asian journal of tropical medicine and public health**, 23 (1): p. 22-25, 1992.

PANDORI, M.W., LEI, J., WONG, E.H., KLAUSNER, J., LISKA, S. Real-Time PCR for detection of herpes simplex virus without nucleic acid extraction. **BMC Infectious Diseases**, 6: p. 104, 2006.

PATEL, P.A., YOONESSI, S., O'MALLEY, J., FREEMAN, A., GERSHON, A., OGRA, P.L. Cell-mediated immunity to varicella-zoster virus infection in subjects with lymphoma or leukemia. **The journal of pediatrics**, 94: p. 223-230, 1979.

PETERS, G.A., TYLER, S.D., GROSE, C., SEVERINI, A., GRAY, M.J., UPTON, C., TIPPLES, G.A. A full-genome phylogenetic analysis of Varicella-zoster virus reveals a novel origin of replication-based genotyping scheme and evidence recombination between major circulating clades. **Journal of Virology**, 80 (19): p. 9850-9860, 2006.

PICKERING, L.K. **Varicella**. In: Red Book: Report of the Committee on Infectious Diseases. 25 ed. Elk Grove Village (IL-USA): American Academy of Pediatrics, 2000.

PINQUIER, D., GAGNEUR, A., BALU, L., BRISSAUD, O., GRAS LE GUEN, C., HAURAINSARD, I., MORY, O., PICHEROT, G., DE PONTUAL, L., STEPHAN, J.L., MAPLE, P., BREUER, J., AUBERT, M., CAULIN, E., SANA, C., PRADAT, P., SOUBEYRAND, B., REINERT, P. Prevalence of varicella-zoster virus antibodies in French infants under 15 months of age. **Clinical and vaccine immunology**, 16: p. 484-7, 2009.

QUINLIVAN, M., HAWRAMI, K., BARRET-MUIR, W., AABY, P., ARVIN, A., CHOW, V.T., JOHN, T.J., MATONDO, P., PEIRIS, M., POULSEN, A., SIQUEIRA, M., TAKAHASHI, M., TALUKDER, Y., YAMANISHI, K., LEEDHAM-GREEN, M., SCOTT, F.T., THOMAS, S.L., BREUER, J. The molecular epidemiology of varicella-zoster virus: evidence for geographic segregation. **The Journal of Infectious Disease**, 186: p. 888-894, 2002.

RAWSON, H., CRAMPIN, A., NOAH, N. Deaths from chickenpox in England and Wales 1995-7: analysis of routine mortality data. **BMJ (Clinical research ed.)**, 323 (7321): p. 1091-1093, 2001.

REIS, A.D., PANNUTI, C.S., SOUZA, V.A.U.F. Prevalência de anticorpos para o vírus da varicela-zoster em adultos jovens de diferentes regiões climáticas brasileiras. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 36 (3): p. 317-20, 2003.

ROUSH, S.W., MCINTRE, L., BALDY, L.M. **Manual for the surveillance of vaccine-preventable diseases**, 4<sup>th</sup>, Atlanta, GA. Centers for Disease Control and Prevention, 2008.

SAITOU, N., NEI, M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. **Molecular biology and evolution**, 4: p. 406-425, 1987.

SAKAI, K., WAKASUGI, S., MUCHEMWA, F.C., IHN, H. Quick detection of herpes viruses from skin vesicles and exudates without nucleic acid extraction using multiplex PCR. **Bioscience trends**, 2 (4): p. 164-168, 2008.

SANGER, F., NICKLEN, S., COULSON, A.R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proceedings of the National Academy of Sciences, USA**, 74: p. 5463-5467, 1977.

SAUERBREI, A., UEBE, B., WUTZLER, P. Molecular diagnosis of zoster post varicella vaccination. **Journal of clinical virology**, 27(2): p. 190-9, 2003.

SAUERBREI, A., RUBTCOVA, E., WUTZLER, P., SCHMID, D.S., LOPAREV, V.N. Genetic profile of an Oka varicella vaccine virus variant isolated from an infant with zoster. **Journal of clinical microbiology**, 42 (12): p. 5604-5608, 2004.

SAUERBREI, A. Preventing congenital varicella syndrome with immunization. **Canadian Medical Association journal**, 183 (3): p. 169-70, 2011.

SCHMID, D.S., JUMAAN, A.O. Impact of Varicella Vaccine on Varicella-Zoster Virus Dynamics. **Clinical Microbiology Reviews**, 23 (1): p. 202-217, 2010.

SENGUPTA, N., BOOY, R., SCHIMITT, H.J., PELTOLA, H., VAN-DAMME, P., SCHUMACHER, R.F., CAMPINS, M., RODRIGO, C., HEIKKINEN, T., SEWARD, J., JUMAAN, A., FINN, A., OLCEN, P., THIRY, N., WEIL-OLIVER, C., BREUER, J. Varicella vaccination in Europe: are we ready for a universal childhood programme? **European Journal of Pediatrics**, 167: p. 47-55, 2008.

SENGUPTA, N., TAHA, Y., SCOTT, F.T., LEEDHAM-GREEN, M.E, QUINLIVAN, M., BREUER, J. Varicella-zoster virus genotypes in East London: a prospective study in patients with herpes zoster. **The Journal of Infectious Disease**, 196: p. 1014-1020, 2007.

SES/CVE-SP – Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo. Centro de Vigilância Epidemiológica “Prof. Alexandre Vranjac”. Divisão de Doenças de Transmissão Respiratória e Divisão de Imunização. **Instruções sobre a utilização de imunobiológicos para controle de varicela em creches [informe técnico on line]**. São Paulo; 2003. Disponível em: <<http://www.cve.saude.sp.gov.br/htm/resp/int>varicela.htm> [acesso em 30 de setembro de 2005].

SERGEEV, N., RUBTCOVA, E., CHIZICOV, V., SCHMID, D.S., LOPAREV, V.N, 2006. New mosaic subgenotype of varicella-zoster virus in the USA: VZV detection and genotyping by oligonucleotide-microarray. **Journal of virological methods**, 136: p. 8-16, 2006.

SHARRAR, R.G., LARUSSA, P., GALEA S.A., STEINBERG, S.P., SWEET, A.R., KEATLEY, R.M., WELLS, M.E., STEPHENSON W.P., GERSHON, A.A. The postmarketing safety profile of varicella vaccine. **Vaccine**, 19: p. 916-23, 2000.

SHINEFIELD, H., BLACK, S., WILLIAMS, W.R., MARCHANT, C., REISINGER, K., STEWART, T., MEISSNER, H.C., GUERRERO, J., KLOPFER, S.O., XU, J., SCHODEL, F., KUTER, B.J. Dose-response study of a quadrivalent measles, mumps, rubella and varicella vaccine in healthy children. **The Pediatric infectious disease journal**, 24 (8): p. 670-675, 2005.

SMITH, M.D., SCOTT, G.M., ROM, S., PATOU, G. Herpes simplex virus and facial palsy. **The journal of infection**, 15: p. 259–261, 1987.

STRATMAN, E. Visceral zoster as the representing feature of disseminated herpes zoster. **Journal of the American Academy of dermatology**, 46: p. 771-774, 2002.

TANG, J.W., EAMES, I., LI, Y., TAHA, Y., WILSON, P., BELLINGAN, G., WARD, K.N., BREUER, J. Door-opening motion can potentially lead to transient breakdown in negative-pressure isolation conditions: the importance of vorticity and buoyancy airflows. **The Journal of hospital infection**, 61: p. 283-286, 2005.

TAKAHASHI, M., OTSUKA, T., OKUNO, Y. Live vaccine used to prevent the spread of varicella in children in hospital. **Lancet**, 2: p. 1288-1290, 1974.

TAKAHASHI, M., ASANO, Y., KAMIYA, H., BABA, K., OZAKI, T., OTSUKA, T., YAMANISHI, K. Development of varicella vaccine. **The Journal of Infectious Disease**, 197 (2): p. 41-44, 2008.

TAKASAKI, T., SUGITA, K., FUJII, N., HIGASHIKAWA, M., MAKIMOTO, K., OHINATA, Y., FUJIWARA, Y., MOTOYAMA, S., YAMAGUCHI, J. Human herpesvirus-6 antibodies in idiopathic facial nerve palsy or sudden deafness. **Kansenshogaku Zasshi**, 67 (5): p. 440-443, 1993.

THOMAS, M.B., JURG, H.C., JAN-OLAF, G. Fatal varicella-zoster virus, antigen-positive giant cell arteritis of the central nervous system. **The Pediatric Infectious Disease Journal**, 19: p. 653-6, 2000.

THOMPSON, J.D., GIBSON, T.J., PLEWNIAK, F., JEANMOUGIN, F., HIGGINS, D.J. The Clustal X window interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. **Nucleic Acidic Research**, 25: p. 4876-4882, 1997.

TRAAVIK, T., STORVOLD, G., SUNDSFJORD, A., LUND, S., MAIR, I.W. Peripheral facial palsy and coincidental cytomegalovirus infection or reactivation. **Scandinavian journal of infectious disease**, 15: p. 233–238, 1983.

TSOLIA, M.A., GERSHON, S.S., GELB, L. Live attenuated varicella vaccine: evidence that the virus is attenuated and the importance of skin lesions in transmission of varicella-zoster virus. **The Journal of Pediatrics**, 116: p. 184-189, 1990.

TUGWELL, B.D., LEE, L.E., GILLETTE, H., LORBER, E.M., HEDBERG, K., CIESLAK, P.R. Chickenpox outbreak in a highly vaccinated school population. **Pediatrics**, 117: p. 455-459, 2004.

TYLER, S.D., PETERS, G.A., GROSE, C., SEVERINI, A., GRAY, M.J., UPTON, C., TIPPLES, G.A. Genomic cartography of varicella-zoster virus: a complete genome-based analysis of strain variability with implications for attenuation and phenotypic differences. **Virology**, 359: p. 447-458, 2007.

UEBE, B., SAUERBREI, A., BURDACH, S., HORNEFF, G. Herpes zoster by reactivated vaccine varicella zoster virus in a healthy child. **European journal of pediatrics**, 161(8): 442-444, 2002.

VASQUEZ, M., LARUSSA, P., GERSHON, A., STEINBERG, S., FREUDIGMAN, K., SHAPIRO, E. The effectiveness of the varicella vaccine in clinical practice. **The New England journal of medicine**, 344: p. 955-956, 2001.

VIZOSO PINTO, M.G., PFREPPER, K.I., JANKE, T., NOELTING, C., SANDER, M., LUEKING, A., HAAS, J., NITSCHKO, H., JAEGER, G., BAIKER, A. A systematic approach for the identification of novel, serologically reactive recombinant Varicella-zoster virus (VZV) antigens. **Virology Journal**, 7: p. 165, 2010.

WAGENAAR, T.R., CHOW, V.T., BURANATHAI, C., THAWATSUPHA, P., GROSE, C. The out of Africa model of varicella-zoster virus evolution: single nucleotide polymorphisms and private alleles distinguish Asian clades from European/North American clades. **Vaccine**, 21: p. 1072-1081, 2003.

WAGENPFEIL, S., NEISS, A., WUTZLER, P. Effects of varicella vaccination on herpes zoster incidence. **Clinical microbiology and infection**, 10: p. 954-960, 2004.

WHARTON, M. The epidemiology of varicella-zoster virus infection. **Infectious disease clinics of North America**, 1996, 10 (3): p. 571-581, 1996.

WHITE, C.J. Clinical trials of varicella vaccine in healthy children. **Infectious disease clinics of North America**, 10: p. 595-608, 1996.

WISE, R.P., SALIVE, M.E., BRAUN, M.M., MOOTREY, G.T., SEWARD, J.F., RIDER, L.G., KRAUSE, P.R. Postlicensure safety surveillance for varicella vaccine. **JAMA**, 284: p. 1271-1279, 2000.

YU, A.L.F., AMAKU, M., BURATTINI, M.N., MASSAD, E., AZEVEDO, R.S. Varicella transmission in two samples of children with different social behaviour in the state of São Paulo, Brazil. **Epidemiology and infection**, 127 (3): p. 493-500, 2001.

ZAIA, J.A., LEVIN, M.J., PREBLUD, S.R., LESZCZYNSKI, J., WRIGHT, G.G., ELLIS R.J., CURTIS, A.C., VALERIO, M.A., LEGORE, J. Evaluation of varicella-zoster immune globulin: protection of immunosuppressed children after household exposure to varicella. **The journal of infectious disease**, 147: p. 737-43, 1983.

ZIEBOLD, C., VON KRIES, R., LANG, R., WEIGL, J., SCHMITT, H.J. Severe complications of varicella in previously healthy children in Germany: a 1-year survey. **Pediatrics**, 108 (5): p. 79, 2001.

## ANEXO 1

**Instituto Evandro Chagas**  
**Seção de Virologia Geral**

**COD: (IEC) VVZ** \_\_\_\_\_ **Registro:** \_\_\_\_\_

**Razão:** ( ) Pesquisa ( ) Rotina

**PROCEDÊNCIA:** ( ) Rede Particular Local: \_\_\_\_\_

( ) Rede Pública Local: \_\_\_\_\_

Outros \_\_\_\_\_

**IDENTIFICAÇÃO:**

Nome: \_\_\_\_\_

Sexo: ( ) Fem. ( ) Masc. Idade : \_\_\_\_\_

Estado Civil : ( ) Solt. ( ) Cas.

Telefone para contato: ( ) \_\_\_\_\_ - \_\_\_\_\_/Celular: ( ) \_\_\_\_\_ - \_\_\_\_\_.

E-mail: \_\_\_\_\_.

Endereço: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

Bairro: \_\_\_\_\_ Cidade: \_\_\_\_\_ UF: \_\_\_\_.

Profissão: \_\_\_\_\_ Ocupação: \_\_\_\_\_

**Suspeita Clínica:**

( ) Varicela “catapora” ( ) Herpes zoster “cobreiro”

Início dos sintomas: \_\_/\_\_/\_\_\_\_\_.

**Dados Clínicos:****Amostras:**

( ) sangue total ( ) soro ( ) swab nasal ( ) swab oral ( ) swab vesicular

## ANEXO 2

### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE) CARACTERIZAÇÃO GENOTÍPICA DO VÍRUS VARICELA-ZOSTER EM CASOS DE VARICELA E HERPES ZOSTER, EM BELÉM, PARÁ, BRASIL.

O vírus Varicela-zoster (VZV) é o agente etiológico da catapora e do herpes zoster (cobreiro) e também está associado á casos de paralisia facial periférica, doenças caracterizadas pelos sintomas clínicos: febre, faringite, vesículas por todo o corpo ou apenas na região torácica e paralisia facial; que em geral, apresenta-se de forma benigna. Esses vírus são adquiridos geralmente na infância e na adolescência, podendo reativar-se causando infecção numa fase posterior da vida.

Pelo fato de não haver na nossa região, dados sobre as cepas circulantes (tipos) desse vírus é que o Núcleo de Medicina Tropical e Instituto Evandro Chagas se propõem a realizar esse estudo; oferecendo aos pacientes que quiserem participar do projeto, uma avaliação dos anticorpos para o vírus Varicela-zoster (VZV).

Eu, \_\_\_\_\_, com \_\_\_\_\_ de idade, fui procurado (a) pela equipe do Dr. Marcos Rogério Menezes da Costa, oportunidade em que fui informado sobre os objetivos da pesquisa, dentro do projeto acima citado. Paralelamente, serão anotadas algumas questões referentes á minha pessoa, no que diz respeito a dados pessoais como a data de nascimento e relativo a hábitos de vida e a minha doença. Estas informações serão retiradas do meu prontuário ou na ausência delas, serão perguntadas pessoalmente a mim.

Compreendido tudo isso, eu autorizo tanto a colheita de sangue, saliva e secreções quanto os exames a serem feitos nas minhas amostras e nas de meus familiares que estão sob minha responsabilidade, isto é, aquele(s) maior(es) de um ano e menor(es) de dezoito anos de idade, com os seguintes nome(s):.....

A equipe ainda me informou que os menores de idade, acima citados podem não querer participar do estudo, e que nesse caso vale a vontade deles sobre a minha. Foi garantido também que as informações dadas ao projeto são sigilosas.

Caso necessite, posso fazer contato com os integrantes da equipe da Seção de Virologia, Laboratório de Epstein-Barr, Instituto Evandro Chagas (cito a Rodovia BR-316 km 7 s/n - Levilândia, Ananindeua-PA) pelos telefones: (091) 3214-2017, 3214-2023 e fax (091) 3214-2005.

Por fim declaro que além de ler esse documento, recebi as explicações que desejei da equipe do projeto, e por não ter mais dúvidas, concordo em participar como voluntário do projeto e estudo agora proposto, o que fica confirmado pela minha assinatura abaixo.

---

Doador de Material Biológico

**ANEXO 3**

**Parecer de Aprovação nº 0004/2009**  
**Protocolo CEP/IEC - Nº 0028/2009**  
**CAAE: 0028.0.072.000-08**

Ananindeua/PA, 29 de abril de 2009.

**COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA COM HUMANOS**

Projeto: **“Caracterização molecular do vírus varicela-zoster em casos de varicela, herpes-zoster e paralisia facial periférica”**

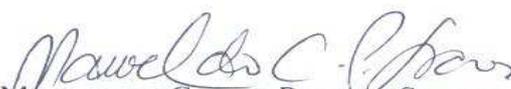
**Pesquisador Responsável: MARCOS ROGÉRIO MENEZES DA COSTA**

Conforme decisão do Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Evandro Chagas/SVS/MS, cientificamos que o projeto em epigrafe foi considerado **aprovado**.

Recomendamos a coordenação que mantenha atualizados todos os documentos pertinentes ao projeto.

Este CEP se incumbirá dos procedimentos de acompanhamento preconizados pela Resolução 196/96 e suas complementares, do Conselho Nacional de Saúde/Ministério da Saúde.

Deverá ser encaminhado relatório anual e, ao final, elaborado um relatório consolidado, incluindo os resultados finais da pesquisa, em um prazo máximo de 60 (sessenta) dias, após a finalização da pesquisa.

  
MANOEL DO CARMO PEREIRA SOARES  
Coordenador do CEP/IEC